

Otto-von Guericke Universität Magdeburg
Medizinische Fakultät
Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie
Direktor: Professor Dr. med. Berend Isermann



Das Nlrp3-Inflammasom verstärkt die diabetische Nephropathie in ortsständigen Zellen
der Niere

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Christian Friedrich Wacker

aus Stuttgart

Magdeburg, 2016

Bibliographische Beschreibung

Wacker, Christian:

Das Nlrp3-Inflammasom verstärkt die diabetische Nephropathie in ortsständigen Zellen der Niere. – 2016 76 Bl., 11 Abb., 9 Tab.

Kurzreferat

Fast die Hälfte der an Diabetes mellitus erkrankten Patienten entwickelt im Lauf des Lebens eine diabetische Nephropathie und in der Folge meist eine terminale Niereninsuffizienz.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle des Nlrp3-Inflammasoms im Rahmen der diabetischen Nephropathie zu untersuchen. Daraus abgeleitet sollen in dieser Arbeit mögliche Therapieansätze evaluiert und ihr Nutzen überprüft werden.

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass das Nlrp3-Inflammasom in vitro und im Tiermodell für Diabetes mellitus Typ 1 und Diabetes mellitus Typ 2 aktiviert wird. Weiterhin kann die Nlrp3-Inflammasomaktivierung auch in Glomeruli und hier insbesondere in den Podozyten von Nierenproben an diabetischer Nephropathie leidenden Patienten nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass das Nlrp3-Inflammasom nicht nur in den Immunzellen wie Makrophagen und Monozyten von Bedeutung ist, sondern auch in ortsständigen Zellen der Niere wie Endothelzellen und insbesondere den Podozyten aktiv ist.

Weiter werden mögliche neue Therapiealternativen zur Behandlung der diabetischen Nephropathie beleuchtet. Der hier aufgezeigte Ansatz mit dem IL-1-Antagonisten Anakinra und dem Tetracyclinantibiotikum Minocyclin ist vielversprechend und bedarf nun einer klinischen Evaluation.

Schlüsselwörter

Diabetische Nephropathie – Endothelzellen – Podozyten – Inflammasom – Nlrp3 – Anakinra - Minocyclin

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	8
TABELLENVERZEICHNIS	8
1 EINFÜHRUNG	9
1.1 DIABETES MELLITUS	9
1.1.1 <i>Epidemiologie</i>	9
1.1.2 <i>Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus</i>	9
1.2 DIABETISCHE NEPHROPATHIE UND NIERENINSUFFIZIENZ.....	10
1.2.1 <i>Hintergrund und Definition</i>	10
1.2.2 <i>Pathologische Klassifikation</i>	11
1.2.3 <i>Pathophysiologie und Pathogenese</i>	12
1.2.4 <i>Früherkennung, Diagnose und Verlauf</i>	14
1.2.5 <i>Derzeitige und mögliche zukünftige Therapieoptionen</i>	14
1.3 DAS NLRP3-INFLAMMASOM	15
1.4 ANAKINRA IST EIN WIRKSAMER IL-1-ANTAGONIST BEI ENTZÜNDLICHEN PROZESSEN	18
1.4.1 <i>Interleukin 1</i>	18
1.4.2 <i>Anakinra</i>	19
1.5 MINOCYCLIN UND SEINE PROTEKTIVEN WIRKUNGEN AUF ZELLEN UNABHÄNGIG VON DER ANTIBAKTERIELLEN WIRKUNG	20
1.6 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG	21
2 MATERIAL UND METHODEN	22
2.1 GERÄTE	22
2.2 REAGENZIEN UND VERBRAUCHSMATERIALIEN	23
2.2.1 <i>Chemikalien und Lösungen</i>	23
2.2.2 <i>Verbrauchsmaterial</i>	24
2.2.3 <i>Lösungen und Puffer</i>	24
2.3 ANTIKÖRPER	25
2.3.1 <i>Primärantikörper</i>	25
2.3.2 <i>Sekundärantikörper</i>	25
2.4 VERSUCHSTIERE	26
2.4.1 <i>Tierhaltung</i>	26
2.4.2 <i>db/db Mäuse als Modell für Diabetes mellitus Typ 2</i>	26
2.4.3 <i>Mausmodell für Diabetes mellitus Typ 1 durch Streptozotocin-induzierten β - Zelluntergang des Pankreas in C57BL/6-Mäusen</i>	27
2.4.4 <i>Unilaterale Nephrektomie bei C57BL/6 -Mäusen zur Verstärkung der hyperglygämischen Effekte bei diabetischer Nephropathie</i>	27
2.4.5 <i>Medikamentengabe an die Tiere</i>	28
2.4.6 <i>Wasser- und Futterverbrauch</i>	28
2.4.7 <i>Determination der Albuminurie und Kreatininurie</i>	28
2.4.8 <i>Bestimmung des Blutzuckerspiegels</i>	28
2.4.9 <i>Glucosetoleranztest</i>	28
2.5 ZELLINIEN.....	29
2.5.1 <i>Zellkulturmedien, Sera, Buffer und Supplements</i>	29
2.5.2 <i>Endothelzellen</i>	29
2.5.3 <i>Podozyten</i>	29
2.5.4 <i>Zellkulturelle Methoden</i>	30
2.6 ANALYSE DER MENSCHLICHEN PROBEN	30
2.7 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN.....	31
2.7.1 <i>Extraktion von Gesamtproteinen aus Geweben und Zellkulturen</i>	31
2.7.2 <i>Quantitative Proteinbestimmung</i>	31

2.7.3	SDS-PAGE.....	32
2.7.4	Proteintransfer und Immunblot.....	32
2.7.5	Proteindetektion durch Chemilumineszenz.....	33
2.7.6	Entfernen von Antikörpern von der Membran („Stripping“).....	33
2.8	HISTOCHEMISCHE UND IMMUNHISTOCHEMISCHE NACHWEISE	33
2.8.1	Mayer's Hämatoxylin und PAS-Reaktion	33
2.8.2	Fluoreszenzfärbung zur DNA-Markierung.....	34
2.8.3	Immunhistochemische Färbung	34
2.8.4	Fluoreszenzmikroskopie.....	35
2.8.5	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie	35
2.9	STATISTISCHE ANALYSE.....	36
2.10	SOFTWARE	36
3	ERGEBNISSE	37
3.1	DIE AKTIVIERUNG DES NLRP3-INFLAMMASOMS IST MIT DEM AUFTRETEN DER DIABETISCHEN NEPHROPATHIE IN DB/DB MÄUSEN ASSOZIIERT	37
3.2	DIE AKTIVIERUNG DES INFLAMMASOMS IN PODOZYTEN UND ENDOTHELZELLEN <i>IN VITRO</i>	39
3.3	DIE AKTIVIERUNG DES NLRP3-INFLAMMASOMS BEI PATIENTEN MIT DIABETES MELLITUS TYP 2	41
3.4	DIE AKTIVIERUNG DES INFLAMMASOMS ERFOLGT INSBESONDERE IN ORTSSTÄNDIGEN ZELLEN DES GLOMERULI BEI DIABETISCHER NEPHROPATHIE.....	44
3.5	ANAKINRA SCHWÄCHT DAS FORTSCHREITEN DER DIABETISCHEN NEPHROPATHIE AB UND MACHT SIE RÜCKGÄNGIG	46
3.6	MINOCYCLIN REDUZIERT DIE AKTIVIERUNG VON CLEAVED CASPASE 1 IN GLOMERULI VON DB/DB MÄUSEN	50
3.7	DIE DIABETISCHE NEPHROPATHIE DETERMINIERENDE PARAMETER WERDEN DURCH MINOCYCLIN ENTSCHEIDEND BEEINFLUSST.....	52
4	DISKUSSION	56
4.1	DIE NLRP-3-INFLAMMASOMAKTIVIERUNG UND DIABETISCHE NEPHROPATHIE, ANGELOCKTE UND EINGEWANDERTE ZELLEN DES IMMUNSYSTEMS?.....	56
4.2	NLRP3-INFLAMMASOMAKTIVIERUNG IN DEN ORTSSTÄNDIGEN ZELLEN DER NIERE IN VITRO UND IN VIVO	57
4.3	REAKTIVE SAUERSTOFFSPEZIES ALS „TRIGGER“ DES NLRP3-INFLAMMASOMS.....	59
4.4	ANAKINRA VERHINDERT DEN BEREITS ETABLIERTEN NIERENSCHADEN BZW. MACHT DIESEN RÜCKGÄNGIG	61
4.5	MINOCYCLIN HEMMT DIE MIT HYPERGLYKÄMIE ASSOZIIERTE ROS-PRODUKTION UND AUCH DAS NLRP3-INFLAMMASOM.....	62
5	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE.....	64
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	66
7	DANKSAGUNG.....	73
8	EHRENERKLÄRUNG	74
9	PUBLIKATIONEN	75

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACE	Angiotensin Converting Enzym
ACE-Hemmer	Angiotensin Converting Enzym-Hemmer
ADA	Amerikanische Diabetes-Gesellschaft
AGE	Advanced glycation endproduct
Aqua dest	destilliertes Wasser
ASC-Protein	Apoptosis-associated speck-like protein
ATP	Adenosintriphosphat
ATP-P2X4	ATP-gated cation channel protein
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
CARD	caspase recruitment domain
CCL2	CC-chemokine Ligand 2
CD34	Cluster of Differentiation 34
CKD-EPI	Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration
Cl Casp1	cleaved Caspase1
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
Db/db Mäuse	BKS.Cg-Dock7m +/- Leprdb/J
DM Typ 1	Diabetes mellitus Typ 1
DM Typ 2	Diabetes mellitus Typ 2
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
eGFR	geschätzte glomeruläre Filtrationsrate
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EM	Elektronenmikroskop
FCS	fetal calf serum
FDA	US Food and Drug Administration
FMA	fractional mesangial area
GAD	Glutamat-Decarboxylase
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GFB	glomeruläre Filtrationsbarriere
GLUT	Glucosetransporter

HbA1c	Glykiertes Hämoglobin
HFD	high fat diet
HLA	Human Leukocyte Antigen
HMG-CoA-	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-
HRP	Horseradish peroxidase
IAA	Insulinautoantikörper
ICA	Inselzellantikörper
IDDM	insulin dependent diabetes mellitus
IL	Interleukin
IPAF	ICE protease activating factor
kD	Kilodalton
LDL	Low Density Lipoprotein
LM	Lichtmikroskop
LPS	Lipopolysaccharide
Mg	Magnesium
MHC	Major Histocompatibility Complex
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin
NADPH Phosphat	reduzierte Form des Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cell
NLR	NOD-like receptor
NOD	nucleotide oligomerization domain
PARP-1	Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1
PBS	phosphate buffered saline
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PJ-34	PARP-1-Inhibitor
RIP-2	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
BCA	Bicinchoninsäure
ROS	Reactive Oxygen Species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	sodium dodecyl sulfat
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfat Polyacrylamide gel electrophoresis
STZ	Streptozotocin

SVEC	Immortalized murine smooth vascular endothelial cells
TBS	Tris-buffered Saline
TBS-T	Tris-buffered Saline + Tween-20
TGF- β	Transforming growth factor beta
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
Trypsin-EDTA	Trypsin-ethylene diamine tetraacetic acid
TXNIP	Thioredoxin Interacting Protein
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Die Aktivierung des Inflammasoms ist mit der diabetischen Nephropathie in db/db Mäusen assoziiert.	38
Abbildung 2: Das Nlrp3-Inflammasom wird in vitro in mit Glucose gestressten Podozyten aktiviert.....	40
Abbildung 3: Das Nlrp3-Inflammasom wird in vitro in mit Glucose gestressten Endothelzellen aktiviert.....	41
Abbildung 4 a und b: Die Aktivierung des Inflammasoms ist mit der diabetischen Nephropathie bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 assoziiert.	43
Abbildung 4 c: Die Aktivierung des Inflammasoms ist mit der diabetischen Nephropathie bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 assoziiert.	44
Abbildung 5: Die Aktivierung des Inflammasoms in den ortsständigen Zellen des Glomeruli bei diabetischer Nephropathie.....	45
Abbildung 6: Die Hemmung des Inflammasoms mit Anakinra (Ana) schwächt das Fortschreiten der Diabetischen Nephropathie ab bzw. macht es rückgängig.....	48
Abbildung 7: Die Hemmung des Inflammasoms mit Anakinra (Ana) schwächt das Fortschreiten der Diabetischen Nephropathie im Mausmodell für Diabetes mellitus Typ 1 mit absolutem Insulinmangel ab	49
Abbildung 8: Blutzuckerspiegel und Körpergewicht von diabetischen Mäusen mit und ohne Behandlung mit Anakinra	50
Abbildung 9: Minocyclin reduziert die Aktivierung von cleaved Caspase1 in db/db Mäusen.....	51
Abbildung 10: Mit Minocyclin behandelte db/db Mäuse weisen signifikant niedrigere Parameter der diabetischen Nephropathie auf.	54
Abbildung 11: Schematische Darstellung der Aktivierung des Nlrp3-Inflammasoms in den ortsständigen Zellen der Niere [129].	60

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Pathologische Klassifikation der diabetischen Nephropathie der Renal Pathology Society	11
Tabelle 2: Geräte	22
Tabelle 3: Chemikalien und Lösungen.....	23
Tabelle 4: Verbrauchsmaterial.....	24
Tabelle 5: Lösungen und Puffer	24
Tabelle 6: Primärantikörper	25
Tabelle 7: Sekundärantikörper	25
Tabelle 8: Medikamentengabe an die Tiere	28
Tabelle 9: Zellkulturmedien, Sera, Buffer und Supplements	29

1 Einführung

1.1 Diabetes mellitus

1.1.1 Epidemiologie

Diabetes mellitus darf heute zu Recht als weltweit auftretende Volkskrankheit bezeichnet werden, deren besondere Bedeutung für die Gesundheit der Weltbevölkerung noch zunehmen wird. Es steigen nicht nur die Krankheitsfälle bei älteren Patienten an [1], auch die Inzidenz bei Kindern nimmt zu [2, 3].

Die International Diabetes Federation prognostiziert, dass die Zahl der Patienten von 382 Millionen Menschen mit Diabetes mellitus weltweit (Stand 2013, Prävalenz 8,3 %) auf über 592 Millionen Menschen in weniger als 25 Jahren ansteigen wird [4]. In Deutschland ist dieser Anstieg der Krankheitsfälle ebenfalls zu verzeichnen. Die Auswertung von Krankenkassendaten ergibt, dass allein zwischen 1989 und 2007 ein Anstieg der Prävalenz von 5,9 % auf 8,9 % zu verzeichnen ist [5].

1.1.2 Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus

Unter dem Begriff Diabetes mellitus ist eine heterogene Gruppe von Stoffwechselerkrankungen zusammengefasst, deren gemeinsames Merkmal eine chronische Hyperglykämie ist. Die heutige Einteilung erfolgt in Deutschland entsprechend als Diabetes mellitus Typ 1, Diabetes mellitus Typ 2, andere spezifische Diabetestypen und Gestationsdiabetes [6].

Schon 1965 veröffentlichte die WHO erste Empfehlungen zu Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus [7]. Diese wurden Ende der 1990er Jahre insbesondere von der Amerikanischen Diabetes-Gesellschaft (ADA) grundlegend überarbeitet [8]. In der letzten Ausgabe 2010 der Empfehlungen der ADA ist erstmals neben den bekannten Grenzwerten des Blutzuckerspiegels auch ein HbA1c > 6,5 % als Diagnosekriterium eingeführt worden [9].

Der Diabetes mellitus Typ 2 ist mit einem Anteil von 90 % die häufigste Form. Dem Diabetes mellitus Typ 2 liegt eine gestörte Insulinsekretion und/oder eine Insulinresistenz zu Grunde. Bei an Diabetes mellitus Typ 2 erkrankten Patienten findet keine immunassoziierte Zerstörung der Insulin produzierenden β -Zellen im Pankreas statt. Zu Beginn benötigen die meisten Patienten keine Insulinsubstitution; eher sollte anfangs eine Ernährungsumstellung und vermehrte körperliche Aktivität erfolgen, bevor zuerst mit oralen Antidiabetika die medikamentöse Therapie begonnen wird [10,

11]. Bei Diabetes mellitus Typ 2 sind Stoffwechsellentgleisungen wie die Ketoazidose eher selten, die hyperosmolare Entgleisung kann jedoch zu Problemen führen. Häufig geht Diabetes mellitus Typ 2 im Verlauf mit einer schweren Mikro- und Makroangiopathie einher. Auch Adipositas ist häufig mit Diabetes mellitus Typ 2 assoziiert. Gemeinsam mit einer Dyslipoproteinämie, einer essentiellen arteriellen Hypertonie und eben der gestörten Glucosetoleranz werden sie zum Metabolischen Syndrom vereinigt. Es besteht Anhalt auf eine die Krankheit mitverursachende polygenetische Determination [12]. Allerdings ist der Beitrag dieser einzelnen Risikofaktoren weitestgehend unbekannt und im einzelnen gering [13].

Diabetes mellitus Typ 1 hingegen ist durch autoinflammatorische Prozesse bedingt, in deren Folge die β -Zellen des Pankreas durch eine Insulitis zu Grunde gehen und einen absoluten Insulinmangel verursachen. Charakteristisch ist eine Manifestation des Diabetes mellitus Typ 1 bereits im Kindes- und Jugendalter. Häufig geht er mit einer raschen Gewichtsabnahme, einer ausgeprägten Exsikkose und einer Polydipsie einher. Neben den Antikörpern, wie den Inselzellantikörpern (ICA), den Insulinautoantikörpern (IAA), Autoantikörper gegen die Glutamat-Decarboxylase (GAD), welche bei der Diagnostik in Kombination mit hoher Spezifität und Sensitivität zur Detektion der Erkrankung beitragen [14], spielen auch bestimmte HLA-Gene der MHC-Region auf Chromosom 6 eine prädisponierende Rolle [15]. Die heute obsoleete Bezeichnung Insulin-abhängiger Diabetes (IDDM) bringt zum Ausdruck, dass bei dieser Form des Diabetes mellitus von Beginn an Insulin substituiert werden muss [11].

1.2 Diabetische Nephropathie und Niereninsuffizienz

1.2.1 Hintergrund und Definition

Eine über einen längeren Zeitraum bestehende Hyperglykämie führt meist zu diabetesassoziierten Folgeschäden wie die diabetische Retinopathie, diabetische Neuropathie, periphere arterielle Verschlusskrankheit, Herzinfarkt, Schlaganfall oder die diabetischen Nephropathie. Die diabetische Nephropathie ist in den industrialisierten Ländern die Hauptursache einer terminalen Niereninsuffizienz [16]. Sie tritt bei bis zu 40 % der an Diabetes erkrankten Patienten mit Diabetes mellitus (DM Typ 1 und DM Typ 2) auf und führt im Falle einer terminalen Niereninsuffizienz unbehandelt durch ein Organversagen zum Tod [17-19]. Obgleich die terminale Niereninsuffizienz durch Dialyse behandelt werden kann, entwickeln die Patienten überdurchschnittlich häufig Gefäßkomplikationen, an denen die meisten Patienten

versterben. Bei an Diabetes mellitus Typ 2 erkrankten Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz liegt die jährliche Mortalität bei ca. 20 %.

Die diabetische Nephropathie im Sinne einer Glomerulosklerose wurde 1936 erstmals als noduläre Glomerulosklerose von Kimmelstiel und Wilson beschrieben [20]. Die noduläre Glomerulosklerose ist histologisch kennzeichnend für die diabetische Nephropathie. Es treten auch atrophische Tubulusschäden und insbesondere bei Diabetes mellitus Typ 2 eine diffuse Glomerulosklerose auf [21]. Die diabetische Nephropathie ist eine progressive Nierenerkrankung, die mit einer kapillären Angiopathie und einer Bindegewebsvermehrung einhergeht.

1.2.2 Pathologische Klassifikation

Die pathologischen Veränderungen bei der diabetischen Nephropathie wurden, passend zu den verschiedenen Ausprägungen bei Diabetes mellitus Typ 1 und Diabetes mellitus Typ 2, 2010 von der *Renal Pathology Society* neu klassifiziert [22]:

Tabelle 1: Pathologische Klassifikation der diabetischen Nephropathie der Renal Pathology Society

Klasse	Beschreibung	Einschlusskriterien
I	Milde oder kaum lichtmikroskopische Veränderungen; im EM jedoch Verbreiterung der glomerulären Basalmembran (<i>Hyperfiltration</i>)	Biopsie nicht zu II,III oder IV passend; Dicke der glomerulären Basalmembran > 430 nm bei Männern und > 395 nm bei Frauen
IIa	Milde mesangiale Expansion (<i>Mikroangiopathie</i>)	Biopsie nicht zu III oder IV passend Milde Verbreiterung < 25 % des Mesangiums
IIb	Schwere mesangiale Expansion (<i>Makroangiopathie</i>)	Biopsie nicht zu III oder IV passend Schwere Verbreiterung > 25 % des Mesangiums
III	Noduläre Sklerose (<i>Kimmelstiel-Wilson</i>)	>eine typische noduläre Sklerose der Kapillarschlingen
IV	Fortgeschrittene Glomerulosklerose	> 50 % der Glomeruli sind komplett vernarbt

1.2.3 Pathophysiologie und Pathogenese

Die diabetische Nephropathie ist eine Form der diabetischen Mikroangiopathie. Die Entwicklung der diabetischen Nephropathie erfolgt in drei Schritten: Zuerst erfolgt eine glomeruläre Hypertrophie und Hyperfiltration, gefolgt von einer Entzündung des Glomeruli und des tubulointerstitiellen Raums, was schließlich im Zelluntergang und der Akkumulation der Extrazellulärmatrix endet [23]. Klinisch äußert sie sich durch eine Abnahmen der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und einer Albuminurie. Definitionsgemäß ist eine Albuminurie zwischen 30-300 mg/24 h eine Mikroalbuminurie. Albuminausscheidungen > 300 mg/24 h werden als Makroalbuminurie oder Proteinurie bezeichnet. Goldstandard ist die Albuminbestimmung im 24 Stunden-Sammelurin. Ersatzweise kann darauf zur Einteilung des Schweregrads verzichtet werden, indem auch die Kreatininexkretion bestimmt wird und der Albumin/Kreatinin-Quotient gebildet wird.

Das Blut wird mit einem Druck von 48 mmHg durch die Kapillarschlingen der Glomeruli gepresst, dem entgegen wirkt ein Druck von 13 mmHg durch die Bowmansche Kapsel, zu dem der kolloidosmotische Druck mit 25 mmHg hinzukommt. Es bleibt also ein effektiver Filtrationsdruck von ca. 10 mmHg [24]. Das Ultrafiltrat muss dabei eine dreischichtige Struktur, die glomeruläre Filtrationsbarriere (GFB) bestehend aus Endothelzellen, der glomerulären Basalmembran und den Podozytenfortsätzen passieren. Insbesondere die endotheliale Seite der GFB enthält Proteoglykane mit negativ geladenen Heparansulfaten, was deren Barrierefunktion verstärkt [25]. Die Passage ist Molekülen bis zu einer Größe von 15 kD frei möglich. Albumin wird mit einer Molekülmasse von 66 - 69 kD zu 99,97 % in der Niere zurückgehalten. Verliert diese Schicht ihre wichtige Filterfunktion, kommt es zur Albuminurie.

Aktuell haben sich vier Hauptwege in der Pathogenese der diabetischen Nephropathie der durch die Hyperglykämie verursachten Veränderungen durchgesetzt:

1. Intrazelluläre Signalwege und Metabolismus (u.a. Aktivierung des Polyol-Stoffwechsel oder Aktivierung der Proteinkinase C)
2. Glykosylierung und oxidativer Stress (AGE, ROS)
3. Glomeruläre Hyperfiltration
4. Sterile Entzündung

Im Folgenden sind nun Mechanismen, welche diese Wege betreffen, dargestellt.

Kommt es beispielsweise zu einer Druckerhöhung aufgrund erweiterter Nierengefäße, arterieller Hypertonie oder hyaliner Ablagerungen entsteht zunächst eine

Hyperfiltration mit anschließender Nephrosklerose. Bei der diabetischen Nephropathie kommen zudem Anlagerungen von Glucosemolekülen an die Extrazellulärmatrix und an Gewebsproteine hinzu. Der Untergang von Nephrin als wichtiger Bestandteil der von den epithelialen Podozyten umgebenen Schlitzmembran scheint ebenso eine wichtige Rolle zu spielen [26, 27]. Passend zur nephroprotektiven Wirkung von ACE-Hemmern konnten auch Veränderungen in dem Angiotensin-Konvertierende-Enzym codierenden Gen mit der diabetischen Nephropathie assoziiert werden [28]. Auch Wachstumsfaktoren wie VEGF sind involviert, da sie sowohl systemisch als auch lokal von den Podozyten gebildet werden und an der glomerulären Erkrankung beteiligt sind [29]. Der Verlust der genauen Kontrolle von mTOR, welches für Proliferation und Differenzierung in Zellen eine wichtige Rolle spielt, kann ebenfalls zu Entstehung und Progress der diabetischen Nephropathie beitragen [30]. Die Hyperglykämie erhöht auch die Expression des im Nierenmesangium am häufigsten vorkommenden Glucosetransporter GLUT1. Die erhöhte Glucoseaufnahme (welche bei manchen Sequenzvariationen für GLUT1 erhöht ist [31]) in den Mesangiumzellen führt wiederum zur erhöhten Expression von TGF- β -1, welches seinerseits die Produktion zusätzlicher Extrazellulärmatrix stimuliert [32].

Eine besondere pathogenetische Relevanz im Rahmen der diabetischen Nephropathie kommt der endothelialen Dysfunktion zu. Ein erhöhter Blutzuckerspiegel hemmt die endotheliale Thrombomodulinexpression. Dies führt seinerseits zu einer Verminderung von aktiviertem Protein C, welches nun die durch Glucose induzierte zelluläre Dysfunktion nicht mehr hemmen kann [33]. Interessanterweise sind für das aktivierte Protein C neben der antikoagulatorischen auch eine antiinflammatorische Komponente gut etabliert.

Inflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-18 und TNF- α sind im Sinne einer chronischen systemischen Entzündungsreaktion bei Diabetes mellitus beteiligt und beschleunigen die Entwicklung und den Verlauf der diabetischen Nephropathie [34-36]. Auch Chemokine des CCL2/CCR2-Signalwegs sind in der Aktivierung von TGF- β und der Rekrutierung von Entzündungszellen beteiligt [37-39]. Während die sterile Entzündung als ein Charakteristikum der diabetischen Nephropathie akzeptiert ist, fehlen bisher antiinflammatorische therapeutische Ansätze in der Routine. Welche Rolle zum Beispiel antiinflammatorische Medikamente, die aus der Behandlung der Rheumatoiden Arthritis bekannt sind, bei der Diabetischen Nephropathie spielen könnten, ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

1.2.4 Früherkennung, Diagnose und Verlauf

Zur Früherkennung und Diagnose der diabetischen Nephropathie werden Albumin und Kreatinin aus dem Urin bestimmt. Eine Einteilung erfolgt in Mikro- und Makroalbuminurie (siehe 1.2.3). Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) wird anhand des Serumkreatinin, Alter, Geschlecht und Hautfarbe zum Beispiel mit der CKD-EPI-Formel geschätzt [40]. Werden nun in zwei von drei konsekutiv unabhängigen Proben eine Mikro- bzw. Makroalbuminurie entdeckt, ist von einer chronischen Nierenschädigung auszugehen. Eine diabetische Nephropathie liegt bei an Diabetes erkrankten Nierengeschädigten mit Albuminurie vor, insbesondere wenn andere Folgen der diabetischen Mikroangiopathie wie die diabetische Retinopathie bereits bestehen. Andere Ursachen, vor allem wenn die Proteinurie sehr rasch ansteigt, oder wenn eine essentielle arterielle Hypertonie unzureichend therapiert ist, sollten bedacht und ggf. ausgeschlossen werden.

1.2.5 Derzeitige und mögliche zukünftige Therapieoptionen

Eine optimale Blutzuckereinstellung mit einem HbA1c < 7,5 % ist unabdingbar und hat seinen Erfolg bei der Verhinderung bzw. Linderung diabetischer Folgeschäden, nicht zuletzt bei der diabetischen Nephropathie, gezeigt [41-43].

Die Wichtigkeit der strengen Einstellung des Blutdrucks ist ebenso bekannt. Es wurde der systolische Zielwert bei Patienten mit Makroalbuminurie mit < 130 mmHg festgelegt. Für alle anderen Patienten gilt ein Wert < 140 mmHg als Ziel [44].

Apolipoprotein D und niedriges HDL-Cholesterin sind unabhängige Risikofaktoren für die Entwicklung einer diabetischen Nephropathie [45, 46]. Atorvastatin hat als Vertreter der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren signifikanten Einfluss auf Albuminurie und eGFR [47].

Niedrige Vitamin D-Spiegel treten häufig bei Patienten mit diabetischer Nephropathie auf. Vitamin D zeigt experimentell eine antioxidative Wirkung über den Nrf2-Keap1-Signalweg [48]. Durch einen Vitamin-D-Agonisten konnte bei Patienten die Albuminurie verringert werden [49].

Körperliche Aktivität und Kochsalzrestriktion haben ebenfalls einen hemmenden Einfluss auf den Progress der diabetischen Nephropathie gezeigt [50, 51].

Zielgerichtete Medikamente gegen die bei der diabetischen Nephropathie beteiligten Entzündungsprozesse sind hingegen noch nicht ausreichend erforscht und im klinischen Alltag etabliert. Der vielversprechende Ansatz mit der Substanz Bardoxolon, welche

oxidativen Stress und reaktive Sauerstoffspezies hemmen soll, musste aufgrund von aufgetretenen kardiovaskulären Nebenwirkungen in der klinischen Phase beendet werden [52]. Interessanterweise ist die Senkung eines erhöhten Harnsäurespiegels Gegenstand derzeitiger klinischer Studien [53]. Harnsäure ist ein typischer Aktivator des Inflammasoms und könnte so zur Pathogenese der diabetischen Nephropathie beitragen. Die Relevanz des Inflammasoms in den ortsständigen Zellen der Niere für die Pathogenese der diabetischen Nephropathie war aber bisher nicht ausreichend untersucht und wird in der vorliegenden Arbeit bearbeitet.

1.3 Das Nlrp3-Inflammasom

Der Begriff Inflammasom leitet sich aus den beiden Begriffen „Inflammation“, was seine Rolle bei der Aktivierung inflammatorischer Caspasen und Entzündungsmediatoren beschreibt, und „Soma“ (griechisch: Körper), was seine Anordnung als Multiproteinkomplex mit einem relativ hohen Molekulargewicht widerspiegelt. Es ist Teil des angeborenen Immunsystems und reagiert auf Stimuli mit pattern recognition receptors (PRRs) wie „toll-like receptors“ (TLRs) und „NOD-like receptors“ (NLRs). Während TLRs auf extra- und intrazelluläre Stimuli reagieren können, werden NLR-Proteinkomplexe ausschließlich im Zytosol aktiviert. Die Aktivierung des Nlrp3-Inflammasoms benötigt zwei wesentliche Signalinduktionen: Kommt es zu einem solchen (ersten) Stimulus, oligomerisieren spezifische Proteine (z.B. Nlrp3, ASC, Caspase1) und bilden einen Komplex, der dann Inflammasom genannt wird. Des Weiteren wird durch Geninduktion die inaktive Form pro-IL-1 β von IL-1 β gebildet. In dem Multiproteinkomplex wird dann in einem zweiten Schritt Caspase1 durch limitierte Proteolyse aktiviert. Aktivierte Caspase1 aktiviert wiederum die inaktiven Vorstufen pro-IL-1 β und pro-IL-18 [54]. Dazu benötigen manche Vertreter der NLR-Familie, wie das NLRP3-Inflammasom, Adapterproteine wie ASC (Apoptosis-associated speck-like protein), welches das NLR-Inflammasom mit der Procaspase-1 verbindet, da das Nlrp3-Inflammasom keine Caspase recruitment domain (CARD) besitzt [55, 56]. Welche Mechanismen in welchem Ausmaß letztlich zur Aktivierung des Inflammasoms führen, ist Gegenstand aktueller Forschung. Die derzeitigen Vorstellungen werden im Folgenden dargestellt.

Toll-like receptors aktivieren das Inflammasom und die pro-IL-1 β -Produktion. Lipopolysaccharide (LPS), welche als TLR-Agonisten bekannt sind, induzieren die pro-IL-1 β -Produktion über den NF- κ B-Signalweg [57]. Es konnte gezeigt werden, dass LPS in

Abwesenheit von TLR4 die Nlrp3-Inflammasomaktivierung und pro-IL-1 β -Produktion nicht induzieren kann. Für die TLR4-abhängige Caspase1 Aktivierung durch LPS sei wiederum ATP nötig [58]. Ob ATP immer benötigt wird, um das Nlrp3-Inflammasom zu aktivieren, ist nicht abschließend geklärt [59]. Extrazellulär vorkommendes ATP aktiviert den P2X-Purinrezeptor-7, welcher seinerseits das Inflammasom aktiviert [60]. Hierbei wird ein Pannexin-1 Kanal in die Zellmembran eingeschleust und geöffnet. Hierdurch gelangen Nlrp3-Agonisten in das Zytosol und das Nlrp3-Inflammasom wird direkt aktiviert [61]. Als weitere Möglichkeit der Aktivierung des Nlrp3-Inflammasoms seien Kristalle oder andere Liganden wie Asbest, Silicium, Aluminium oder Amyloid- β genannt [62]. Diese werden phagozytiert und den Lysosomen zugeführt. Unter dem Einfluss von Cathepsin rupturieren letztendlich die Lysosomen und das Nlrp3-Inflammasom wird aktiviert [63]. Ein weiterer sehr wichtiger Weg zur Aktivierung des Nlrp3-Inflammasoms ist die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Die Produktion von Sauerstoffradikalen durch die NADPH-Oxidase kann das Nlrp3-Inflammasom aktivieren, währenddessen eine Hemmung der NADPH-Oxidase zu einer reduzierten IL-1 β -Produktion führt. [62]. Weitere Studien zeigten, dass Makrophagen, die mit dem Antioxidans Mito-TEMPO behandelt wurden, eine geringere Sekretion von IL-1 β und IL-18 zur Folge haben [64]. Mito-TEMPO inhibiert die ROS-Produktion in den Mitochondrien und damit die Translokation mitochondrialer DNA in das Zytosol [65]. Nicht zuletzt hat die Gruppe Tschopp die Mechanismen, welche mitochondriale Dysfunktion mit ROS-Produktion und Nlrp3-Inflammasomaktivierung verbinden, aufgedeckt [66].

Bisher stand im Zusammenhang mit Diabetes mellitus und dem Nlrp3-Inflammasom insbesondere die Wirkung durch Chemotaxis durch IL-1 β und IL-18 auf zirkulierende Zellen der Immunabwehr wie T-Zellen, Monozyten oder Makrophagen hauptsächlich im Pankreas im Vordergrund. Man konnte zeigen, dass das Nlrp3-Inflammasom an der Migration von T1-Helferzellen in die Inselzellen des Pankreas beteiligt ist [67].

In weiteren Forschungsarbeiten wurde jedoch eine Inflammasomaktivierung auch in Zellen außerhalb des Immunsystems bewiesen. Hier sind unter anderem Keratinozyten, Zellen des Nervensystems und der Niere zu erwähnen [68, 69].

Speziell bei Glomerulonephritiden kommt es durch eine Inflammasomaktivierung zu einer Nierenschädigung. Sowohl das noch physiologische als auch das bereits im Krankheitsstadium befindliche Gewebe ist betroffen [70].

Eine Wächterfunktion nimmt das Nlrp3-Inflammasom bei Stoffwechselerkrankungen ein, so konnten bei Gicht oder Fettleibigkeit Zusammenhänge hergestellt werden. Nicht zuletzt ist das Nlrp3-Inflammasom bei der Entstehung des Diabetes mellitus Typ 2 in den β -Zellen des Pankreas beteiligt. Von einer autoinflammatorischen Reaktion auf metabolische Stressoren, wie hohe Glucosekonzentrationen oder freie Fettsäuren, ist auszugehen. Inflammatorische Zytokine wie $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und $\text{INF-}\gamma$ aktivieren Signalkaskaden, welche zu Fehlfunktion und Zelltod der Inselzellen führen [71]. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von $\text{IL-1}\beta$ das Auftreten von Diabetes mellitus Typ 2 abschwächen kann [72]. Hyperglykämie seinerseits kann die $\text{IL-1}\beta$ -Produktion über das Nlrp3-Inflammasom induzieren und ist somit an der Pathogenese von Diabetes mellitus Typ 2 beteiligt [73]. Das Thioredoxin-bindende Protein (TXNIP) wird über Bildung von ROS (gebildet durch glucoseinduzierte mitochondriale Dysfunktion) hochreguliert und aktiviert dann das Nlrp3-Inflammasom [74]. Der Zusammenhang zwischen ROS, TXNIP und dem Nlrp3-Inflammasom ist konsistent mit den Ergebnissen von Wang, der dies mit der Pathogenese metabolischer Erkrankungen wie Fettleibigkeit und Diabetes mellitus in Verbindung bringt [75]. Welche Mechanismen die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies als Antwort auf metabolischen Stress wie die chronische Hyperglykämie bei Diabetes mellitus anregen, ist noch nicht komplett verstanden. Eine übergeordnete Rolle nimmt dabei die mitochondriale Dysfunktion ein. Es gibt vielversprechende Ansätze, die auch in dieser Arbeit diskutiert werden. Auch sollte die periphere Bedeutung des Nlrp3-Inflammasoms bei der Entwicklung der diabetischen Nephropathie außerhalb des Pankreas näher erforscht werden, da sich bisherige Forschungsergebnisse hauptsächlich auf das Vorkommen in den Langerhans-Inseln des Pankreas beziehen. Deswegen ist es Ziel dieser Arbeit die Bedeutung des Nlrp3-Inflammasoms im Nierengewebe in Bezug zur diabetischen Nephropathie zu betrachten. Weiterhin werden mögliche zukünftige medikamentöse Therapieansätze diskutiert. Ein vielversprechender Ansatz ist hier die Behandlung mittels eines IL-1 -Antagonisten (Anakinra), der im Rahmen einer Tierstudie ebenfalls in der vorliegenden Arbeit untersucht wird.

1.4 Anakinra ist ein wirksamer IL-1-Antagonist bei entzündlichen Prozessen

1.4.1 Interleukin 1

Das Zytokin Interleukin-1 (IL-1) wurde 1977 erstmals von Charles Dinarello als humanes leukozytisches Pyrogen beschrieben [76]. Es hat als multifunktionales Enzym eine wichtige Rolle bei lokalen und systemischen Entzündungsreaktionen [77]. IL-1 kommt am häufigsten in Makrophagen und Monozyten vor. Es wird aber auch in vielen anderen Zellen wie neutrophilen Granulozyten, Fibroblasten, glatten Muskelzellen, Keratinozyten, Langerhans-Zellen, Osteoklasten, Astrozyten, Epithelzellen der Kornea und des Thymus, aber auch in Endothelzellen und anderen ortsständigen Zellen exprimiert [78]. IL-1 besteht aus den zwei unterschiedlichen Einheiten IL-1 α und IL-1 β , welche unterschiedliche Eigenschaften hinsichtlich Lokalisation, Expression und Sekretion haben. Die biologische, funktional äquivalente Wirkung wird aber bei beiden über den IL-1-Rezeptor vermittelt [79]. Das auf Chromosom 2 in der Nähe von IL-1 α und dem IL-1-Rezeptorantagonisten (IL-1-Ra) codierte Gen besteht in seiner exprimierten Form aus 153 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 17 kD. Der ebenso endogen vorkommende Interleukin-1-Rezeptorantagonist kann mit ähnlicher Affinität an den IL-1-Rezeptor binden und hemmt die Wirkung der beiden Agonisten kompetitiv. Die Agonisten und Antagonisten werden bei einer Immunreaktion simultan aktiviert. Das quantitative Verhältnis der Konzentrationen der Agonisten und des Antagonisten bestimmen das Ausmaß der Inflammation [79, 80]. IL-1 α wird bereits in seiner biologisch aktiven Form exprimiert. Wohingegen IL-1 β erst durch Prozessierung der Zysteinprotease Caspase1 zur wirksamen Bindung an den IL-1-Rezeptor befähigt wird [81]. Von den elf der Interleukin-1-Familie zugehörigen Proteine hat IL-1 β eine besondere Stellung als Therapieziel eingenommen. Dies kommt nicht zuletzt durch den spezifischen monoklonalen Antikörper Canakinumab zum Ausdruck [82].

Eine vermehrte Expression von Interleukin-1 kann bei verschiedenen Erkrankungen der Niere beobachtet werden, wie bei vaskulären Nephropathien [83], der Transplantatnephropathie [84] oder der Ig-A-Nephropathie [85]. Hier scheint wieder IL-1 β die herausragende Rolle zu spielen. Es konnte gezeigt werden, dass durch Interleukin-1 Monozyten und Makrophagen angelockt werden. Sie können durch die chemotaktische Wirkung im Interstitium akkumulieren und dort eine interstitielle Fibrose auslösen.

Hasegawa et al. [35] beschrieb 1991 erstmals den möglichen Zusammenhang zwischen Interleukin-1 und der Progression der diabetischen Nephropathie, welche durch eine vermehrte Expression von Interleukin-1 hervorgerufen wird. Dass das Gleichgewicht zwischen Interleukin-1 und dem Interleukin-1-Rezeptorantagonisten bei der Entwicklung der diabetischen Nephropathie von Bedeutung ist, konnte ebenfalls gezeigt werden [80, 86].

Die bisherigen Untersuchungen zeigen allerdings vorrangig die Rolle von Interleukin-1 in der Chemotaxis von Immunzellen. Inwiefern ortsständige Endothelzellen oder Podozyten an der IL-1-Regulation und letztendlich an Entzündungsprozessen im Glomerulus und im tubulären Interstitium beteiligt sind, bedarf weiterer intensiver Forschung und ist Teil der vorliegenden Arbeit.

1.4.2 Anakinra

Das Generikum Anakinra (Kineret® Swedish Orphan Biovitrum GmbH, Stockholm, Schweden) bezeichnet den N2-L-Methionyl-26-177-Interleukin-1-Rezeptorantagonisten mit einer Sequenzlänge von 153 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 17,26 kD. Es wird rekombinant in *Escherichia coli* hergestellt. Es ist das erste Präparat, das künstlich zur Inhibition von Interleukin-1 hergestellt wurde und in der Wirkung dem natürlichen IL-Rezeptorantagonisten gleicht. Es verhindert kompetitiv die Bindung von IL-1 α und IL-1 β an den IL-1-Rezeptor, ohne selbst eine intrinsische Wirkung zu haben [87]. Die Bioverfügbarkeit beträgt physiologisch im nicht entzündeten Gewebe 95 %. Bedingt durch die relativ kurze Halbwertszeit von vier bis sechs Stunden müssen die notwendigen Injektionen täglich wiederholt werden.

Anakinra kann sowohl zur Behandlung der juvenilen idiopathischen Arthritis (Morbus Still) [88], als auch in der therapierefraktären adulten Form eingesetzt werden [89]. Seine Erstzulassung erhielt es von der FDA 2001 zur Behandlung der Rheumatoiden Arthritis.

Interleukin-1 β verstärkt auch die Inflammation und Apoptose in den Inselzellen des Pankreas bei Diabetes mellitus Typ 1 [90]. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass auch bei Diabetes mellitus Typ 2 in den β -zellen vermehrt IL-1 gebildet wird [91]. In einer doppelblinden, randomisierten Studie mit 70 Patienten konnte die Wirksamkeit von Anakinra bei Diabetes mellitus Typ 2 auf Endpunkte wie einen signifikant niedrigeren HbA1c-Spiegel bzw. eine verbesserte Glucosetoleranz erfolgreich nachgewiesen werden [92]. Dies bezieht sich allerdings ausdrücklich auf Mechanismen im Pankreas. Die

vorliegende Arbeit untersucht die Wirkung von Anakinra als Therapieoption bei der diabetischen Nephropathie.

1.5 Minocyclin und seine protektiven Wirkungen auf Zellen unabhängig von der antibakteriellen Wirkung

Minocyclin ist ein Breitspektrumantibiotikum aus der Gruppe der Tetracykline. Mit seiner bakteriostatischen und langanhaltenden biologischen Wirksamkeit (Halbwertszeit 11 - 22 Stunden) wird es unter anderem bei Hals-Nasen-Ohren-Erkrankungen, Infektionen der Atemwege, der Harnwege, der Geschlechtsorgane und des Magen-Darm-Trakts eingesetzt. Häufig wird es auch in der Therapie der durch das Propionibakterium *acnes* verursachten Acne vulgaris eingesetzt [93]. Neben den antimikrobiellen Eigenschaften wurden Minocyclin zytoprotektive Eigenschaften unabhängig von der bakteriostatischen Wirkung zugesprochen. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass Minocyclin bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose oder der amyotrophen Lateralsklerose einen schützenden Effekt hat [94, 95]. Experimentell konnte ein antiatherosklerotischer Effekt durch Plaquereduzierung über den Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitor 1B (p27^{Kip1}) vermittelte Hemmung der Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen gezeigt werden [96].

Die Ergebnisse der Grundlagenforschung führten letztlich dazu, dass in einer klinischen Studie neuroprotektive Effekte von Minocyclin bei Patienten mit einem akuten ischämischen Schlaganfall bewiesen wurden [97].

Neben diesen Effekten konnten auch Komplikationen der diabetischen Mikroangiopathie aufgehalten und sogar rückgängig gemacht werden [33, 98]. Auch konnte eine Abschwächung der diabetischen Nephropathie durch Hemmung der Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP-2) und der damit abgeschwächten Degradation der extrazellulären Matrix durch die Behandlung mit dem COX-Hemmer Acetylsalicylsäure und Minocyclin gezeigt werden [99]. Diese Untersuchungen geben Hoffnung, dass durch die Therapie mit Minocyclin ein nephroprotektiver Effekt auch bei Patienten mit Diabetes mellitus genutzt werden kann.

1.6 Fragestellung und Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle des Nlrp3-Inflammasoms im Rahmen der diabetischen Nephropathie zu untersuchen. Das Nlrp3-Inflammasom ist Mediator entzündlicher Prozesse in Immunzellen wie Makrophagen und Monozyten. Ob die Nlrp3-Inflammasomaktivierung bei diabetischer Nephropathie auch in ortsständigen Zellen der Niere erfolgt, soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Hierzu sollen Experimente in vitro und in vivo sowie Untersuchungen an menschlichen Proben erfolgen. Insbesondere soll die Nlrp3-Inflammasomaktivierung in ortsansässigen Zellen wie Podozyten und Endothelzellen evaluiert werden. Bei einem erfolgreichen Nachweis der Aktivierung sollen Therapiemöglichkeiten, die auf die Hemmung des Nlrp3-Inflammasoms abzielen, erprobt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Tabelle 2: Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Abzug	Köttermann GmbH&Co KG, Uetze
Accutrend Glucometer	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
BioDic Analyze Live	Biometra GmbH, Göttingen
Biofuge Primo	Heraeus Holding GmbH, Hanau
BR-2000 Vortexer	Bio Rad Laboratories, München
DNA/RNA UV Cleaner	Biolabo Scientific Instruments, Schweiz
Eismaschine Scotman AF 206	HIBU Eismaschinen GmbH, Sprockhövel
Fresco 17 Zentrifuge	Heraeus GmbH, Hanau
Heizplatte yellow line	IKA Werke GmbH und Co KG, Staufen
HeraCell 150 Zellinkubator	Thermoscientific, Massachusetts, USA
Inkubator Ecocell	MS Laborgeräte, Mühlheim
Laser Scanning Mikroskop 780	Zeiss AG, Jena
Micro 20 Zentrifuge	Hettich GmbH, Tuttlingen
MicroChemi 4.2	Biostep GmbH, Jahnsdorf
Microplate Fluorescence Reader	Bio Tek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall
Mikroskop Olympus XC 30	Olympus, Tokio, Japan
Mikrowelle	Amica International GmbH, Ascheberg
MiniProtein Tetra System	Bio Rad Laboratories, München
Olympus CX 41 Mikroskop	Olympus, Tokio, Japan
pH-Meter pH 3110	WTW, Weilheim
Pipette 8-5010	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg
Power Pac 3000	Bio Rad Laboratories, München
Präzisionswaage	Kern&Sohn GmbH
RH Basic 2 Heizplatte	IKA Werke GmbH und Co KG, Staufen
Rotofix 32 Zentrifuge	Hettich GmbH, Tuttlingen
Schüttler CAT 20	M. Zipperer GmbH, Staufen
Teco20 CO ² Klein-Inkubator	SELUTECH GmbH, Hechlingen
Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen
Thermomixer Comofort	Eppendorf, Hamburg
Tiefkühl- und Gefrier Kombination	Liebherr GmbH, Biberach
Ultra Microplate Reader	Bio Tek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall
Vibrofix VF 1 Zentrifuge	IKA Werke GmbH und Co KG, Staufen
Wasserbad W12	Medingen Labortechnik; Arnsdorf
Zellinkubator	Binder GmbH, Tuttlingen

2.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

2.2.1 Chemikalien und Lösungen

Tabelle 3: Chemikalien und Lösungen

Substanz	Hersteller
Agarose, UltraPure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Antigen Unmasking Solution	Vector Labs, Burlingame USA
Anakinra (Kineret®)	Swedish Orphan Biovitrum, Stockholm Schweden
Bovine Serum Albumine, fraction V	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chloroform	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Caspase-Inhibitor M 920	Merck Frost, Kirkland Kanada
Dimethylsulfoxid	Roth GmbH, Karlsruhe
ECL	Roth GmbH, Karlsruhe
EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Eosin	Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Formalin, 4 %	Lablistic GmbH, Soest
Glucose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Haematoxylin	Roth GmbH, Karlsruhe
HOECHST 33258	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Humaninsulin (Glargin)	Sanofi-Aventis D GmbH, Frankfurt
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Iodine	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Mannitol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BroadRange Protein Ladder	Thermoscientific, Massachusetts, USA
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Minocyclin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natrium-Thiosulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phenol	Roth GmbH, Karlsruhe
Kalium-iodid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Roti Histo-Kitt II	Roth GmbH, Karlsruhe
Streptozotocin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Thioglycolat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris-HCL	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TRIZOL	Roth GmbH, Karlsruhe
Triton X-100	Roth GmbH, Karlsruhe
Tween-20	Roth GmbH, Karlsruhe
Vecta Shield Mounting Medium	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Xylol	Roth GmbH, Karlsruhe

2.2.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 4: Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
ACCU-Check Glucose Sticks	Roche Diagnostics, Mannheim
Counting Slides	Bio Rad Laboratories, München
Deckgläser	Knittel Glas GmbH, Braunschweig
Einmalskalpelle	B Braun AG, Melsungen
Eppendorf-tuben	Eppendorf, Hamburg
Latexhandschuhe	Meditrade, Kiefersfelden
Objekträger	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
Petrischalen in verschiedenen Größen	Phywe Systeme GmbH, Göttingen
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Standardpipetten Cellstar	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Standardtips 10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl	neoLab, Heidelberg
Zellschaber	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen

2.2.3 Lösungen und Puffer

Tabelle 5: Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Chemikalien
PBS 1X	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄ (pH 7,4)
TBS 1X	50 mM Tris.HCl 150 mM NaCl (pH 7,4)
TBS-T	50 mM Tris.HCl 150 mM NaCl 0,1 % Tween 20 (pH 7,4)
Antigen-Retrieval-Buffer	10 mM Tris Base 1 mM EDTA Lösung 0,05 % Tween 20 (pH 9,0)
SDS-Buffer	63 mM Tris HCl 10 % Glycerol 2 % SDS (pH 6,8)
Stacking Gel Buffer	0,4 mM Tris Base 0,4 % SDS (pH 6,8)
Resolving Gel Buffer	1,5 M Tris HCL (pH 8,8)
APS	10 % Ammoniumpersulfat 10 mL dH ₂ O
Tris-HCl Buffer	20 mM Tris HCl (pH 7,5)

Running Buffer	25 mM Tris Base 180 mM Glycin 0,1 % SDS (ph 8,4)
Blotting Buffer	48 mM Tris 39 mM Glycin 20 % Methanol 0,04 % SDS
RIPA-Buffer	150 mM NaCl 0,1 % Triton X-100 0,5 % Natriumdesoxycholat 0,1 % SDS 50 mM Tris-HCl ph 8,0
BCA-Arbeitslösung	49 % Reagent A (Puffer) 49 % Reagent B (BCA) 2 % Reagent C (Kupfersulfat-Lösung)

2.3 Antikörper

2.3.1 Primärantikörper

Tabelle 6: Primärantikörper

Spezifität	Typ	Verdünnung	Quelle
CD-34	Rat monoclonal	IF 1:150	Abcam, Cambridge, UK
cleaved-Caspase1	Goat polyclonal IgG	WB 1:500 IF 1:40	Santa Cruz, Dallas, USA
NLRP-3	Mouse monoclonal	WB 1:1000 IF 1:50	Abcam, Cambridge, UK
β -actin	Rabbit polyclonal	WB 1:2000	Cell Signalling, Boston, USA
Synaptopodin	Goat polyclonal	IF 1: 1:200	Abcam, Cambridge, UK
PECAM-1	Rabbit polyclonal	IF 1:50	Abcam, Cambridge, UK

2.3.2 Sekundärantikörper

Tabelle 7: Sekundärantikörper

Spezifität	Farbstoff	Verdünnung	Quelle
Goat Anti-Mouse	Texas Red	1:100	Abcam, Cambridge, UK
Goat Anti-Rabbit	Fluoreszein	1:100	Abcam, Cambridge, UK
Goat Anti-Rat IgG	Alexa-Fluor 680	1:50	Abcam, Cambridge, UK
Rabbit Anti-Goat	Fluoreszein	1:200	Abcam, Cambridge, UK

2.4 Versuchstiere

2.4.1 Tierhaltung

Die Tierversuche wurden nach einem positiven Votum des Landestierschutzes Sachsen-Anhalt durchgeführt. Die Untersuchungen wurden im Rahmen des Tierversuchsantrags 42502-2-1085 angestellt. Die Tiere waren in Ställen des Zentralen Tierlabors der Medizinischen Fakultät Magdeburg untergebracht und wurden unter apathogenen Bedingungen gehalten. Vier bis fünf Tiere waren in einem Käfig untergebracht. Ein Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils zwölf Stunden wurde gewährleistet. Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter und Wasser.

2.4.2 db/db Mäuse als Modell für Diabetes mellitus Typ 2

Ein Teil der Tierversuche wurde in einem Modell für Diabetes mellitus Typ 2 durchgeführt. Diese Tiere (BKS.Cg-*Dock7^m +/+ Lepr^{db}/J*) sind homozygot für eine spontane Punktmutation von Guanin zu Thymin im Leptinrezeptor kodierenden Gen. Die Tiere weisen somit einen Leptinrezeptordefekt auf. Durch das fehlende Leptinsignal im Hypothalamus bleibt das Sättigungsgefühl aus und die Tiere fallen durch erhöhte Leptin- und Insulinspiegel auf [100]. Nach etwa vier Wochen kann man eine deutliche Gewichtszunahme und nach etwa sechs bis acht Wochen einen erhöhten Blutzuckerspiegel verzeichnen [101]. Der Blutzuckerspiegel steigt auf bis über 40 mmol/l nach 16 Wochen an. Um eine letale Hyperglykämie zu vermeiden, wurde bei Mäusen, welche einen Blutzuckerspiegel > 35 mM aufwiesen, ein bis zwei IE Basalinsulin (Lantus ®) wöchentlich s.c. verabreicht. Eine deutliche Polyphagie, Polydipsie und Polyurie im Vergleich zu gesunden Mäusen ist erkennbar. Nach mehr als fünf Monaten schränkt die ausgeprägte Adipositas die Motilität in dem Maße ein, dass sie kaum noch Futter aufnehmen können und schließlich verenden. In den hier vorgenommenen Untersuchungen wurden die db/db Mäuse bis zu einem Höchstalter von 20 Wochen gehalten und dann getötet, um weitergehende Gewebeuntersuchungen vornehmen zu können [102]. Mäuse mit einem mit einer heterozygoten Punktmutation (db/m) im Leptinrezeptor kodierenden Gen entwickelten keine diabetische Stoffwechsellaage und wurden als Kontrollen in den Tierstudien verwendet.

2.4.3 Mausmodell für Diabetes mellitus Typ 1 durch Streptozotocin-induzierten β -Zelluntergang des Pankreas in C57BL/6-Mäusen

Die Verabreichung diabetogener Pharmaka ist ein etabliertes Verfahren um Diabetesmodelle zu erhalten. Das Nitrosamid Streptozotocin (STZ) kommt in zwei unterschiedlichen Dosierungsmodellen zum Einsatz: zum einen als Hochdosistherapie (einmalige Injektion) zum anderen als Niedrigdosistherapie. Die Niedrigdosistherapie induziert eine Entzündungs- und Immunreaktion. Diese führt zum Untergang der β -Zellen des Pankreas und ist deshalb als Modell für Diabetes mellitus Typ 1 anerkannt [103].

Der glucoseabhängige zytotoxische Effekt von STZ beruht auf Nitrosamidbestandteilen, welche Schäden an der DNA hervorrufen [104]. STZ wird an fünf aufeinanderfolgenden Tagen intraperitoneal in der Dosierung 40 mg/kg Körpergewicht verabreicht. Das STZ wird aus einem gefrorenen Aliquot aufgetaut, in Citratpuffer gelöst und innerhalb von 30 Minuten verabreicht. Es werden tägliche Blutzuckerbestimmungen durchgeführt, um das Auftreten einer diabetischen Stoffwechsellage nach ca. 10 - 14 Tagen sicher zu erkennen.

2.4.4 Unilaterale Nephrektomie bei C57BL/6 –Mäusen zur Verstärkung der hyperglykämischen Effekte bei diabetischer Nephropathie

Um die Progression der diabetischen Nephropathie zu verstärken, wurde bei einer Subgruppe der mit STZ behandelten C57BL/6-Mäuse zuvor eine Niere entfernt [105, 106]. Dazu wurde der Maus zur Narkoseinduktion Phenobarbital (1 mg/kg KG) intraperitoneal verabreicht. Bauch und Rücken wurden mit Alkohol gewaschen und das Peritoneum nach der Haut- und Muskelschicht eröffnet und die Nierenkapsel freigelegt. Die Arteria und Vena renalis wurden ebenso wie der Ureter ligiert, anschließend wurde die Niere möglichst unter Schonung der Nebenniere entfernt. Die Wunde wurde mittels chirurgischer Nähte versorgt. Nach der Wundheilung und weiteren zwei Wochen wurden die STZ-Injektionen zur Induktion der diabetischen Stoffwechsellage durchgeführt.

2.4.5 Medikamentengabe an die Tiere

Tabelle 8: Medikamentengabe an die Tiere

Medikament	Applikation	Dosis	Hersteller
Anakinra (Kineret®)	i.p.	100 µg/g KG (1x/Tag)	Swedish Orphan Biovitrum, Schweden
Insulin (Lantus®)	s.c.	1 - 2 IE bei BZ>35mM (3x/Woche)	Sanofi-Aventis
Minocyclin	i.p.	5 µg/g KG (1x/d)	Sigma-Aldrich
Streptozotocin	i.p.	40 µg/g KG (s. 2.4.3)	Merck Millipore

2.4.6 Wasser- und Futterverbrauch

Der Wasser- und Futterkonsum der diabetischen Mäuse wurde zwischen den verschiedenen Interventionsgruppen verglichen. Dazu wurde eine bestimmte Menge Futter abgewogen und den Tieren zur Verfügung gestellt. Ebenso wurden die Wasserflaschen abgewogen. Nach 48 Stunden wurde die Restmenge erneut gewogen und daraus der Verbrauch einer Maus innerhalb von 24 Stunden berechnet.

2.4.7 Determination der Albuminurie und Kreatininurie

Um die renale Exkretion von Proteinen zu messen, wurden die Tiere für 24 Stunden einzeln in spezielle Stoffwechsellkäfige umgesetzt, in denen der Urin über diesen Zeitraum gesammelt wurde. Das Albumin des Urins wurde unter Verwendung eines ELISA auf Mausalbumin nach den Anweisungen des Herstellers (Abcam, Cambridge, UK: Mouse Albumin ELISA Kit) bestimmt. Kreatinin wurde unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Assays nach einer modifizierten Version des Jaffe-Verfahrens bestimmt (X-Pand automatisierte Plattform; Siemens).

2.4.8 Bestimmung des Blutzuckerspiegels

Zur Blutzuckermessung wurde Vollblut aus einer Schwanzvene gesammelt und mit Hilfe von Glucose-Teststreifen (ACCU-Check®) gemessen. Die Blutzuckermessung erfolgte während den Behandlungen, bei denen eine Veränderung des Blutzuckerspiegels postuliert wurde, meist täglich, mindestens jedoch ein- bis zweimal pro Woche.

2.4.9 Glucosetoleranztest

Der Zugang zu Futter blieb den Mäusen zu Beginn des Versuchsaufbaus für zwölf Stunden verwehrt. Danach erfolgte die erste Blutzuckerbestimmung aus dem venösen Vollblut einer Schanzvene mit Hilfe der Glucose-Teststreifen. Anschließend wurden den

Tieren 2 g/kg Körpergewicht Glucose, gelöst in NaCl, intraperitoneal injiziert. Nach 0 min, 30 min, 60 min, 120 min und 180 min wurde jeweils der Blutzuckerspiegel bestimmt.

2.5 Zelllinien

Für die vorliegende Arbeit wurden Podozyten und Endothelzellen (SVEC) in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert, sofern nicht anders beschrieben. Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen in einer Zellkulturwerkbank durchgeführt. Die Herstellung der Lösungen und Medien erfolgte ebenfalls unter sterilen Kautelen. Alle Lösungen wurden vor der Verwendung im Wasserbad auf 37 °C erwärmt und die Flaschen vor der Verwendung an der Werkbank mit 70 % Ethanol besprüht.

2.5.1 Zellkulturmedien, Sera, Buffer und Supplements

Tabelle 9: Zellkulturmedien, Sera, Buffer und Supplements

Bezeichnung	Hersteller
Fötale Kälberserum (FCS)	PromoCell, Heidelberg
0,05 % Trypsin-0,02 % EDTA	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
DMEM (1 mg/ml Glukose)	Life Technologies, Carlsbad, USA
DMEM (4,5 mg/ml Glukose)	Life Technologies, Carlsbad, USA
RPMI-1640 Medium	ATVV, Manassas, USA
Dulbecco's PBS ohne Ca und Mg	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
100X Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Wachstumsfaktoren (FCS EGF)	PromoCell, Heidelberg
Gentamicin Sulfat	PromoCell, Heidelberg
Amphotericin B	PromoCell, Heidelberg
6 well, 24 well, 96 well Platten	neoLab, Heidelberg
2 cm und 6 cm Petrischalen	neoLab, Heidelberg

2.5.2 Endothelzellen

Die Endothelzellen wurden in DMEM mit 5,5 mmol/l Glucose kultiviert, welches mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) und einer 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung versetzt wurde. Das FCS wurde zuvor bei 56 °C für 30 min inaktiviert.

2.5.3 Podozyten

Die konditional immortalisierten Mauspodozyten proliferierten in RPMI-1640-Medium mit 5,5 mmol/l Glucose, mit 10 % FCS und einer 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung und mit Interferon- γ (10 U/ml) bei 33 °C und 5 % CO₂ auf Kollagen Typ I.

Zur Induktion der Differenzierung wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ über 14 Tage inkubiert. In dieser Zeit wurde ein Medium ohne Interferon- γ angewandt.

2.5.4 Zellkulturelle Methoden

Die Zellen wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen aufgezogen und mit zehn ml Kulturmedium bedeckt, welches alle zwei bis drei Tage gewechselt wurde. Täglich wurden die Zellmonolayer unter dem inversen Mikroskop kontrolliert und kurz vor Erreichen der vollständigen Konfluenz im Verhältnis 1:3 gesplittet und aufgeteilt. Vor dem Splitten wurde das Medium mit einer Glaspipette abgesaugt und der Zellmonolayer mit einer zehn ml calciumfreien, phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) gewaschen. Die PBS wurde abgesaugt und der Zellmonolayer sofort mit zwei ml Trypsin-EDTA versetzt, leicht geschwenkt und dann für zwei Minuten bei 37 °C inkubiert. Unter dem inversen Mikroskop wurde nun kontrolliert, ob sich schon alle Zellen gelöst hatten. Die Trypsinisierung wurde mit sechs ml Medium gestoppt. Das Medium wurde mit den darin gelösten Zellen aufgenommen und in ein 15 ml-Falcon überführt. Die Zellen wurden für fünf Minuten bei 1200 rpm und bei 18 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in frischem Medium gelöst.

Die Subkulturen konnten nun frisch ausgesät werden. Für die Experimente wurde die Zellzahl mit der Neubauer Zählkammer bestimmt und mit einer Zielkonzentration von 5×10^4 Zellen/ml Medium verdünnt und in sechs cm Petrischalen, in 6-Loch-beziehungsweise 96-Lochplatten ausgesät.

Zur Verwendung zu einem späteren Zeitpunkt werden die Zellen kryokonserviert. Hierzu werden die Zellen wie oben beschrieben gelöst, abzentrifugiert und mit Kulturmedium (enthält 10 % FCS) aufgenommen, welchem 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) zugesetzt worden war. Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer auf 2×10^6 Zellen/ml verdünnt und in Portionen zu einem ml in spezielle Einfrierröhrchen überführt. Die Röhrchen wurden nun bei -80 °C über zwölf Stunden eingefroren. Die Langzeitlagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196 °C.

Bei erneutem Bedarf wurden die Zellen in den Röhrchen bei 37 °C im Wasserbad rasch aufgetaut und sofort mit Medium verdünnt, da das DMSO die Zellen bei 37 °C irreversibel schädigen würde. Sobald eine Adhärenz der Zellen eingetreten war, wurden die Zellen mit Antibiotikum und Serum versetztem Medium im Brutschank kultiviert.

2.6 Analyse der menschlichen Proben

Die an Diabetes mellitus Typ 2 erkrankten Patienten (N = 87), entsprechend den Kriterien der American Diabetes Association [107], wurden in Kooperation von der Diabetes-Ambulanz des Universitätsklinikums Heidelberg rekrutiert. Die

Mikroalbuminurie wurde bei einer Albuminexkretion von 30 mg/24h in drei aufeinanderfolgenden Proben diagnostiziert. Die nichtdiabetische Kontrollgruppe (N = 33) wurden von den Ambulanzen der Universitätskliniken Heidelberg und Magdeburg rekrutiert. Die nichtdiabetischen Kontrollen hatten entweder keine oder eine geringe Osteoporose und eine gut kontrollierte Schilddrüsenfunktion (z.B. nach Thyreoidektomie). Nichtdiabetischen Kontrollen wurden mit Vitamin D und Kalzium (nur Osteoporose-Patienten) therapiert oder nahmen Schilddrüsenhormone ein, aber keine anderen Medikamente. Alle Patienten waren Kaukasier. Die Studie wurde nach den Kriterien der Deklaration von Helsinki durchgeführt, alle Patienten willigten per Einverständniserklärung in die Studie nach den Richtlinien der lokalen Ethikausschüsse ein. (Ethik-Ausschuss-Nr: 204/2004).

2.7 Proteinbiochemische Methoden

2.7.1 Extraktion von Gesamtproteinen aus Geweben und Zellkulturen

Zuerst wurde Radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer vorbereitet und diesem ein Cocktail aus Proteinaseinhibitoren (PIC) hinzugefügt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend in der Petrischale mit der RIPA + PIC-Lösung (250 µl für eine Schale mit zehn cm Durchmesser) für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Mit einem Zellschaber wurden nun die Zellen vom Boden gelöst und in kleine Eppendorftuben pipettiert.

Um die Proteine aus der Niere der Mäuse zu gewinnen, wurde ein zuvor bei -80 °C gelagertes Gewebestück in flüssigem Stickstoff gemörsert und dann mit einer RIPA + PIC-Lösung versetzt.

Nach kurzem Vortexen wurden die Eppendorftuben für 30 Minuten auf Eis gelagert und anschließend bei 4 °C für 30 Minuten mit 12000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand mit dem darin enthaltenen Gesamtprotein entnommen und direkt weiter verwendet oder bei -80 °C eingefroren. Die Zelltrümmer am Boden der Eppendorftuben wurden verworfen.

2.7.2 Quantitative Proteinbestimmung

Es wurde eine Bicinchoninsäure-Lösung (BCA) wie vom Hersteller beschrieben vorbereitet. Bei der BCA-Methode wurden Cu^{2+} -Ionen im alkalischen Milieu durch Proteine zu Cu^+ reduziert, welche anschließend violette Komplexe mit BCA bilden [108]. Um die Proteinkonzentration der Proben zu vergleichen, wurde eine Standardreihe mit

acht bekannten Konzentrationen von bovinem Serum Albumin (BSA) (125 µg/ml - 2000 µg/ml) erstellt. Von den Standards und den Proben (1:5 Verdünnung mit Aqua dest) wurden 50 µl in die Löcher einer 96-Lochplatte pipettiert und mit 200 µl der BCA-Lösung aufgefüllt. Die Platte wurde bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert und anschließend die Absorption mit einem Mikroplatten Reader bei 565 nm Wellenlänge gemessen. Anhand der erhaltenen Standardkurve wurden die Proteinkonzentrationen der Proben mit Excel berechnet.

2.7.3 SDS-PAGE

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe wurde das von Laemmli erstmals beschriebene diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)-Verfahren angewandt [109]. Dazu wurden 20 µg Proteine mit Laemmli-Puffer versetzt und bei 95 °C für zehn Minuten aufgekocht und denaturiert. Das anionische Detergens SDS überdeckte die Eigenladungen der Proteine, wodurch eine Linearisierung der Proteine gewährleistet war. Gleiche Probenmengen wurden in die Taschen des 6 %-Sammelgels gegeben, die schon SDS-Laufpuffer enthielten. Das Gel wurde in eine dafür vorgesehene Halterung des Tanks gesteckt und der Stromkreis geschlossen. Unter Anlegen einer konstanten Spannung von 80 V passierten die Proben das Sammelgel. Unter Steigerung der Spannung auf 120 V wurde in 75 Minuten die Bewegung der Proben durch das Trenngel forciert.

2.7.4 Proteintransfer und Immunblot

Der Proteintransfer der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine erfolgte im Tankblotverfahren. Das Gel wurde mit einer in 99 % Methanol aktivierten Nitrocellulosemembran blasenfrei bedeckt und in einem Sandwichaufbau zwischen zwei Schwämmen und Kartonscheiben zusammengehalten. Ein Trans-Blot System der Firma Bio-Rad wurde mit 1 l Blotting Buffer beladen und der Transfer bei konstanten 200 mA über zwei Stunden durchgeführt.

Nach dem Transfer wurde die Membran zehn Minuten in TBS gewaschen und anschließend in TBS-T mit 5 % Magermilchpulver oder 5 % BSA für eine Stunde zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen blockiert. Anschließend wurden, je nach Empfehlung des Herstellers beziehungsweise eigenen Erfahrungswerten, die Primärantikörper hinzugefügt. Eine kleine Box mit der darin enthaltenen Membran und der Antikörperlösung wurde für zwölf Stunden bei 4 °C auf den Schütteltisch gestellt. Danach wurde die Membran dreimal fünf Minuten in TBS-T gewaschen. Anschließend

gab man den Sekundärantikörper in Abhängigkeit der Wirtsspezies des Primärantikörpers in das TBS-T. Die Membran wurde erneut für nun lediglich eine Stunde auf den Schütteltisch gestellt. Danach wurde die Membran erneut dreimalig fünf Minuten in TBS-T gewaschen, um anschließend die Proteinbanden direkt mit Hilfe des Chemilumineszenzverfahrens zu detektieren.

2.7.5 Proteindetektion durch Chemilumineszenz

Bei diesem Verfahren wird eine Enzymreaktion genutzt, welche letztendlich sichtbares Licht generiert. Hierbei wurde das Luminolreagenz in gleichen Teilen zu dem Peroxidreagenz gegeben. Das Luminol oxidiert, nachdem die Peroxidase an den Sekundärantikörper gebunden hat. Durch die Oxidation emittierte Luminol Licht je nach Quantität der Enzymreaktion. Dieses Verfahren hat eine hohe Sensitivität bei gleichzeitig geringer Hintergrundbeleuchtung und unspezifischer Bandendetektion.

2.7.6 Entfernen von Antikörpern von der Membran („Stripping“)

Damit eine weitere Verarbeitung der Membran möglich ist, muss vorerst eine Aufreinigung erfolgen und die bisherigen Antikörper müssen entfernt werden. Diesen Prozess nennt man Stripping. Zur erneuten Detektion von Proteinen mit einem anderen Antikörper auf derselben Membran wurden die Antikörper-Enzym-Komplexe durch Stripping entfernt. Hierzu wurde die Blotmembran in einem Strip-Buffer (Restore Western Blot Stripping Buffer, Pierce) 30 Minuten bei 37 °C geschüttelt und anschließend in TBS gewaschen.

2.8 Histochemische und Immunhistochemische Nachweise

2.8.1 Mayer's Hämatoxylin und PAS-Reaktion

Diese Methode ist zur Detektion von glykogenreichen Geweben wie zum Beispiel Leber- oder Herz- und Skelettmuskel gebräuchlich [110]. Es kann außerdem zur Detektion der diabetischen Glomerulopathie, in deren Verlauf es zur Akkumulation extrazellulärer Matrix und zur nichtenzymatischen Anlagerung von Zuckern an Matrixproteine des Mesangiums kommt [22], genutzt werden. Dies wurde in der hier vorliegenden Arbeit eingesetzt.

Die in Paraffin eingebetteten Schnitte wurden deparaffinisiert und rehydriert. Anschließend wurden die Glykolgruppen zu zwei benachbarten Aldehydgruppen durch 0,5 %ige Periodsäure fünf Minuten oxidiert. Nach einer kurzen Waschung mit destilliertem Wasser wurden die Schnitte 15 Minuten in das Schiffsche Reagenz

gegeben. Die Fuchsin-schweflige Säure bindet an die Aldehydgruppen, wodurch chromogene Eigenschaften entstehen. Nach fünf Minuten Waschen unter fließendem kaltem Leitungswasser wurden die Kerne eine Minute mit Mayer's Haematoxylin gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte dehydriert und mit Mounting Medium und einem Deckglas bedeckt. Glykosylierte Proteine erscheinen unter dem Mikroskop magenta-rot, während sich die Zellkerne blau darstellen.

2.8.2 Fluoreszenzfärbung zur DNA-Markierung.

Um die Kerne beziehungsweise die darin enthaltene DNA fluoreszierend zu färben, wurde der Fluoreszenzfarbstoff H33342 verwendet. Dieser diente als Gegenfärbung in Gewebeschnitten beziehungsweise als spezifische DNA-Färbung in der Zellkultur.

In den *in vitro* Experimenten wuchsen die Zellen auf Deckgläsern. Nach erreichter Konfluenz wurden die Experimente durchgeführt. Die Zellen wurden anschließend 15 Minuten in 4 %iger Paraformaldehydlösung fixiert und die Deckgläser auf den Objektträger gegeben. Anschließend wurden die Zellen mit 2 µl Bisbenzimid (H33342) in zwölf ml PBS für zehn Minuten in einer Dunkelkammer inkubiert. Die Objektträger wurden nun mit Vecta Shield Mounting Medium und einem Deckglas bedeckt. Direkt im Anschluss wurden die Zellkerne mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

2.8.3 Immunhistochemische Färbung

Die entnommenen Nieren aus den Versuchstieren wurden entweder in Paraffin eingebettet beziehungsweise wurden als Gefrierschnitte aufbereitet.

In diesem Abschnitt wird beispielhaft das Vorgehen bei Paraffinschnitten beschrieben. Zuerst wurde das Paraffin bei 56 °C über 30 Minuten aufgeweicht. Einem anschließenden fünfminütigen Bad in Xylol schloss sich die Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe (jeweils zwei Minuten bei 100 %, 95 %, 90 %, 70 %, 50 %, 30 % Alkoholanteil) an. Nachfolgend wurden die Schnitte zwei Minuten unter fließendem Leitungswasser gewaschen.

Um die Antigene den Antikörpern zugänglich zu machen, wurden nun die Schnitte in Antigen-Retrieval-Buffer 30 Minuten gekocht. Quervernetzungen und Methylenbrücken, die durch die Fixierung entstanden waren, wurden durch den hitzevermittelten Antigen Retrieval wieder gebrochen. Die Epitope wurden auf diese Weise wieder frei gelegt. Danach wurden die Schnitte zweimal fünf Minuten in TBS und 0,025 %iger Triton X-100-Lösung gewaschen. Die Objektträger wurden vorsichtig getrocknet. Mit dem DAKO-Pen wurden die Proben optisch umkreist. Um unspezifische Antikörperbindungen zu

minimieren, wurden die Schnitte nun mit einigen Tropfen TBS und 5 %iger BSA-Lösung geblockt. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit den Antikörpern (verdünnt in TBS und 5 %iger BSA-Lösung) für 16 – 20 Stunden bei 4 °C in der Feuchtkammer.

Am zweiten Tag wurden die Schnitte zuerst dreimal fünf Minuten in TBS und 0,025 %iger Triton X-100-Lösung gewaschen. Der fluorochrom-konjugierte Antikörper wurde der Spezies des Primärantikörpers entsprechend in TBS und 5 %iger BSA-Lösung verdünnt und die Schnitte damit für zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte erneut in TBS und 0,025 %iger Triton X-100-Lösung gewaschen. Mit einem Vectashield Mounting Medium (mit DAPI) und mit einem Deckglas wurden die Schnitte blasenfrei bedeckt.

Nach Abschluss war eine Begutachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop oder eine Lagerung in der Feuchtkammer bei 4 °C möglich.

2.8.4 Fluoreszenzmikroskopie

Bei der Fluoreszenzmikroskopie beobachtet man Lichtwellen, die in einer bestimmten Wellenlänge abgestrahlt werden und daher in einer bestimmten Farbe leuchten. In der vorliegenden Arbeit wurden die Fluoreszenzfarbstoffe Rhodamine, Fluoresceinisothiocyanat, Hoechst 33342, und Alexa Fluor® 680 Farbstoff verwendet. Diese wurden an spezifische Primärantikörper gekoppelt und unter einem speziellen Filter betrachtet. Dadurch konnte das Licht der jeweiligen zu untersuchenden Wellenlänge betrachtet werden. Eine Selektion der zu untersuchenden Strukturen kam zur Darstellung. Es wurde ein Olympus CX 41 Mikroskop (Olympus, Japan) genutzt.

2.8.5 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Bei dieser speziellen Form der Mikroskopie wird ein Laser genutzt, der sich im Strahlengang befindet und die Probe abrastert. Das dadurch angeregte Fluoreszenzlicht wird gefiltert und in der Lochblende vom Anregungslicht getrennt. Ein nachgeschalteter Lichtdetektor ist an einen Computer angeschlossen, der aus diesen Informationen Bilder errechnet und sehr scharfe Bilder aus einer ganz bestimmten Ebene des Schnittes darstellt. In dieser Arbeit wurde das Laser Scanning Mikroskop 780 von Zeiss verwendet. Die digitale Verarbeitung wurde mit der von Zeiss ebenfalls zur Verfügung gestellten Software ZEN lite 2011 durchgeführt.

2.9 Statistische Analyse

Alle *in vitro* Experimente wurden in Triplikaten in jeweils drei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Die Daten sind zusammengefasst und dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung. Zur statistischen Analyse wurde ein Einstichproben-t-Test (t-Test), eine einfache Varianzanalyse (ANOVA) und ein Chi-Quadrat-Test (χ^2 -Test) genutzt. Als Statistiksoftware diente Microsoft Excel 2011. Eine statistische Signifikanz wurde, sofern nicht gesondert erwähnt, bei $p < 0,05$ angenommen.

2.10 Software

Als Literaturverwaltungsprogramm wurde EndNote X6 genutzt. Die Arbeit selbst wurde mit dem Textverarbeitungsprogramm Microsoft Word 2011 geschrieben. Um die einzelnen Abbildungen, insbesondere die mikroskopischen Aufnahmen, zu bearbeiten wurde ImageJ-64 und Microsoft PowerPoint 2011 angewandt. Die quantitative Analyse der Western Blots sowie die Berechnung der fractional mesangial area erfolgte mit ImageJ-64 sowie Microsoft Excel 2011. Tabellen, Diagramme und Abbildungen wurden mit Microsoft Excel generiert.

3 Ergebnisse

3.1 Die Aktivierung des Nlrp3-Inflammasoms ist mit dem Auftreten der diabetischen Nephropathie in db/db Mäusen assoziiert

Die in Abbildung 1a zu sehenden histologischen Präparate sind aus Nierenschnitten aus den in Kapitel 2.4.2 beschriebenen Versuchstieren entstanden. Die db/db Mäuse entwickeln ab einem Alter von acht Wochen einen durch die Polyphagie getriggerten zunehmend höheren Blutzuckerspiegel [111]. Links ist ein repräsentatives Glomerulus einer db/m Maus, welche heterozygot für die Mutation im Leptinrezeptor ist und über den gesamten Betrachtungsraum von 20 Wochen einen physiologischen Blutzuckerspiegel aufweist, abgebildet. Rechts ist ein repräsentatives Glomerulus einer 20 Wochen alten db/db Maus mit hohem Blutzuckerspiegel zu sehen. Der Blutzuckerspiegel stieg hier von im Mittel 14,7 mM nach acht Wochen auf 27,4 mM nach 20 Wochen an. Das mesangiale Fraktionsvolumen (entspricht der Zunahme der Extrazellulärmatrix; vermehrte Pinkfärbung) als Zeichen einer bestehenden Glomerulosklerose ist bei einer 20 Wochen alten Maus mit Diabetes Typ 2 erkennbar nachzuweisen.

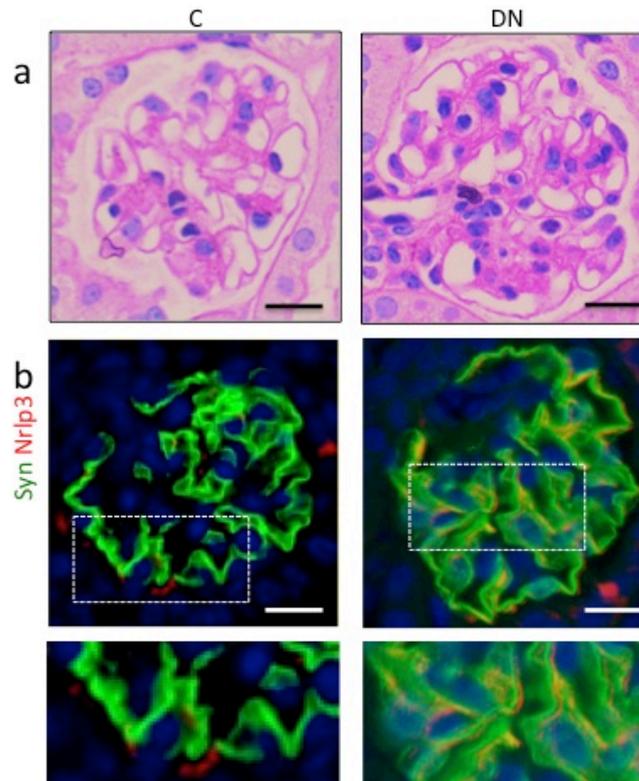


Abbildung 1: Die Aktivierung des Inflammasoms ist mit der diabetischen Nephropathie in db/db Mäusen assoziiert.

a repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen mit PAS-Färbung eines Glomeruli einer 20 Wochen alten db/m Maus (linke Spalte) und einer 20 Wochen alten db/db Maus im (Modell für DM Typ 2) (BKS.Cg-*Dock7^m +/+ Lepr^{db/J}*). Die vermehrte Pinkfärbung (PAS positiv) des Glomeruli der db/db Mäuse stellt die mit der Glomerulosklerose einhergehender Verbreiterung der Extrazellulärmatrix dar. Skalabalken = 20 μ m

b Nlrp3 (nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat pyrin 3 domain; rot) kolokalisiert mit Synaptopodin (grün), einem Marker für Podozyten, in Glomeruli von db/db Mäusen mit diabetischer Nephropathie (rechte Spalte), nicht jedoch in den Glomeruli gesunder 20 Wochen alter db/m Mäuse (linke Spalte) Skalabalken = 20 μ m

b zeigt repräsentative Aufnahmen von Glomeruli mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Zeiss LSM 4 Pascal Mikroskop) und in vergrößerten Arealen (weiß gestrichelt). Gelb repräsentiert die Kolokalisation.

Alle IF-Aufnahmen sind auch mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI; blau) zur Markierung der DNA (Zellkern) gefärbt. C = nicht diabetische Kontrolle; DN = db/db Maus mit diabetischer Nephropathie (mit signifikant erhöhter Mikroalbuminurie)

In Abbildung 1b sind konfokale Laserscanningaufnahmen derselben Versuchstiere zu sehen: Grün ist Synaptopodin als Marker für Podozyten dargestellt, rot erscheint Nlrp3 als Marker des Nlrp3-Inflammasoms. Die Färbung der DNA und damit die Zellkernmarkierung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) ist in blau wiedergegeben. Gelb ist als Kolokalisation von Synaptopodin und Nlrp3 zu sehen. Dies ist insbesondere in der näheren Vergrößerung in 1b rechts unten zu sehen. Dies zeigt, dass das Nlrp3-Inflammasom in den Podozyten der an Diabetes mellitus Typ 2 leidenden Mäuse verstärkt exprimiert wird. In dem Vergleichsschnitt ist eine Kolokalisation nicht zu

sehen. Auch ist die Aktivierung des Nlrp3-Inflammasoms im gesamten Glomerulus quantitativ deutlich stärker ausgeprägt als in den Proben der db/m Mäuse.

3.2 Die Aktivierung des Inflammasoms in Podozyten und Endothelzellen *in vitro*

Um die Aktivierung des Nlrp3-Inflammasoms in der Zellkultur von Podozyten und Endothelzellen zu zeigen, wurden die Podozyten nach den üblichen Bedingungen kultiviert. Es wurden verschiedene Platten der kultivierten Podozyten mit einer Glucoselösung versetzt, so dass die Gesamtkonzentration im Medium 30 mM Glucose betrug. Die Proteingewinnung wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten vorgenommen, so dass die verschiedenen Proben unterschiedlich lange dem Stress der erhöhten Glucosekonzentration ausgesetzt waren. Der Kontrolle wurde Mannitol in gleicher Konzentration zugefügt, um gleiche osmotische Bedingungen zu gewährleisten. Die Proteinexpression wurde mit Hilfe des Western Blot-Verfahrens qualitativ und quantitativ bestimmt. Es entstand eine Zeitkurve, wie sie in Abbildung 2b und 2c sowie in 3b zu sehen ist. Es war ein signifikanter Anstieg der Nlrp3-Aktivierung (Abb. 2a) nach 30 Minuten sowie eine signifikant erhöhte cleaved Caspase1 (cl-Casp1)-Konzentration (Abb. 2a) nach einer Stunde zu verzeichnen. Nach einer Phase der Konsolidierung stiegen die Mengen von Nlrp3 und cl-Casp1 erneut an, so dass nach 24 h die höchste Konzentration der Proteine Nlrp3 und cl-Casp1 verzeichnet wurde. Dass sich beide Proteine in etwa kongruent verhielten, war zu erwarten, da die Nlrp3-Aktivierung und damit die Spaltung des Proteins ebenfalls mit einer Aktivierung der Caspase1 assoziiert ist [112]. Die detektierten Banden wurden auf die β -Actin-Konzentration normalisiert, um quantitative Unterschiede der Proteingesamtkonzentration auszugleichen.

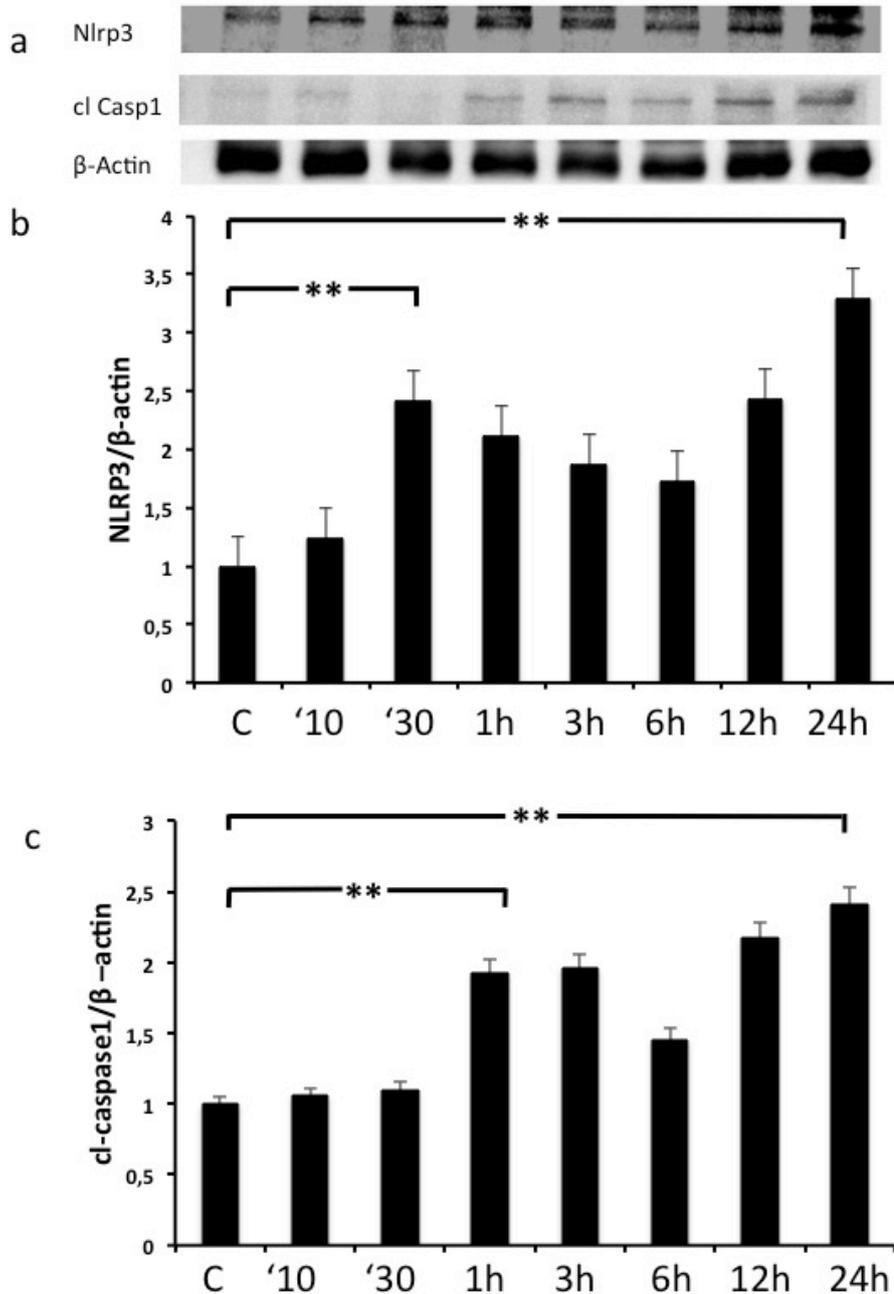


Abbildung 2: Das Nlrp3-Inflammasom wird in vitro in mit Glucose gestressten Podozyten aktiviert
a Die quantitative Nlrp3-Expression (erste Zeile) steigt in mit Glucose (30 mM) gestressten Podozyten an. Auch die cleaved Caspase1-Level (zweite Zeile) steigen an. Die verschiedenen Banden stellen steigende Glucoseinkubationszeiten (von links nach rechts, siehe b) dar. In der dritten Zeile ist β -Actin zur Ladungskontrolle (Diagramme in b und c sind Actin korrigiert) dargestellt.
b Die Nlrp3-Expression in vitro nimmt mit zunehmender Inkubationszeit der Podozyten mit Glucose (30mM) zu. Nach 24 h ist die Nlrp3-Expression auf das ca. 3,3-fache im Vergleich zu Podozyten, die lediglich normoglykämischen Verhältnissen (Glucose 4,5 mM) exponiert waren. ** $p < 0,01$
c Die Aktivierung von cleaved Caspase1 steigt ebenfalls mit zunehmender Inkubationsdauer mit Glucose (30 mM). Nach 24 h ist die cleaved Caspase1-Aktivierung um das ca. 2,4-fache angestiegen; Alle Versuche wurden dreifach in drei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichung; statistische Analyse: t-Test; ** $p < 0,01$

In Endothelzellen konnte unter dem Einfluss einer erhöhten Glucosekonzentration (30 mM im Medium) ebenfalls eine erhöhte Nlrp3-Expression detektiert werden. Wie bei

den Podozyten konnte auch hier bereits nach 30 Minuten ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zur mit Mannitol versetzten Kontrolle festgestellt werden. Über die weiteren verschiedenen Zeitpunkte nahm auch hier die Nlrp3-Expression nach einer vorübergehenden Konsolidierung bis zum Endpunkt nach 24 Stunden zu. Die Abbildungen 2 und 3 zeigen, dass die Aktivierung des Nlrp3-Inflammasoms *in vitro* unter einer erhöhten Glucosekonzentration (30 mM) induziert werden kann.

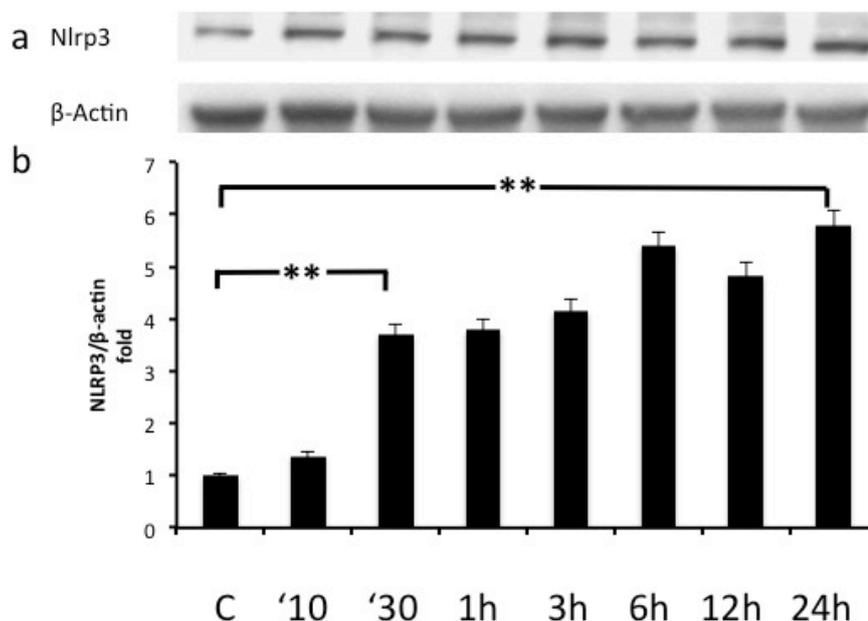


Abbildung 3: Das Nlrp3-Inflammasom wird *in vitro* in mit Glucose gestressten Endothelzellen aktiviert

a Nlrp3-Level (erste Zeile) in mit 30 mM Glucose gestressten Endothelzellen steigen an. Die verschiedenen Banden stellen steigende Glucoseinkubationszeiten (von rechts nach links, siehe b) dar. In der zweiten Zeile ist β -Actin zur Ladungskontrolle (Diagramm in b ist β -Actin korrigiert) dargestellt.

b Die Nlrp3-Expression *in vitro* nimmt mit zunehmender Inkubationszeit der Endothelzellen mit Glucose (30 mM) zu. Nach 24 Stunden ist die Nlrp3-Expression auf das ca. 5,8-fache im Vergleich zum physiologischen Blutzuckerspiegel angestiegen. Alle Versuche wurden dreifach in drei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichung; statistische Analyse: t-Test; ** $p < 0,01$

3.3 Die Aktivierung des Nlrp3-Inflammasoms bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2

In konfokalen Laserscanningaufnahmen menschlicher Glomeruli (Abbildung 4a) ist die Kolokalisation (gelb) von Nlrp3 und Podozyten nachweisbar. Synaptopodin (grün), Nlrp3 (rot) und Markierung der DNA zur Zellkernmarkierung mit 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI; blau) sind durch Immunfluoreszenzmarkierung zu erkennen. Die Kolokalisation (gelb) ist sowohl in der Übersicht als auch in der Vergrößerung des relevanten Ausschnittes deutlich zu sehen. Dies zeigt, dass in den menschlichen

Podozyten in Glomeruli von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 mit diabetischer Nephropathie das Nlrp3-Inflammasom stärker ausgeprägt und zudem in den Podozyten lokalisiert ist (Abb. 4a rechts).

Bei einem diabetischen Patienten ohne diabetische Nephropathie (Abb. 4a links) ist Nlrp3 weniger stark exprimiert und kolokalisiert nicht mit den Podozyten.

Die Nlrp3-Expression ist in Glomeruli eines nicht diabetischen Patienten fast gar nicht nachzuweisen (Abb. 4b links, „C“). Bei an Diabetes mellitus Typ 2 erkrankten Menschen ohne diabetische Nephropathie ist sie nicht signifikant stärker ausgeprägt als bei gesunden Menschen. Bei einem Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und diabetischer Nephropathie ist die Nlrp3-Expression signifikant stärker ausgeprägt. Nlrp3 ist auch hier rot eingefärbt, DAPI dient der Markierung der DNA.

Die optische Dichte einzelner Stichproben der drei Gruppen gesunder Patienten und Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 mit bzw. ohne diabetischer Nephropathie wurden mit ImageJ64 berechnet und in einem Streudiagramm mit willkürlichen Einheiten dargestellt. Der signifikante Unterschied zwischen Patienten mit diabetischer Nephropathie und der beiden anderen Gruppen (gesunden Kontrollen, C, und diabetische Patienten ohne diabetische Nephropathie) ist somit klar darzustellen. (Abb. 4c)

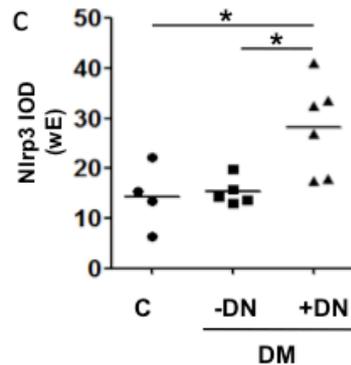


Abbildung 4 c: Die Aktivierung des Inflammasoms ist mit der diabetischen Nephropathie bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 assoziiert.

c Das Streudiagramm zeigt die einzelnen Datenpunkte der Integrierten optischen Dichte (IOD); die horizontale Linie markiert den Mittelwert; * $p < 0,05$; wE: willkürliche Einheiten

3.4 Die Aktivierung des Inflammasoms erfolgt insbesondere in ortsständigen Zellen des Glomeruli bei diabetischer Nephropathie

Ob das Nlrp3-Inflammasom im Rahmen der diabetischen Nephropathie in Zellen der Glomeruli auftritt und mit welcher Bedeutung es aktiv ist, ist bisher nicht untersucht. Um zu zeigen, dass das Nlrp3-Inflammasom in ortsständigen Zellen der Niere exprimiert wird, wurden mit Hilfe der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie Proben menschlicher Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und bestehender diabetischer Nephropathie sowie Proben von db/db Mäusen untersucht. Als ortsständige Zellen des Nierenkörperchens wurden Podozyten und dort vorhandene Endothelzellen betrachtet. Es ist deutlich zu sehen, dass Nlrp3 mit Synaptopodin (einem Marker für Podozyten) kolokalisiert (Abb. 5a, links). Dies beweist, dass das Inflammasom in den Podozyten aktiviert ist. Auch in den Endothelzellen scheint das Inflammasom aktiviert zu sein, was die Kolokalisation von Nlrp3 und Pecam1 (einem Marker für Endothelzellen; Abb. 5a rechts;) nahelegt. Die Nlrp3-Inflammasomaktivierung scheint in den Podozyten stärker als in den Endothelzellen zu sein.

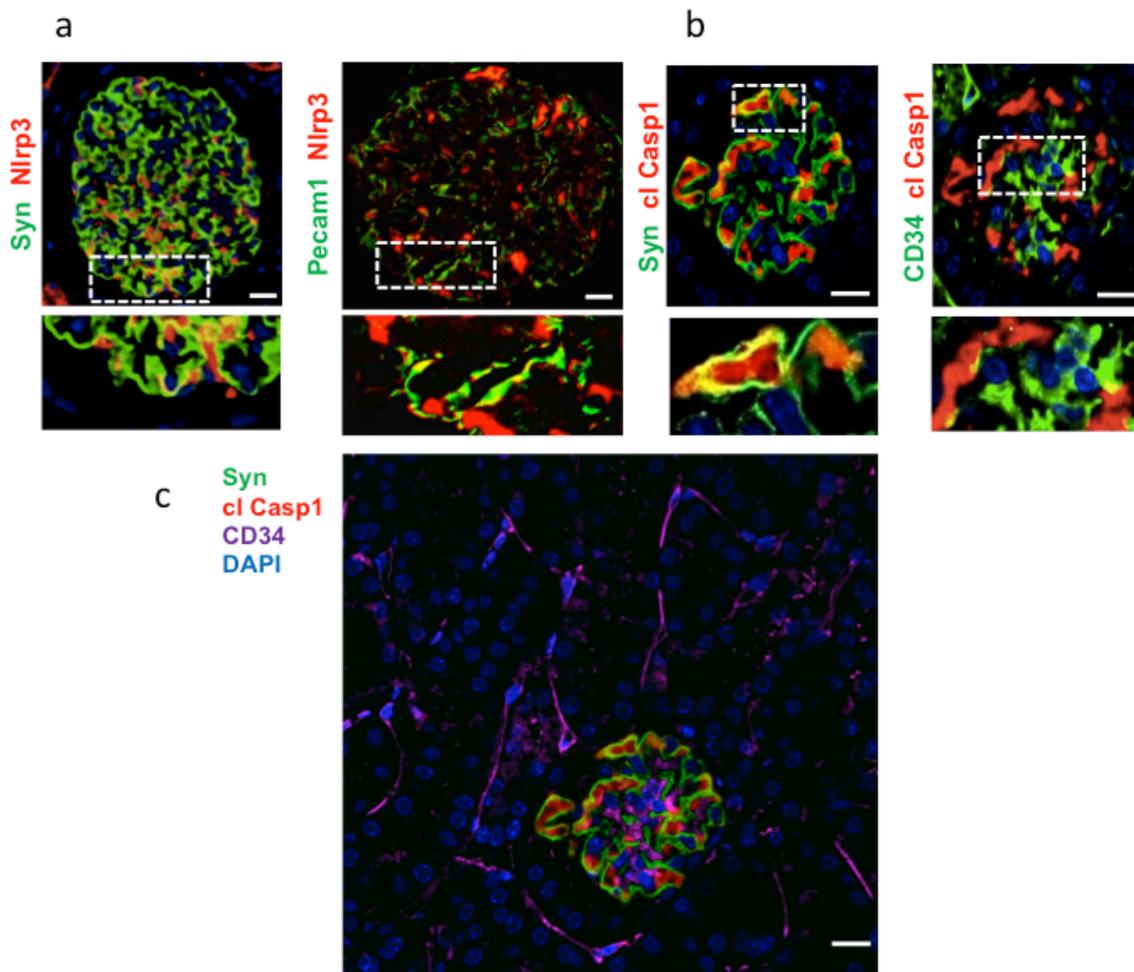


Abbildung 5: Die Aktivierung des Inflammasoms in den ortsständigen Zellen des Glomeruli bei diabetischer Nephropathie.

a Nlrp3 (nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat pyrin 2 domain; rot) kolokalisiert (gelb) mit Synaptopodin (grün, links), einem Marker für Podozyten und PECAM (grün, rechts), einem Marker für Endothelzellen in menschlichen Glomeruli mikroalbuminurischer Patienten mit diabetischer Nephropathie. Skalabalken = 20 µm.

b In den Glomeruli 20 Wochen alter db/db Mäusen kolokalisiert cleaved Caspase 1 (rot) mit Synaptopodin, einem Marker für Podozyten (grün, links) und CD34, einem Marker für Endothelzellen (grün, rechts). Skalabalken = 20 µm.

c Hier ist eine konfokale Laserscanningaufnahme eines Glomeruli und seiner unmittelbaren Umgebung zu sehen. Synaptopodin als Podozytenmarker (grün) CD34 als Endothelzellmarker (pink) und cleaved Caspase 1 (rot) sind in einer Abbildung dargestellt. cleaved Caspase 1 ist überwiegend im Glomerulus lokalisiert. Man beachte die Kapillaren (Endothelzellen; CD34 (pink)). Skalabalken = 20 µm

Abbildung 5 zeigt repräsentative Aufnahmen von Glomeruli mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Zeiss LSM 4 Pascal Mikroskop, Carl Zeiss, Jena, Germany) und vergrößerte Areale, welche weiß gestrichelt markiert sind. Gelb repräsentiert die Kolokalisation. Die Aufnahmen sind mit 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI; blau) zur Markierung der DNA (Zellkern) gefärbt.

Auch in Glomeruli von db/db Mäusen ist das Nlrp3-Inflammasom aktiviert. Hier wurde die Aktivierung von cleaved Caspase1, einer Effektorcaspase des Nlrp3-Inflammasoms, untersucht und eine Kolo-kalisation von cl-Casp1 mit dem Podozytenmarker Synaptopodin detektiert (Abb. 5b, links). Um die Aktivierung des Nlrp3-Inflammasoms in Endothelzellen zu untersuchen, wurde CD34 als Markierung für Endothelzellen gewählt. Auch hier zeigte sich (Abb. 5b rechts) eine Kolo-kalisation mit der Effektorcaspase cleaved Caspase1, womit das Auftreten des Nlrp3-Inflammasoms in Endothelzellen des Glomeruli von mikroalbuminurischen db/db Mäusen aufgezeigt werden kann. Die Aktivierung des Inflammasoms ist auch hier in den Podozyten ausgeprägter, was in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der menschlichen Glomeruli ist.

Um das Auftreten des Nlrp3-Inflammasoms in der kompletten Nierenrinde zu untersuchen, wurden die Schnitte der Nieren systematisch betrachtet. Überraschenderweise ist die Aktivierung des Nlrp3-Inflammasoms innerhalb des Glomeruli am ausgeprägtesten. Abbildung 5c zeigt die Umgebung eines Glomeruli, auf dem zusätzlich Tubuli und Kapillaren in der Peripherie zu sehen sind. Nlrp3 (rot) ist fast ausschließlich auf den Glomerulus beschränkt. CD34 (pink) als Endothelzellmarker ist innerhalb des Glomeruli und auch außerhalb in der Peripherie zu sehen, hier markiert es Kapillaren entlang der Tubuli. Synaptopodin (grün) als Marker der Podozyten ist ausschließlich innerhalb des Glomeruli zu erkennen. Somit kommt es zu einer Aktivierung des Inflammasoms überwiegend in den Glomeruli während der frühen Phasen der diabetischen Nephropathie, die das Mausmodell widerspiegelt.

3.5 Anakinra schwächt das Fortschreiten der diabetischen Nephropathie ab und macht sie rückgängig

Um einen möglichen Angriffspunkt im Fortschreiten und in der Entstehungsphase der diabetischen Nephropathie aufzudecken, wurden db/db Mäuse mit Anakinra behandelt. Anakinra ist ein aus der Behandlung von Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises bekanntes Medikament, welches als Antagonist am IL-1-Rezeptor wirkt [113]. IL-1 wird durch das Nlrp3-Inflammasom aktiviert. Die hyperglykämischen db/db Mäuse mit peripherer Insulinresistenz reagierten signifikant mit einer Abnahme der Albuminurie auf die Behandlung mit Anakinra. Die Entstehung der diabetischen Nephropathie, gekennzeichnet durch ein signifikant höheres mesangiales Expansionsvolumen und erhöhte Albuminausscheidung, konnte verhindert werden. Zur

Veranschaulichung sind hier repräsentative Glomeruli heterozygoter db/m Mäuse und homozygoter diabetischen db/db Mäuse mit und zum Vergleich ohne Behandlung mit Anakinra nebeneinander dargestellt (Abb. 6). Hier zeigt sich, dass sowohl die Albuminausscheidung (Albumin-Kreatinin-Quotient 187 $\mu\text{g}/\text{mg}$ vs. 1026 $\mu\text{g}/\text{mg}$) als auch die extrazelluläre Matrix (FMA 14,8 % vs. 24,5 %) bei den mit Anakinra behandelten db/db Mäusen signifikant niedriger ist. In einem anderen Versuchsaufbau wurden zwölf Wochen alte db/db Mäuse, die bereits Zeichen einer diabetischen Nephropathie entwickelt haben, über einen Zeitraum von acht Wochen täglich mit Anakinra behandelt (Abb. 6b). In Übereinstimmung mit den Daten aus Abb. 6a konnte auch hier das mesangiale Expansionsvolumen (FMA 11,6 % vs. 28,3 %) und die Albuminurie (Albumin-Kreatinin-Quotient 313 $\mu\text{g}/\text{mg}$ vs. 1108 $\mu\text{g}/\text{mg}$) unter der Behandlung mit dem IL-1-Rezeptorantagonisten signifikant ($p < 0,05$) gesenkt werden. Auch hier dienten heterozygote normoglykämische db/m Mäuse als Kontrolle. Das deutet darauf hin, dass frühe Stadien der diabetischen Nephropathie durch eine Inhibition des Inflammasoms geheilt werden können. Es konnte zudem gezeigt werden, dass in den mit Anakinra über zwölf Wochen behandelten db/db Mäusen das Körpergewicht (26 g vs. 46 g) und die Blutglucosekonzentration (19,8 mM vs. 32,5 mM) im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant niedriger ist (Abb. 8a). Bei den über acht Wochen mit Anakinra behandelten Mäusen konnte kein signifikanter Unterschied der Blutglucosekonzentration bzw. des Körpergewichts im Vergleich zur unbehandelten Gruppe festgestellt werden (Abb. 8b).

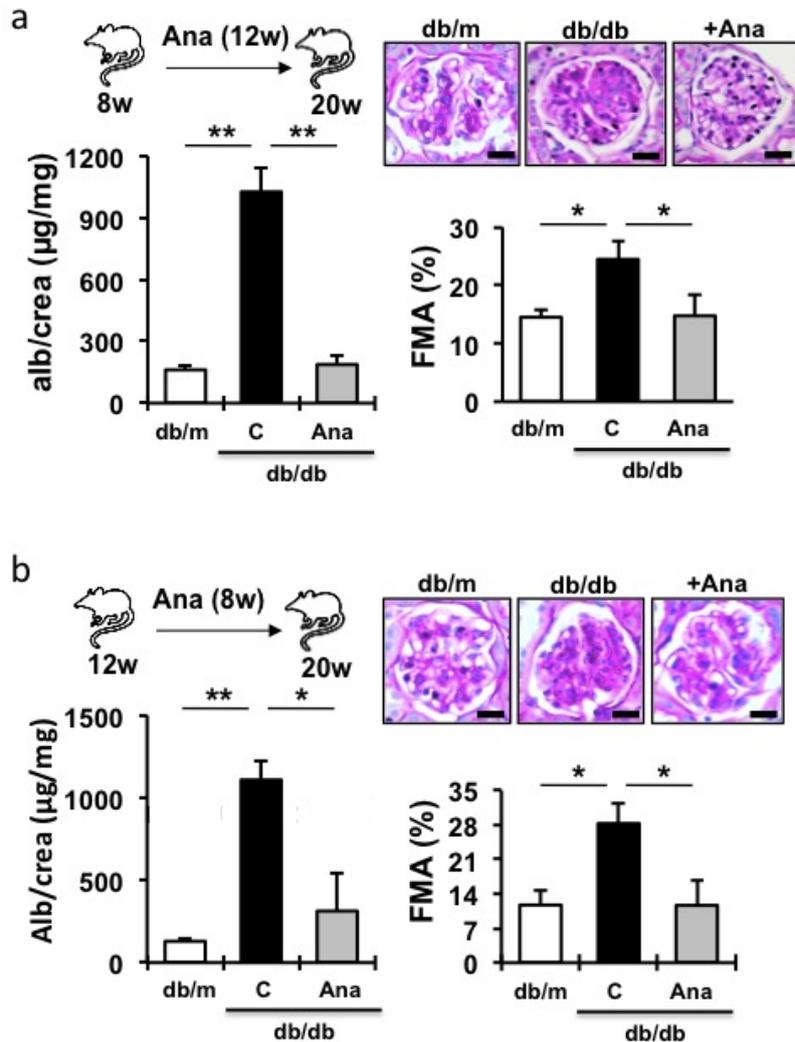


Abbildung 6: Die Hemmung des Inflammasoms mit Anakinra (Ana) schwächt das Fortschreiten der Diabetischen Nephropathie ab bzw. macht es rückgängig

a Die Behandlung von acht Wochen alten db/db Mäusen (db/db) mit Anakinra (+Ana) über einen Zeitraum von zwölf Wochen schwächt die Albuminausscheidung (Alb) signifikant ab. Auch die Extrazellulärmatrix (FMA = fractional mesangial area) nimmt hier in den mit Anakinra behandelten Mäusen ab. Gezeigt sind repräsentative Glomeruli der drei Gruppen, gefärbt mit der PAS-Reaktion. Als Kontrolle dienten nichtdiabetische Mäuse (db/m) Skalabalken = 20 µm. Die dazugehörigen Tabellen veranschaulichen die quantitative Albuminausscheidung bezogen auf das Kreatinin. Weiterhin ist die quantitative Ausprägung der Extrazellulärmatrix (FMA = fractional mesangial area) dargestellt.

b Die Behandlung von zwölf Wochen alten db/db Mäusen (db/db) mit Anakinra (+Ana) über einen Zeitraum von acht Wochen macht die dann schon bestehende diabetische Nephropathie teilweise rückgängig. Gezeigt sind repräsentative Glomeruli der drei Gruppen, gefärbt nach HE und mit der PAS-Reaktion. Skalabalken = 20 µm * p < 0,05; **p < 0,01. Die dazugehörigen Tabellen veranschaulichen die quantitative Albuminausscheidung bezogen auf das Kreatinin. Weiterhin ist die quantitative Ausprägung der Extrazellulärmatrix (FMA = fractional mesangial area) dargestellt.

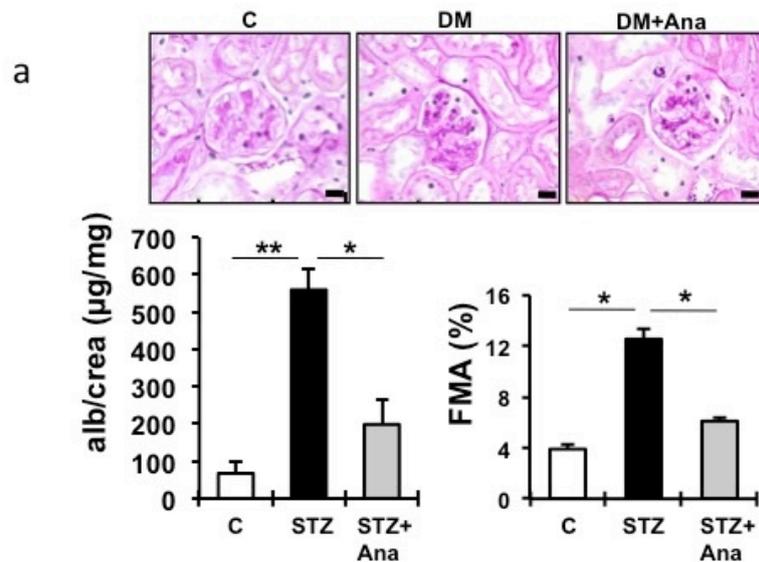


Abbildung 7: Die Hemmung des Inflammasoms mit Anakinra (Ana) schwächt das Fortschreiten der Diabetischen Nephropathie im Mausmodell für Diabetes mellitus Typ 1 mit absolutem Insulinmangel ab

a Die Mäuse wurden einseitig nephrektomiert und anschließend der absolute Insulinmangel durch Streptozotocin (STZ) induziert und damit eine diabetische Stoffwechsellage hergestellt (DM). Die Behandlung mit Anakinra (DM+Ana) verhindert eine signifikante Zunahme der Albuminexkretion und der Zunahme der Extrazellulärmatrix. Gezeigt sind repräsentative Glomeruli der drei Gruppen. (C) stellt die gesunde normoglykämische Kontrolle dar. Die Proben sind mit der PAS-Reaktion gefärbt. Skalabalken = 20 µm * $p < 0.05$; ** $p < 0,01$. Die dazugehörigen Tabellen veranschaulichen die quantitative Albuminausscheidung bezogen auf das Kreatinin. Weiterhin ist die quantitative Ausprägung der Extrazellulärmatrix (FMA = fractional mesangial area) dargestellt.

Im mit Streptozotocin induzierten Mausmodell für Diabetes mellitus Typ 1 wurden analog zu dem Versuchsaufbau bei den oben genannten db/db Mäusen Versuche an den C57BL/6-Mäusen durchgeführt (Abb. 7). Die Albuminausscheidung nahm hier bei den diabetischen Mäusen im Vergleich zu den unbehandelten Wildtypmäusen rasch zu. Es konnte am Endpunkt nach acht Wochen eine signifikant höhere Albuminausscheidung und ein Fortschreiten der Glomerulosklerose gemessen am mesangialen Expansionsvolumen (FMA = fractional mesangial area) der diabetischen im Vergleich zur normoglykämischen Gruppe diagnostiziert werden. Auch hier zeigte sich die Behandlung mit Anakinra erfolgreich. Sowohl die Albuminausscheidung (Albumin-Kreatinin-Quotient 198 µg/mg vs. 559 µg/mg) als auch das mesangiale Expansionsvolumen (FMA 11,7 % vs. 28,3 %) sind in der behandelten Gruppe signifikant niedriger. Der Blutzuckerspiegel (BZ 28 mM vs. 29,2 mM) unterschied sich in der mit Anakinra behandelten Gruppe ebenso wenig wie das Körpergewicht (23,2 g KG vs. 23 g KG).

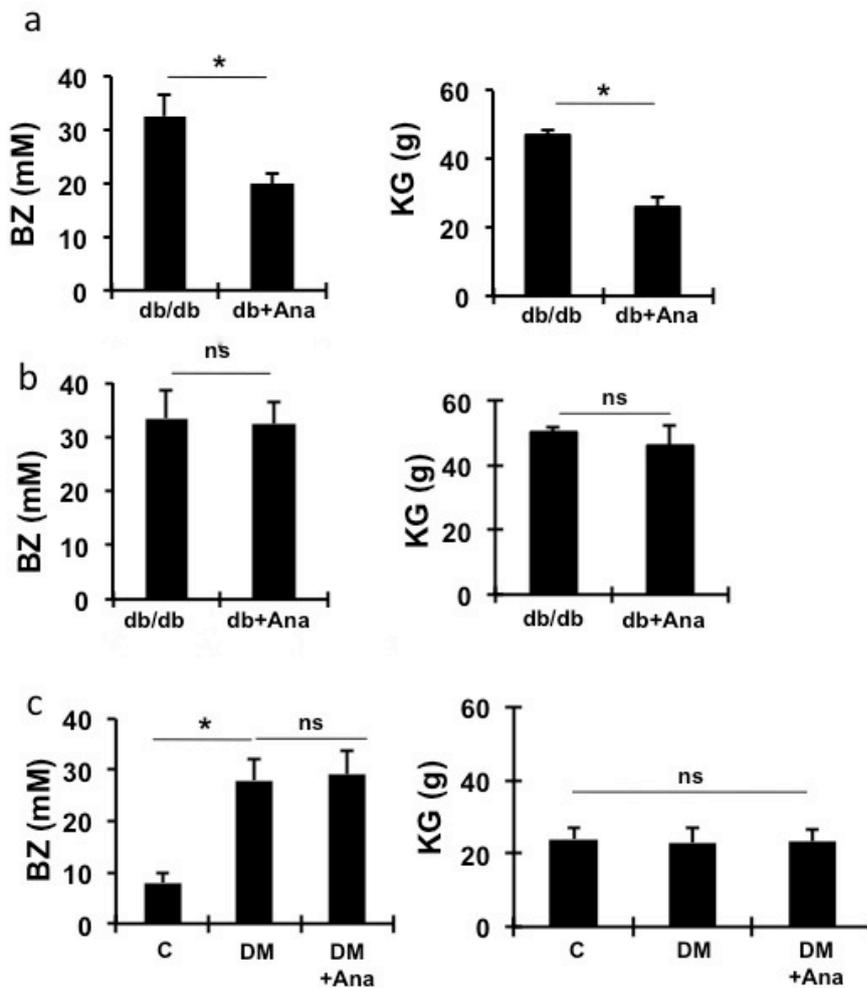


Abbildung 8: Blutzuckerspiegel und Körpergewicht von diabetischen Mäusen mit und ohne Behandlung mit Anakinra

a Die Behandlung mit Anakinra von acht Wochen alten db/db Mäusen über zwölf Wochen senkt sowohl den Blutzuckerspiegel (BZ) als auch das Körpergewicht (KG) signifikant.

b Bei bestehender diabetischer Nephropathie bei zwölf Wochen alten db/db Mäusen senkte eine Behandlung mit Anakinra über acht Wochen den Blutzuckerspiegel wie auch das Körpergewicht nicht signifikant.

c Im diabetischen STZ-Mausmodell (DM) mit absolutem Insulinmangel (Mausmodell für Diabetes mellitus Typ 2) kann ein signifikanter Anstieg des Blutzuckerspiegels im Vergleich zur Kontrolle (C) detektiert werden. Eine achtwöchige Behandlung mit Anakinra hat keinen signifikanten Einfluss auf den Blutzuckerspiegel. Das Körpergewicht ist bei allen drei Gruppen gleich. * $p < 0.05$; ns = nicht signifikant; BZ = Blutzuckerspiegel; KG = Körpergewicht; db/db = Mausmodell Diabetes mellitus Typ 2; C = Wildtypmaus; DM = Mausmodell für Diabetes mellitus Typ 1

3.6 Minocyclin reduziert die Aktivierung von cleaved Caspase1 in Glomeruli von db/db Mäusen

Minocyclin ist ein gut etabliertes Antibiotikum aus der Gruppe der Tetracykline. Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der Signalkaskade über den Inflammasom-Caspase1-Komplex und die anschließende Aktivierung von IL-1 β bei

diabetesassoziierten Folgeerkrankungen wie der diabetischen Retinopathie erfolgen kann [114]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Hemmung des Inflammasoms durch Minocyclin und die Verringerung der quantitativen Aktivierung der cleaved Caspase1 auch bei der diabetischen Nephropathie eine Rolle spielen kann.

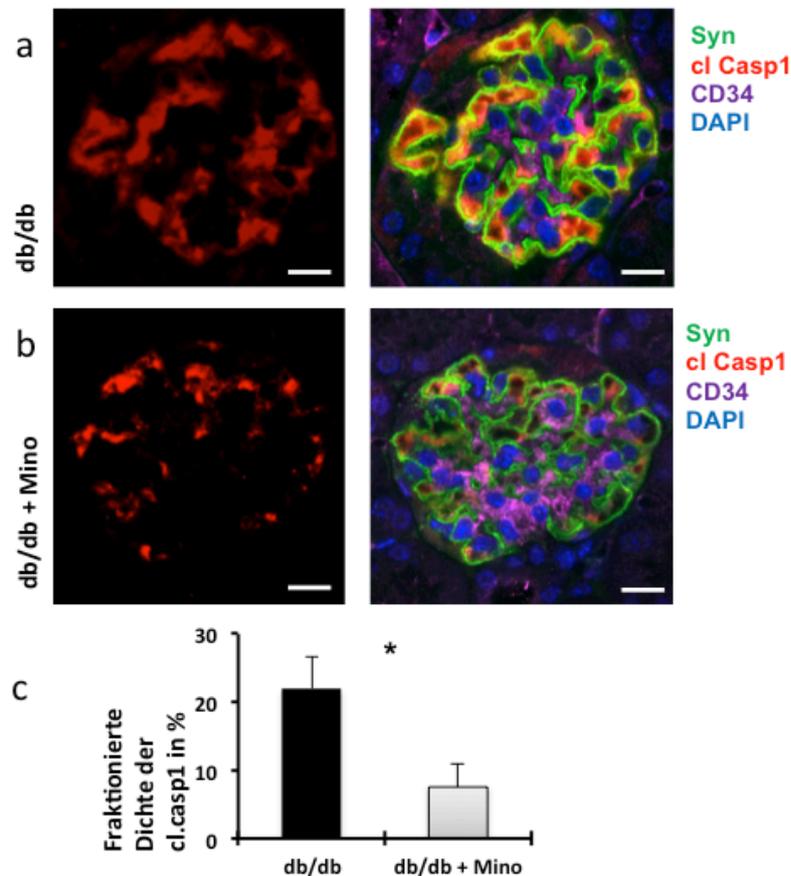


Abbildung 9: Minocyclin reduziert die Aktivierung von cleaved Caspase1 in db/db Mäusen

a Cleaved Caspase1, eine Effektorcaspase des Inflammasoms, kolokalisiert (gelb) mit Synaptopodin (grün), einem Marker für Podozyten beziehungsweise CD34 (pink), einem Marker für Endothelzellen in Glomeruli 20 Wochen alter db/db Mäuse mit diabetischer Nephropathie. Skalabalken 20 = μm .

b In den Glomeruli 20 Wochen alter db/db Mäuse, die über zwölf Wochen mit Minocyclin behandelt wurden, ist cleaved Caspase1 (rot) quantitativ im Glomerulus deutlich weniger vorhanden und auch sichtbar weniger mit Podozyten bzw. Endothelzellen kolokalisiert. Skalabalken = 20 μm .

c Es wurden die Pixel, welche in Abb. 9a und 9b die cleaved Caspase1 rot darstellen, in ein binäres Bild überführt. Die Anzahl der Pixel wurde auf die Fläche des Glomeruli bezogen und graphisch in Prozent und der jeweiligen Standardabweichung dargestellt. Links ist die Pixelanzahl für die cleaved Caspase1 in 20 Wochen alten db/db Mäusen dargestellt, rechts die von db/db Mäusen welche mit Minocyclin behandelt wurden. * $p < 0,05$;

Abbildung 9a, 9b zeigt repräsentative Aufnahmen von Glomeruli mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Zeiss LSM 4 Pascal Mikroskop, Carl Zeiss, Jena, Germany) Gelb repräsentiert die Kolokalisation. Die Aufnahmen der rechten Spalte sind mit 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI; blau) zur Markierung der DNA (Zellkern) gefärbt.

Hierzu wurden db/db Mäuse über einen Zeitraum von zwölf Wochen täglich mit Minocyclin behandelt. In konfokalen Laser Scanning-Aufnahmen der Nierenrinde ist nun zu sehen, dass die Signalintensität für einen spezifischen Antikörper gegen cleaved Caspase1 bei der mit Minocyclin behandelten Gruppe deutlich geringer ist (Abb. 9b). Die Kolokalisation von cleaved Caspase1 und CD34, einem Endothelzellmarker, war in der mit Minocyclin behandelten Gruppe so gut wie nicht nachweisbar. Es ist daher davon auszugehen, dass das Nlrp3-Inflammasom und damit die Bildung von cleaved Caspase1 und der damit verbundenen Bildung von IL-1 β durch Minocyclin in den Endothelzellen bei diabetischer Nephropathie effektiv gehemmt werden kann. Auch ist die Kolokalisation von cleaved Caspase1 und Synaptopodin, einem Marker für Podozyten, deutlich schwächer detektierbar (Abb. 9b).

Um diesen Unterschied zu quantifizieren, wurde aus der primären Bilddatei ein binäres Bild erstellt, indem jedem Pixel, welche die cleaved Caspase1 in Abbildung 9 rot darstellen, einem schwarzen Bildpunkt zugeordnet wurden. Alle anderen wurden in einem Schwarzweißbild weiß dargestellt, so konnte die Intensität berechnet werden. Die Pixeldichte wurde mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ64 berechnet und in Abb. 9c graphisch dargestellt. Hierbei zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen: Während bei den db/db Mäusen ohne Behandlung eine Pixeldichte von 22 % berechnet wurde, sind es bei den db/db Mäusen nur 7,5 %. Die Kalkulationen wurden jeweils auf die Flächen der Glomeruli bezogen.

3.7 Die diabetische Nephropathie determinierende Parameter werden durch Minocyclin entscheidend beeinflusst

Es wurden drei verschiedene Gruppen von Mäuse beobachtet: heterozygote db/m Mäuse, homozygote db/db Mäuse und db/db Mäuse, welche von einem Alter von acht Wochen bis zu einem Alter von 20 Wochen mit Minocyclin behandelt wurden. In Abb. 10a sind lichtmikroskopische Aufnahmen repräsentativer Glomeruli der drei Gruppen dargestellt. Während in der db/m Gruppe (links) das mesangiale Expansionsvolumen wesentlich schwächer als bei der db/db Gruppe (Mitte) ausgeprägt ist, wird dies bei der mit Minocyclin behandelten db/db Gruppe (rechts) deutlich verringert. Dies ist an der signifikant geringer ausgeprägten Pinkfärbung in der mit Minocyclin behandelten db/db Gruppe zu sehen. Der Eindruck der lichtmikroskopischen Aufnahme lässt sich auch in der Berechnung des mesangialen Expansionsvolumen quantifizieren. Die FMA

(fractional mesangial Area) wurde bei der db/m Gruppe mit 12,2 %, bei der db/db Gruppe mit 33 % und bei der db/db Gruppe, die mit Minocyclin behandelt wurde, mit 14,2 % berechnet. Es konnte ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) sowohl zwischen db/db und db/m, als auch zwischen db/db+Minocyclin festgelegt werden. (FMA 33 % vs. 14,2 %). Die Albuminurie bezogen auf die Kreatininexkretion (alb/crea = Albumin-Kreatinin-Quotient) wurde ebenfalls in allen drei Gruppen im über 24 Stunden gesammelten Spontanurin bestimmt. Bei den db/m Mäusen ergab sich im Mittel ein Albumin-Kreatinin-Quotient (ALBUKREA-H) von 161 $\mu\text{g}/\text{mg}$. Bei den db/db Mäusen wurde ein durchschnittlicher ALBUKREA-H von 1050 $\mu\text{g}/\text{mg}$ gemessen. Bei den db/db Mäusen welche mit Minocyclin behandelt wurden, konnten im Mittel ein Albumin-Kreatinin-Quotient von 386 $\mu\text{g}/\text{mg}$ gemessen werden. Es konnte auch hier mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ ein signifikanter Unterschied zwischen den db/db Mäusen und derjenigen Gruppe, die mit Minocyclin behandelt wurde, festgestellt werden.

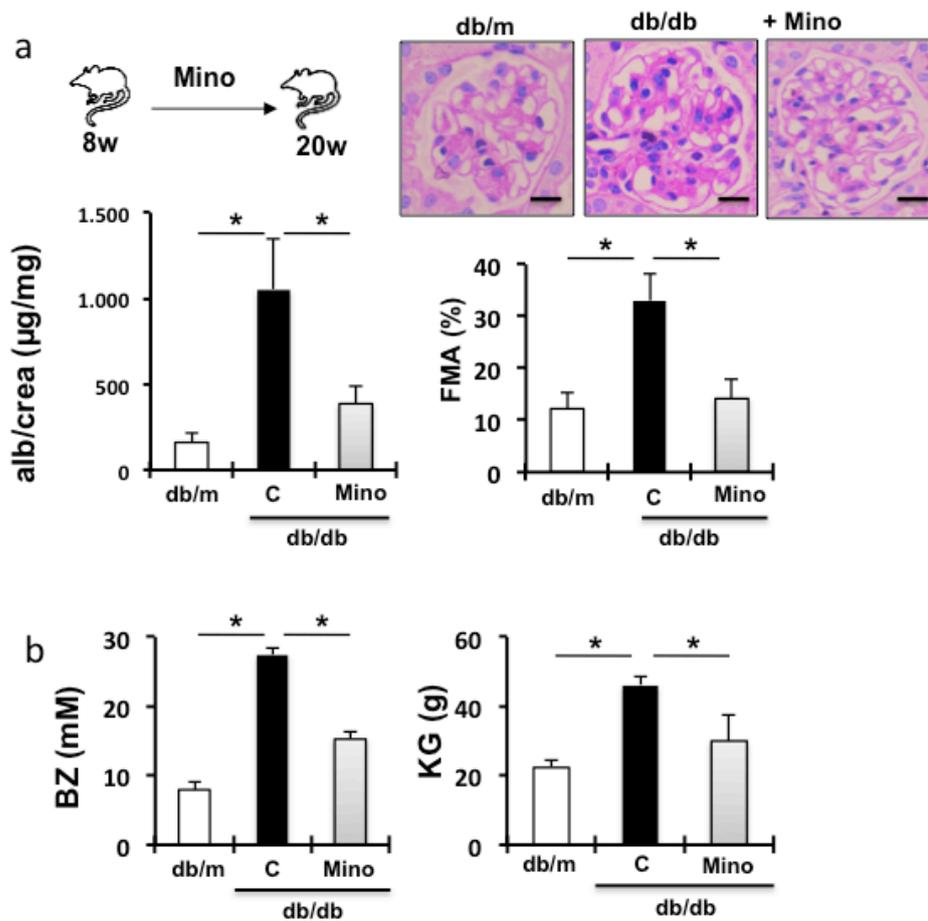


Abbildung 10: Mit Minocyclin behandelte db/db Mäuse weisen signifikant niedrigere Parameter der diabetischen Nephropathie auf.

a Die Behandlung von acht Wochen alten db/db Mäusen (db/db) mit Minocyclin (Mino) über einen Zeitraum von zwölf Wochen schwächt die Albuminausscheidung (Alb/crea; links oben) signifikant ab. Auch das mesangiale Expansionsvolumen (FMA = fractional mesangial area) ist in der mit Minocyclin behandelten Gruppe niedriger (rechts oben). Gezeigt sind repräsentative Glomeruli der drei Gruppen, gefärbt nach HE und mit der PAS-Reaktion. Als Kontrolle dienten nichtdiabetische Mäuse (db/m); Skalabalken = 20 µm

b Die Behandlung der db/db Mäuse mit Minocyclin über einen Zeitraum von zwölf Wochen bewirkte, dass dann ein signifikant niedriger Blutzuckerspiegel (links) gemessen werden konnte. Auch das Körpergewicht war in der mit Minocyclin behandelten Gruppe niedriger. Skalabalken = 20 µm; * p < 0.05; **p < 0,01. BZ = Blutzuckerspiegel; KG = Körpergewicht; db/m = Wildtypmaus;

Über den kompletten Beobachtungszeitraum wurden regelmäßige Blutzuckermessungen (Abb. 10b links) durchgeführt. Dabei fiel auf, dass der Blutzuckerspiegel in der mit Minocyclin behandelten Gruppe der db/db Mäuse deutlich niedriger (15,25 mM vs. 27,38 mM) war als in der db/db Gruppe. Dies konnte nach 16 Wochen (8 Wochen Behandlung mit Minocyclin) und 20 Wochen (zwölf Wochen Behandlung mit Minocyclin) festgestellt werden.

Parallel dazu wurden immer auch Gewichtskontrollen aller Mäuse durchgeführt. Wie zu erwarten nahm das Körpergewicht bei den homozygoten db/db Mäusen schnell zu, so dass ab einem Alter von acht Wochen ein deutlicher Unterschied im Vergleich zu der heterozygoten db/m Gruppe festgestellt werden konnte. In Abb. 10b ist rechts das mittlere Körpergewicht dargestellt. Hier zeigte sich, dass die db/db Gruppe, welche mit Minocyclin behandelt wurde, ein signifikant niedrigeres Körpergewicht (30 g vs. 44,9 g) als die Gruppe der unbehandelten db/db Mäuse aufwies.

4 Diskussion

4.1 Die Nlrp-3-Inflammasomaktivierung und diabetische Nephropathie, angelockte und eingewanderte Zellen des Immunsystems?

Ergebnisse der Grundlagenforschung konnten *in vitro* und *in vivo* Hinweise darauf geben, dass bei der Pathogenese der diabetischen Nephropathie die Aktivierung von sterilen Entzündungsmechanismen eine bedeutende Rolle spielen [115, 116]. In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass die Aktivierung des Inflammasoms die diabetische Nephropathie verursachen kann. Weiterhin zeigen die dargestellten *in vitro* und *in vivo*-Daten, dass der IL-1-Antagonist Anakinra eine vielversprechende Therapieoption darstellt.

Ob nun eingewanderte Immunzellen oder ortsständige Zellen wie Podozyten und Endothelzellen eine bei der Nlrp3-Inflammasomaktivierung entscheidende Rolle spielen, wurde nun durch unsere Arbeitsgruppe erstmals belegt [36].

Chen et al. zeigte sowohl *in vivo* als auch bei Patienten, dass die bei der diabetischen Nephropathie vorkommenden Entzündungsprozesse im tubulointerstitiellen Raum durch ATP-P2X4 getriggerte Inflammasomaktivierung hervorgerufen werden [117].

Diese Forschungsergebnisse postulieren allerdings eine durch Nlrp3-Inflammasom und IL-1 β und IL-18 bedingte chemotaktische Wirkung und infolgedessen bedingte Migration von Entzündungszellen in den tubulointerstitiellen Raum. Harnsäure verstärkt die diabetische Nephropathie, nicht zuletzt durch eine Induktion des Nlrp3-Inflammasoms und die dadurch postulierte Makrophagenaktivierung [118]. In Zellen des Mesangiums und in Tubulusepithelzellen kommt es unter hyperglykämischen Bedingungen zur vermehrten Genexpression zahlreicher proinflammatorischer Gene. So konnte gezeigt werden, dass mammalian target of rapamycin (mTOR)- und Inflammasomkomponenten in Mesangiumzellen vermehrt exprimiert werden [119].

Wie bringt man allerdings eine durch diabetischen Nephropathie bedingte chronische Niereninsuffizienz und das Nlrp3-Inflammasom zusammen? Und sind dabei auch die ortsansässigen, nicht dem Immunsystem zugehörigen Zellen entscheidend beteiligt?

Um die Hypothese zu stützen, dass die ortsständigen Zellen der Niere ein ausreichender und entscheidender Stimulus der Inflammasomaktivierung sein können, wären Knockoutmodelle für Nlrp3 hilfreich. Am besten würden sich verschiedene Modelle sowohl für bewegliche Zellen des Immunsystems als auch organständige Zellen eignen. Da diese Modelle zum aktuellen Zeitpunkt nicht erhältlich sind, führte unsere

Arbeitsgruppe Knochenmarktransplantationen mit (Nlrp3 -/- und Caspase1 -/-) defizientem Knochenmark durch. Dabei wurden im Mausmodell für Diabetes mellitus Typ 2 (db/db) gezeigt, dass die Nlrp3-Inflammasomaktivierung in der Niere auch in den Versuchstieren mit Nlrp3 -/- bzw. Caspase1 -/- defizientem Knochenmark aktiviert wird. In die Nierenglomeruli und in den tubulointerstitiellen Raum ausgewanderte Immunzellen, wie sie aufgrund vorliegender Untersuchungen der Haut, Leber und Lunge gefordert werden können, zeigten keine Inflammasomaktivierung (Nlrp3 in CD11c+ positiven Zellen). Es ist sehr wahrscheinlich, dass einige Immunzellen bereits zum Zeitpunkt der Knochenmarktransplantation in den Glomeruli bzw. im tubulointerstitiellen Raum vorhanden sind. Man geht davon aus, dass zur Migration befähigte Entzündungszellen aus dem Knochenmark innerhalb weniger Wochen in der Niere ersetzt werden.

In den knochenmarktransplantierten Mäusen (db/db) konnte gezeigt werden, dass das Nlrp3-Inflammasom in den aus dem Knochenmark abstammenden Entzündungszellen in der Niere bei der diabetischen Nephropathie nicht aktiviert ist.

Daher sprechen die vorliegenden Untersuchungsergebnisse in aller erster Linie gegen eine durch aktive Rekrutierung von Immunzellen initiierte Nlrp3-Inflammasom-induzierte diabetische Nephropathie. Es ist anzunehmen, dass Immunzellen unabhängig von der Inflammasomaktivierung die diabetische Nephropathie verstärken können [120-122]. Auch erscheint es möglich, dass vom Knochenmark abstammende Zellen in späteren Krankheitsstadien der diabetischen Nephropathie eine Rolle spielen. Auch bedarf es weiterer experimenteller Untersuchungen, ob durch Nlrp3-Inflammasomaktivierung und andere Trigger Immunzellen chemotaktisch zur Migration in das Nierengewebe angeregt werden. Insgesamt ist auf der Grundlage dieser Arbeit nun davon auszugehen, dass die diabetische Nephropathie durch die Inflammasomaktivierung in ortsständigen Zellen der Niere induziert wird.

4.2 Nlrp3-Inflammasomaktivierung in den ortsständigen Zellen der Niere in vitro und in vivo

Um die Assoziation von Nlrp3-Inflammasomaktivierung und der diabetischen Nephropathie zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit vitro-, in vivo- und ex vivo-Experimente durchgeführt. Hier wird gezeigt, dass das Nlrp3-Inflammasom und davon aktivierte Enzyme wie die Caspase1 in den ortsständigen Zellen aktiviert werden.

Es kann in vitro gezeigt werden, dass die quantitative Expression von Nlrp3 und der aktivierten Form der Caspase1 (cleaved Caspase1) nach unterschiedlich langer Glucoseexposition zunimmt. Bereits nach kurzzeitiger Exposition der Podozyten mit erhöhter Glucose ist eine signifikant erhöhte Nlrp3-Expression im Immunoblot nachweisbar (Abb. 2a, Abb. 2b). Dies unterstützt die Hypothese, dass das Nlrp3-Inflammasom sehr sensitiv auf eine hyperglykämische Stoffwechsellage reagiert und bereits in frühen Stadien der diabetischen Nephropathie eine entscheidende Rolle spielt.

Bei mittlerer Expositionsdauer zeigte sich jedoch ein nicht signifikanter Abfall der Nlrp3-Expression. Möglicherweise spielen endogene Kompensationsmechanismen und eine verbesserte mitochondriale Funktion eine tragende Rolle [36].

Bei länger dauernder Exposition der Podozyten durch hohe Glucosespiegel können diese Kompensationsmechanismen nicht mehr richtig wirken und es kommt zu einer verstärkten Inflammasomaktivierung. Möglicherweise kommt die sich selbstverstärkende Rolle der ROS als protrahierte feed-forward-Aktivierung zum Tragen. Hierzu sind weitere Untersuchungen notwendig. Die maximale Ausprägung der Nlrp3-Inflammasomaktivierung finden sich sowohl in Endothelzellen (Abb. 3) als auch in Podozyten (Abb. 2a, Abb. 2b) bei der längsten Glucoseexposition (24 Stunden Inkubation mit 30 mM Glucose). Das aktivierte Nlrp3-Inflammasom spaltet Pro-Caspase1 in die aktivierte Form der Caspase1. In Einklang mit der Quantität der Nlrp3-Expression kann auch hier die maximale Expression nach 24 Stunden gemessen werden.

Anzumerken ist außerdem, dass ein signifikant erhöhter Spiegel von aktivierter Caspase1 erst zeitverzögert im Vergleich zur Nlrp3-Erhöhung eintritt. Bei allen Ergebnissen wurde der identische Versuchsaufbau gewählt. Ein Erklärungsversuch wäre, dass die Pro-Caspase1 erst durch das Nlrp3-Inflammasom prozessiert werden kann, sobald das Adapterprotein apoptosis-associated speck-like protein (ASC) das Nlrp3-Inflammasom zur Prozessierung von Pro-Caspase1 befähigt hat [55]. Das Nlrp3-Inflammasom ist möglicherweise schon im Zytosol signifikant erhöht vorhanden, während die aktivierte Caspase1 noch nicht gespalten wurde (Abb. 2c). Um dies zu beweisen, müssten das Nlrp3-Inflammasom aktivierende Adapterproteine wie beispielsweise ASC, Ipaf und RIP-2 und ihre Rolle bei der Inflammasomaktivierung in ortsständigen Zellen der Niere näher untersucht werden.

Die Arbeit von Boini et al. [123] hatte untersucht, ob Adapterproteine wie ASC bei der Aktivierung des Nlrp3-Inflammasoms in Podozyten eine Rolle spielen. Die Gruppe konnte zeigen, dass im Tiermodell mit Mäusen, die eine hochkalorische Nahrung („western-style diet“; high fat diet (HFD)) erhielten, eine Aktivierung des ASC-Proteins und des Nlrp3-Inflammasoms erfolgt. Daraus resultierend kommt es zu einer Podozytenschädigung mit Verlust von Fußfortsätzen und einer resultierenden Makroalbuminurie. In Knockoutmäusen für das ASC-Gen (ASC-/-) konnte eine hochkalorische Nahrung die Aktivierung des Nlrp3-Inflammasoms, die Prozessierung von Caspase1 und damit die Spaltung von pro-IL-1 β in IL-1 β nicht induzieren. Somit lies sich in Knockoutmäusen für das ASC-Gen der Obesitas-assoziierte Nierenschaden aufhalten.

Aus den Ergebnissen von Boini et. al. geht aber nicht hervor, ob die hochkalorische Diät bei den Mäusen nicht zu erhöhten Blutzuckerspiegeln geführt hat und letztendlich hierdurch bedingt die Nlrp3-Inflammasomaktivierung erklärt werden kann. Der postulierte zeitliche und kausale Zusammenhang zwischen hohem Blutzuckerspiegel, erhöhter Nlrp3- und ASC-Konzentrationen im Zytosol und letztendlich aktivierter Caspase1 muss noch bewiesen werden.

4.3 Reaktive Sauerstoffspezies als „Trigger“ des Nlrp3-Inflammasoms

Dass reaktive Sauerstoffspezies (ROS) das Nlrp3-Inflammasom aktivieren können, ist in der Literatur vielfach beschrieben und ein etablierter Mechanismus [124-126]. Da reaktive Sauerstoffspezies auch bei der Schädigung organständiger Zellen wie den Podozyten bei der diabetischen Nephropathie eine Rolle spielen [105, 127], erscheint es naheliegend, dass es eine Verbindung zwischen einer intrazellulären Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies und der sterilen Entzündungsreaktion durch das Nlrp3-Inflammasom gibt. In Immunzellen bei an Diabetes mellitus erkrankten Patienten stört die ROS-induzierte Inflammasomaktivierung die Wundheilung [128]. Dies zeigt, dass dieser Signalweg auch in Organen beziehungsweise Zellen außerhalb der Niere vorkommt.

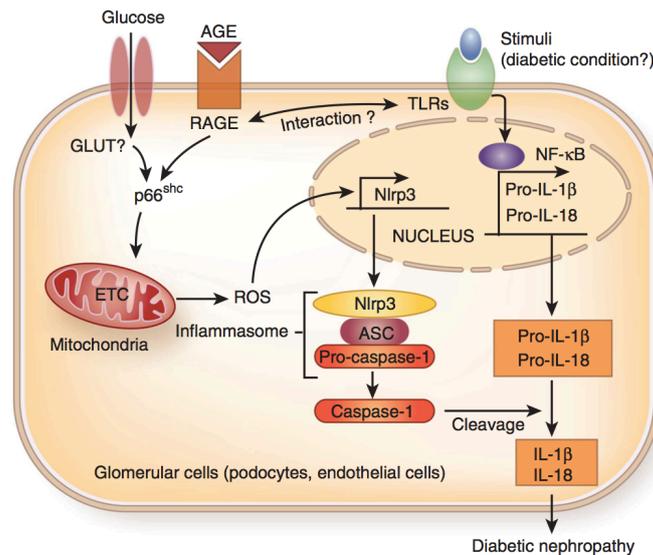


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Aktivierung des Nlrp3-Inflammasoms in den ortsständigen Zellen der Niere [129].

In Abbildung 11 ist eine schematische Darstellung der aktuellen Vorstellung über die Signalkaskaden in den ortsständigen Zellen der Niere bei der diabetischen Nephropathie skizziert. Dieses Schema ist nicht zuletzt auf dem Boden der vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit und den Forschungsergebnissen von Bock, Shahzad et al. entstanden [36, 105]. Reaktive Sauerstoffspezies vermitteln die mitochondriale Dysfunktion und bedingen damit ihrerseits einen weiteren Anstieg der ROS-Produktion [74, 105]. Es wurde auch gezeigt, dass diese mitochondriale ROS-Produktion ausreicht, um das Nlrp3-Inflammasom zu aktivieren.

Dieser Zusammenhang wurde experimentell untersucht. Hierzu wurde entweder das regulierende Protein p66^{SHC} genetisch ausgeschaltet oder die ROS-Produktion durch MitoTempo, einem mitochondrienspezifischen Antioxidans, reduziert. Daraus resultierte eine deutlich abgeschwächte Nlrp3-Inflammasomaktivierung [105].

Ideale Untersuchungsbedingungen wären geschaffen, wenn man die mitochondriale ROS-Produktion direkt in glomerulären Zellen wie den Podozyten hemmen könnte. Dann ließe sich direkt zeigen, in welchem Ausmaß die reaktive Sauerstoffspezies der Mitochondrien die Nlrp3-Inflammasomaktivierung in ortsständigen Zellen der Niere aktivieren und damit in die Pathogenese der diabetischen Nephropathie involviert sind.

Aktuelle klinische Untersuchungen zeigen, dass im Stadium einer chronischen Nierenschädigung eine durch ROS getriggerte Nlrp3-Inflammasomaktivierung bei dialysepflichtigen Patienten zu verzeichnen ist [130]. Diese Untersuchungen zeigen,

dass dieser Signalweg über reaktive Sauerstoffspezies und das Nlrp3-Inflammasom ein interessanter Angriffspunkt zukünftiger Therapieoptionen darstellen könnte.

Reaktive Sauerstoffspezies haben nicht nur einen schädigenden Einfluss auf den Organismus. Sie sind für den Erhalt der zellulären Homöostase unabdingbar [131]. Daher wäre eine Unterdrückung der mitochondrialen ROS-Produktion auch von negativen Nebeneffekten begleitet.

Es wäre nützlich, wenn noch weitere durch ROS getriggerte Signalwege, die zur Zellschädigung führen können, aufgedeckt werden. Die bisherigen Untersuchungen zeigten zudem, dass die Hemmung mitochondrialer ROS durch MitoTempo nur bedingt effektiv die Nierenschädigung im Rahmen der diabetischen Nephropathie verhindern kann. Damit ist der Nutzen der alleinigen ROS-Inhibition letztendlich fraglich. Dies zusammengenommen limitiert den angestrebten therapeutischen Nutzen bei gleichzeitig zu erwartenden ungewollten Nebenwirkungen.

4.4 Anakinra verhindert den bereits etablierten Nierenschaden bzw. macht diesen rückgängig

Wie in der Literatur beschrieben und bereits in der Einleitung erwähnt, hat der Interleukin-1-Rezeptorantagonist Anakinra bereits seinen verwendbaren Nutzen bei an Diabetes mellitus erkrankten Personen in klinischen Untersuchungen unter Beweis gestellt [92, 132]. Zu diskutieren ist, inwieweit der Benefit der Anakinrathherapie durch den positiven Einfluss auf den Metabolismus zustande kommt. Es konnte der Einfluss von Anakinra auf den Blutzuckerspiegel und das Körpergewicht auch in der vorliegenden Arbeit aufgezeigt werden. Es konnte dargestellt werden, dass bei Mäusen (db/db) im Modell für Diabetes mellitus Typ 2 eine Behandlung mit Anakinra das Auftreten einer diabetischen Nephropathie verhindern oder zumindest ihr Ausmaß abschwächen kann (Abb. 6a). Zusätzlich sind hier die angesprochenen metabolischen Effekte auszumachen, was sich in einem signifikant niedrigerem Blutzuckerspiegel und einem geringeren Körpergewicht zeigt (Abb. 8a).

Bei bereits etablierter diabetischen Nephropathie (Abb. 6b) offenbart eine Behandlung mit Anakinra ebenfalls Wirkung. Es konnte die diabetische Nephropathie zum Teil rückgängig gemacht werden, was sich in einer signifikant niedrigeren Albuminausscheidung sowie einer geringeren Ausprägung der Glomerulosklerose darlegt. Hingegen konnte bei bereits bestehender Nephropathie kein signifikanter Effekt auf den Blutzuckerspiegel und das Körpergewicht beobachtet werden.

Im Tiermodell für Diabetes mellitus Typ 1 (s. Abschnitt 2.4.3) konnte die Behandlung mit Anakinra ebenfalls die Albuminurie signifikant verringern. Es zeigten sich allerdings auch hier kein signifikanter Einfluss auf den Blutzuckerspiegel und das Körpergewicht. Dies zeigt eindrucksvoll, dass die Wirkung von Anakinra auf das Auftreten und das Voranschreiten der diabetischen Nephropathie zumindest teilweise unabhängig von den metabolischen Effekten einer Anakinrathherapie ist.

4.5 Minocyclin hemmt die mit Hyperglykämie assoziierte ROS-Produktion und auch das Nlrp3-Inflammasom

Minocyclin hat einen positiven Effekt auf den durch Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) verursachten Zellschaden. So konnte gezeigt werden, dass Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1 (PARP-1) durch den ROS-bedingten Zellschaden aktiviert wird [133]. Allerdings konnte ebenfalls gezeigt werden, dass durch spezifische Inhibition von PARP-1 durch die zwei unterschiedlichen Substanzen PJ-34 und INO-1001 die mit Hyperglykämie assoziierte ROS-Produktion in Lepr(db/db)-Mäusen gehemmt werden kann [134]. Dieser durch mitochondriale ROS-Produktion aktivierte Signalweg und die damit verursachte diabetische Nephropathie kann durch Minocyclin zumindest teilweise aufgehalten werden [33].

Kürzlich erschienene Forschungsergebnisse legen nun erstmals eine von vielen Autoren postulierte direkte Inhibition des Nlrp3-Inflammasoms durch Minocyclin nahe [135]. Eine mit Minocyclin assoziierte abgeschwächte Aktivierung von Caspase1 (cleaved Caspase1) ist auch in den in vivo-Experimenten der vorliegenden Arbeit zu sehen. An welchem Punkt der in Abbildung 11 dargestellten Signalkaskade Minocyclin letztendlich angreift, bedarf weiterer Forschung.

Es ist interessant, dass eine Behandlung mit Minocyclin direkte metabolische Effekte zeigt. Es ist in Abbildung 10 zu sehen, dass zum einen Endpunkte der diabetischen Nephropathie wie Albuminurie und mesangiale Expansion und die damit assoziierte Glomerulosklerose abgeschwächt wird. Zudem wird gezeigt, dass das Körpergewicht und der Blutzuckerspiegel in Lepr(db/db)-Mäusen nach zwölfwöchiger Minocyclintherapie signifikant niedriger sind. Dies unterscheidet die Behandlung mit Minocyclin von dem spezifischen IL-1-Rezeptorantagonisten Anakinra.

In noch nicht veröffentlichten Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass sich bei Mäusen der Blutzuckerspiegel in Abhängigkeit von der gewählten Therapieform (Insulin oder Minocyclin) insgesamt nicht unterschied. Trotzdem entwickelte die alleinig durch

Insulin behandelte Gruppe eine durch das Nlrp3-Inflammasom getriggerte Nephropathie. Daraus konnte gefolgert werden, dass neben den metabolischen Effekten der Minocyclintherapie eine Beeinflussung der diabetischen Nephropathie besteht. Minocyclin hat bereits bei der diabetischen Retinopathie seinen positiven Einfluss auf die Zytokinexpression unter Beweis gestellt [98]. Ein interessanter Ansatz ist auch die verminderte β -Amyloidproteinablagerung im Hippocampus durch Minocyclin. Diese Ablagerungen sind mit der Demenz vom Alzheimer-Typ assoziiert und sind unter metabolischen Störungen wie bei Diabetes mellitus Typ 2 signifikant erhöht [136].

Minocyclin hat wie Anakinra eine antiinflammatorische Wirkung, deren experimentelle Wirksamkeit in durch Diabetes verursachten Organschäden vielversprechend ist.

Insgesamt wurden in der vorliegenden Arbeit mit Anakinra und Minocyclin zwei sehr vielversprechende Therapieansätze aufgezeigt. Mit Anakinra ist gar der Wirkmechanismus innerhalb dieser Arbeit aufgezeigt worden. Es bedarf nun einer weiteren klinischen Evaluation, die dessen Wirksamkeit überprüft, um so den Patienten effektiv, schnell und sicher helfen zu können.

5 Zusammenfassung der Ergebnisse

40 % der an Diabetes mellitus erkrankten Personen entwickeln eine diabetische Nephropathie, die unbehandelt oft zur terminalen Niereninsuffizienz und durch chronisches Nierenversagen zum Tod führt. In der vorliegenden Arbeit wird erstmals gezeigt, dass das Nlrp3-Inflammasom nicht nur in Zellen des Immunsystems wie Monozyten und Makrophagen von Bedeutung ist, sondern auch in ortsständigen Zellen der Niere wie Endothelzellen und insbesondere den Podozyten aktiv ist.

Es ist bekannt, dass eine Hyperglykämie zur vermehrten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies in den Mitochondrien führt und damit das Nlrp3-Inflammasom aktivieren kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass das Nlrp3-Inflammasom in vitro und im Tiermodell für Diabetes mellitus Typ 1 und Diabetes mellitus Typ 2 aktiviert wird. Weiterhin konnte die Nlrp3-Inflammasomaktivierung auch in Glomeruli und hier insbesondere in den Podozyten von Nierenproben an diabetischer Nephropathie leidenden Patienten nachgewiesen werden. Das Nlrp3-Inflammasom führt über die Prozessierung der Caspase1 zur Aktivierung von Interleukin-1 β , was die Ausschüttung weiterer Entzündungsmediatoren, Rekrutierung weiterer Zellen und eine Verstärkung der Zellschädigung zur Folge hat. Das Ausmaß der Nierenschädigung, quantifiziert durch Albuminurie, korreliert mit den Interleukin-1 β -Konzentration im Serum.

Um die Wirkung des Inflammasoms zu hemmen, setzten wir den Interleukin-1-Rezeptorantagonisten Anakinra ein. Dieser ist aus der Therapie der Rheumatoiden Arthritis bekannt. Im Tiermodell für Diabetes mellitus Typ 1 und Diabetes mellitus Typ 2 konnte das Voranschreiten der diabetischen Nephropathie durch die Therapie mit Anakinra aufgehalten werden. Bei bereits eingetretener Nierenschädigung waren die Nephropathie determinierende Veränderungen in ihrer Ausprägung rückläufig.

Ähnliche Effekte offenbarte auch die Behandlung mit dem Tetracyclinantibiotikum Minocyclin. Für Minocyclin ist bekannt, dass es neben den etablierten antimikrobiellen Eigenschaften auch bei sterilen Entzündungsprozessen einen protektiven Effekt zeigt. In der vorliegenden Arbeit konnte dargestellt werden, dass die durch das Nlrp3-Inflammasom vermittelte Aktivierung der Caspase1 durch Minocyclin gehemmt werden kann.

Der hier aufgezeigte Ansatz in der Behandlung der diabetischen Nephropathie ist vielversprechend hinsichtlich einer verbesserten Therapie.

Ob sich das Nlrp3-Inflammasom als Angriffsziel bei der Behandlung an Diabetes mellitus erkrankten und an diabetischer Nephropathie leidenden Patienten eignet, bedarf nun einer klinischen Evaluation.

6 Literaturverzeichnis

1. Sue Kirkman, M., et al., *Diabetes in older adults: a consensus report*. J Am Geriatr Soc, 2012. **60**(12): p. 2342-56.
2. Fazeli Farsani, S., et al., *Global trends in the incidence and prevalence of type 2 diabetes in children and adolescents: a systematic review and evaluation of methodological approaches*. Diabetologia, 2013. **56**(7): p. 1471-88.
3. Liese, A.D., et al., *The burden of diabetes mellitus among US youth: prevalence estimates from the SEARCH for Diabetes in Youth Study*. Pediatrics, 2006. **118**(4): p. 1510-8.
4. Federation, I.D., *International Diabetes Federation: IDF Diabetes Atlas, 6th edn. Brussels, Belgium*. Vol. 6. 2013.
5. Hauner, H., I. Köster, and I. Schubert, *Trends in der Prävalenz und ambulanten Versorgung von Menschen mit Diabetes mellitus: Eine Analyse der Versichertenstichprobe AOK Hessen/KV Hessen im Zeitraum von 1998 bis 2004*. Dtsch Arztebl International, 2007. **104**(41): p. 2799-.
6. Wolfgang Kerner, J.B., *Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus*. Diabetologie, 2011. **6 Suppl2**:: p. S 107–S 110
7. *Diabetes mellitus. Report of a WHO expert committee*. World Health Organ Tech Rep Ser, 1965. **310**: p. 1-44.
8. Alberti, K.G. and P.Z. Zimmet, *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation*. Diabet Med, 1998. **15**(7): p. 539-53.
9. *Executive summary: Standards of medical care in diabetes--2010*. Diabetes Care, 2010. **33 Suppl 1**: p. S4-10.
10. Evert, A.B. and M.C. Riddell, *Lifestyle Intervention: Nutrition Therapy and Physical Activity*. Med Clin North Am, 2015. **99**(1): p. 69-85.
11. *Standards of medical care in diabetes--2009*. Diabetes Care, 2009. **32 Suppl 1**: p. S13-61.
12. Medici, F., et al., *Concordance rate for type II diabetes mellitus in monozygotic twins: actuarial analysis*. Diabetologia, 1999. **42**(2): p. 146-50.
13. Lohmueller, K.E., et al., *Whole-exome sequencing of 2,000 Danish individuals and the role of rare coding variants in type 2 diabetes*. Am J Hum Genet, 2013. **93**(6): p. 1072-86.
14. *Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*. Diabetes Care, 1997. **20**(7): p. 1183-97.
15. Nejentsev, S., et al., *Localization of type 1 diabetes susceptibility to the MHC class I genes HLA-B and HLA-A*. Nature, 2007. **450**(7171): p. 887-92.
16. *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.
17. 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.
18. van der Velde, M., et al., *Screening for albuminuria identifies individuals at increased renal risk*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(4): p. 852-62.
19. Wittchen, H.U., et al., *[Aim, design and methods of the "Hypertension and diabetes screening and awareness" -- (HYDRA) study]*. Fortschr Med Orig, 2003. **121 Suppl 1**: p. 2-11.

20. Kimmelstiel, P. and C. Wilson, *Benign and Malignant Hypertension and Nephrosclerosis: A Clinical and Pathological Study*. Am J Pathol, 1936. **12**(1): p. 45-82 3.
21. Gambará, V., et al., *Heterogeneous nature of renal lesions in type II diabetes*. J Am Soc Nephrol, 1993. **3**(8): p. 1458-66.
22. Tervaert, T.W., et al., *Pathologic classification of diabetic nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2010. **21**(4): p. 556-63.
23. Makino, H., et al., *Ultrastructural changes of extracellular matrices in diabetic nephropathy revealed by high resolution scanning and immunoelectron microscopy*. Lab Invest, 1993. **68**(1): p. 45-55.
24. Silbernágl, S., *Physiologie: Die Funktion der Nieren*. Vol. 5. 2001: Georg Thieme Verlag Stuttgart - New York. 287-336.
25. Abrahamson, D.R., *Recent studies on the structure and pathology of basement membranes*. J Pathol, 1986. **149**(4): p. 257-78.
26. Pollak, M.R., *Expanding the spectrum of NPHS1-associated disease*. Kidney Int, 2009. **76**(12): p. 1221-3.
27. Tryggvason, K., *Unraveling the mechanisms of glomerular ultrafiltration: nephrin, a key component of the slit diaphragm*. J Am Soc Nephrol, 1999. **10**(11): p. 2440-5.
28. Boright, A.P., et al., *Genetic variation at the ACE gene is associated with persistent microalbuminuria and severe nephropathy in type 1 diabetes: the DCCT/EDIC Genetics Study*. Diabetes, 2005. **54**(4): p. 1238-44.
29. Hakroursh, S., et al., *Effects of increased renal tubular vascular endothelial growth factor (VEGF) on fibrosis, cyst formation, and glomerular disease*. Am J Pathol, 2009. **175**(5): p. 1883-95.
30. Godel, M., et al., *Role of mTOR in podocyte function and diabetic nephropathy in humans and mice*. J Clin Invest, 2011. **121**(6): p. 2197-209.
31. Ng, D.P., et al., *Minor effect of GLUT1 polymorphisms on susceptibility to diabetic nephropathy in type 1 diabetes*. Diabetes, 2002. **51**(7): p. 2264-9.
32. Gnudi, L., S.M. Thomas, and G. Viberti, *Mechanical forces in diabetic kidney disease: a trigger for impaired glucose metabolism*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(8): p. 2226-32.
33. Isermann, B., et al., *Activated protein C protects against diabetic nephropathy by inhibiting endothelial and podocyte apoptosis*. Nat Med, 2007. **13**(11): p. 1349-58.
34. 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.
35. Hasegawa, G., et al., *Possible role of tumor necrosis factor and interleukin-1 in the development of diabetic nephropathy*. Kidney Int, 1991. **40**(6): p. 1007-12.
36. Shahzad, K., et al., *Nlrp3-inflammasome activation in non-myeloid-derived cells aggravates diabetic nephropathy*. Kidney Int, 2015. **87**(1): p. 74-84.
37. Kang, Y.S., et al., *CCR2 antagonism improves insulin resistance, lipid metabolism, and diabetic nephropathy in type 2 diabetic mice*. Kidney Int, 2010. **78**(9): p. 883-94.
38. Sayyed, S.G., et al., *An orally active chemokine receptor CCR2 antagonist prevents glomerulosclerosis and renal failure in type 2 diabetes*. Kidney Int, 2011. **80**(1): p. 68-78.
39. Awad, A.S., et al., *Monocyte/macrophage chemokine receptor CCR2 mediates diabetic renal injury*. Am J Physiol Renal Physiol, 2011. **301**(6): p. F1358-66.
40. Levey, A.S., et al., *A new equation to estimate glomerular filtration rate*. Ann Intern Med, 2009. **150**(9): p. 604-12.

41. *The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group.* N Engl J Med, 1993. **329**(14): p. 977-86.
42. Holman, R.R., et al., *10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes.* N Engl J Med, 2008. **359**(15): p. 1577-89.
43. Perkovic, V., et al., *Intensive glucose control improves kidney outcomes in patients with type 2 diabetes.* Kidney Int, 2013. **83**(3): p. 517-23.
44. *KDOQI Clinical Practice Guideline for Diabetes and CKD: 2012 Update.* Am J Kidney Dis, 2012. **60**(5): p. 850-86.
45. Bruno, G., et al., *Progression to overt nephropathy in type 2 diabetes: the Casale Monferrato Study.* Diabetes Care, 2003. **26**(7): p. 2150-5.
46. Sacks, F.M., et al., *Association between plasma triglycerides and high-density lipoprotein cholesterol and microvascular kidney disease and retinopathy in type 2 diabetes mellitus: a global case-control study in 13 countries.* Circulation, 2014. **129**(9): p. 999-1008.
47. Colhoun, H.M., et al., *Effects of atorvastatin on kidney outcomes and cardiovascular disease in patients with diabetes: an analysis from the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS).* Am J Kidney Dis, 2009. **54**(5): p. 810-9.
48. Nakai, K., et al., *Vitamin D activates the Nrf2-Keap1 antioxidant pathway and ameliorates nephropathy in diabetic rats.* Am J Hypertens, 2014. **27**(4): p. 586-95.
49. de Zeeuw, D., et al., *Selective vitamin D receptor activation with paricalcitol for reduction of albuminuria in patients with type 2 diabetes (VITAL study): a randomised controlled trial.* Lancet, 2010. **376**(9752): p. 1543-51.
50. Kwakernaak, A.J., et al., *Effects of sodium restriction and hydrochlorothiazide on RAAS blockade efficacy in diabetic nephropathy: a randomised clinical trial.* Lancet Diabetes Endocrinol, 2014. **2**(5): p. 385-95.
51. Makura, C.B., et al., *Effects of physical activity on the development and progression of microvascular complications in type 1 diabetes: retrospective analysis of the DCCT study.* BMC Endocr Disord, 2013. **13**: p. 37.
52. de Zeeuw, D., et al., *Bardoxolone methyl in type 2 diabetes and stage 4 chronic kidney disease.* N Engl J Med, 2013. **369**(26): p. 2492-503.
53. Maahs, D.M., et al., *Uric acid lowering to prevent kidney function loss in diabetes: the preventing early renal function loss (PERL) allopurinol study.* Curr Diab Rep, 2013. **13**(4): p. 550-9.
54. Schroder, K. and J. Tschopp, *The inflammasomes.* Cell, 2010. **140**(6): p. 821-32.
55. Mariathasan, S., et al., *Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf.* Nature, 2004. **430**(6996): p. 213-8.
56. Martinon, F., A. Mayor, and J. Tschopp, *The inflammasomes: guardians of the body.* Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 229-65.
57. Bauernfeind, F.G., et al., *Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression.* J Immunol, 2009. **183**(2): p. 787-91.
58. Franchi, L., T. Eigenbrod, and G. Nunez, *Cutting edge: TNF-alpha mediates sensitization to ATP and silica via the NLRP3 inflammasome in the absence of microbial stimulation.* J Immunol, 2009. **183**(2): p. 792-6.
59. Qu, Y., et al., *Pannexin-1 is required for ATP release during apoptosis but not for inflammasome activation.* J Immunol, 2011. **186**(11): p. 6553-61.

60. Solini, A., et al., *The purinergic 2X7 receptor participates in renal inflammation and injury induced by high-fat diet: possible role of NLRP3 inflammasome activation.* J Pathol, 2013. **231**(3): p. 342-53.
61. Kanneganti, T.D., et al., *Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling.* Immunity, 2007. **26**(4): p. 433-43.
62. Dostert, C., et al., *Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica.* Science, 2008. **320**(5876): p. 674-7.
63. Hornung, V., et al., *Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization.* Nat Immunol, 2008. **9**(8): p. 847-56.
64. Trnka, J., et al., *Antioxidant properties of MitoTEMPOL and its hydroxylamine.* Free Radic Res, 2009. **43**(1): p. 4-12.
65. Nakahira, K., et al., *Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome.* Nat Immunol, 2011. **12**(3): p. 222-30.
66. Zhou, R., et al., *A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation.* Nature, 2011. **469**(7329): p. 221-5.
67. Hu, C., et al., *NLRP3 deficiency protects from type 1 diabetes through the regulation of chemotaxis into the pancreatic islets.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(36): p. 11318-23.
68. de Rivero Vaccari, J.P., et al., *A molecular platform in neurons regulates inflammation after spinal cord injury.* J Neurosci, 2008. **28**(13): p. 3404-14.
69. Feldmeyer, L., et al., *The inflammasome mediates UVB-induced activation and secretion of interleukin-1beta by keratinocytes.* Curr Biol, 2007. **17**(13): p. 1140-5.
70. Andersen, K., et al., *The NLRP3/ASC inflammasome promotes T-cell-dependent immune complex glomerulonephritis by canonical and noncanonical mechanisms.* Kidney Int, 2014. **86**(5): p. 965-78.
71. Eizirik, D.L., et al., *The human pancreatic islet transcriptome: expression of candidate genes for type 1 diabetes and the impact of pro-inflammatory cytokines.* PLoS Genet, 2012. **8**(3): p. e1002552.
72. Mandrup-Poulsen, T., L. Pickersgill, and M.Y. Donath, *Blockade of interleukin 1 in type 1 diabetes mellitus.* Nat Rev Endocrinol, 2010. **6**(3): p. 158-66.
73. Schroder, K., R. Zhou, and J. Tschopp, *The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? Science, 2010. 327(5963): p. 296-300.*
74. Zhou, R., et al., *Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation.* Nat Immunol, 2010. **11**(2): p. 136-40.
75. Wang, H., et al., *Obesity development in caspase-1-deficient mice.* Int J Obes (Lond), 2014. **38**(1): p. 152-5.
76. Dinarello, C.A., L. Renfer, and S.M. Wolff, *The production of antibody against human leukocytic pyrogen.* J Clin Invest, 1977. **69**(2): p. 465-72.
77. Dinarello, C.A., *Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism.* Blood, 1991. **77**(8): p. 1627-52.
78. Dinarello, C.A., *Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases.* Blood, 2011. **117**(14): p. 3720-32.
79. Uchiyama, K., et al., *Impact of a genetic polymorphism of the interleukin-1 receptor antagonist on technique survival in peritoneal dialysis patients.* Blood Purif, 2005. **23**(6): p. 450-8.
80. Arend, W.P., *The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease.* Cytokine Growth Factor Rev, 2002. **13**(4-5): p. 323-40.

81. Rothwell, N.J., *Annual review prize lecture cytokines - killers in the brain?* J Physiol, 1999. **514 (Pt 1)**: p. 3-17.
82. Dhimolea, E., *Canakinumab*. MAbs, 2010. **2(1)**: p. 3-13.
83. Rastaldi, M.P., et al., *Intraglomerular and interstitial leukocyte infiltration, adhesion molecules, and interleukin-1 alpha expression in 15 cases of antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated renal vasculitis*. Am J Kidney Dis, 1996. **27(1)**: p. 48-57.
84. Teppo, A.M., et al., *Does increased urinary interleukin-1 receptor antagonist/interleukin-1beta ratio indicate good prognosis in renal transplant recipients?* Transplantation, 1998. **66(8)**: p. 1009-14.
85. Shu, K.H., et al., *Impact of interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism on IgA nephropathy*. Kidney Int, 2000. **58(2)**: p. 783-9.
86. Blakemore, A.I., et al., *Interleukin-1 receptor antagonist allele (IL1RN*2) associated with nephropathy in diabetes mellitus*. Hum Genet, 1996. **97(3)**: p. 369-74.
87. Dinarello, C.A., *The role of the interleukin-1-receptor antagonist in blocking inflammation mediated by interleukin-1*. N Engl J Med, 2000. **343(10)**: p. 732-4.
88. Pascual, V., et al., *Role of interleukin-1 (IL-1) in the pathogenesis of systemic onset juvenile idiopathic arthritis and clinical response to IL-1 blockade*. J Exp Med, 2005. **201(9)**: p. 1479-86.
89. Maier, J., et al., *Effective treatment of steroid refractory adult-onset Still's disease with anakinra*. J Rheumatol, 2008. **35(5)**: p. 939-41.
90. Mandrup-Poulsen, T., *The role of interleukin-1 in the pathogenesis of IDDM*. Diabetologia, 1996. **39(9)**: p. 1005-29.
91. Maedler, K., et al., *Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets*. J Clin Invest, 2002. **110(6)**: p. 851-60.
92. Larsen, C.M., et al., *Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus*. N Engl J Med, 2007. **356(15)**: p. 1517-26.
93. Strauss, J.S., et al., *Guidelines of care for acne vulgaris management*. J Am Acad Dermatol, 2007. **56(4)**: p. 651-63.
94. Brundula, V., et al., *Targeting leukocyte MMPs and transmigration: minocycline as a potential therapy for multiple sclerosis*. Brain, 2002. **125(Pt 6)**: p. 1297-308.
95. Zhu, S., et al., *Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice*. Nature, 2002. **417(6884)**: p. 74-8.
96. Shahzad, K., et al., *Minocycline reduces plaque size in diet induced atherosclerosis via p27(Kip1)*. Atherosclerosis, 2011. **219(1)**: p. 74-83.
97. Lampl, Y., et al., *Minocycline treatment in acute stroke: an open-label, evaluator-blinded study*. Neurology, 2007. **69(14)**: p. 1404-10.
98. Krady, J.K., et al., *Minocycline reduces proinflammatory cytokine expression, microglial activation, and caspase-3 activation in a rodent model of diabetic retinopathy*. Diabetes, 2005. **54(5)**: p. 1559-65.
99. Kumar Bhatt, L. and V. Addepalli, *Minocycline with aspirin: an approach to attenuate diabetic nephropathy in rats*. Ren Fail, 2011. **33(1)**: p. 72-8.
100. Chen, H., et al., *Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice*. Cell, 1996. **84(3)**: p. 491-5.
101. 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.

102. Hummel, K.P., M.M. Dickie, and D.L. Coleman, *Diabetes, a new mutation in the mouse*. Science, 1966. **153**(3740): p. 1127-8.
103. Like, A.A., et al., *Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis in mice. Morphologic and physiologic studies*. Lab Invest, 1978. **38**(4): p. 470-86.
104. Wilson, G.L. and E.H. Leiter, *Streptozotocin interactions with pancreatic beta cells and the induction of insulin-dependent diabetes*. Curr Top Microbiol Immunol, 1990. **156**: p. 27-54.
105. Bock, F., et al., *Activated protein C ameliorates diabetic nephropathy by epigenetically inhibiting the redox enzyme p66Shc*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(2): p. 648-53.
106. Gil-Bernabe, P., et al., *Exogenous activated protein C inhibits the progression of diabetic nephropathy*. J Thromb Haemost, 2012. **10**(3): p. 337-46.
107. *Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care, 2003. **26 Suppl 1**: p. S5-20.
108. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem, 1985. **150**(1): p. 76-85.
109. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
110. van der Laarse, W.J., P. van Noort, and P.C. Diegenbach, *Calibration of quantitative histochemical methods: estimation of glycogen content of muscle fibers using the PAS reaction*. Biotech Histochem, 1992. **67**(5): p. 303-8.
111. Lee, S.M. and R. Bressler, *Prevention of diabetic nephropathy by diet control in the db/db mouse*. Diabetes, 1981. **30**(2): p. 106-11.
112. Latz, E., *The inflammasomes: mechanisms of activation and function*. Curr Opin Immunol, 2010. **22**(1): p. 28-33.
113. Dinarello, C.A., A. Simon, and J.W.M. van der Meer, *Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases*. Nat Rev Drug Discov, 2012. **11**(8): p. 633-52.
114. Vincent, J.A. and S. Mohr, *Inhibition of caspase-1/interleukin-1beta signaling prevents degeneration of retinal capillaries in diabetes and galactosemia*. Diabetes, 2007. **56**(1): p. 224-30.
115. Anders, H.J. and M. Lech, *NOD-like and Toll-like receptors or inflammasomes contribute to kidney disease in a canonical and a non-canonical manner*. Kidney Int, 2013. **84**(2): p. 225-8.
116. Du, P., et al., *NOD2 promotes renal injury by exacerbating inflammation and podocyte insulin resistance in diabetic nephropathy*. Kidney Int, 2013. **84**(2): p. 265-76.
117. Chen, K., et al., *ATP-P2X4 signaling mediates NLRP3 inflammasome activation: a novel pathway of diabetic nephropathy*. Int J Biochem Cell Biol, 2013. **45**(5): p. 932-43.
118. Kim, S.M., et al., *Hyperuricemia-induced NLRP3 activation of macrophages contributes to the progression of diabetic nephropathy*. Am J Physiol Renal Physiol, 2015. **308**(9): p. F993-F1003.
119. Iwata, Y., et al., *Pro-inflammatory/Th1 gene expression shift in high glucose stimulated mesangial cells and tubular epithelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2014. **443**(3): p. 969-74.
120. Chow, F.Y., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1-induced tissue inflammation is critical for the development of renal injury but not type 2 diabetes in obese db/db mice*. Diabetologia, 2007. **50**(2): p. 471-80.

121. Vielhauer, V., et al., *Obstructive nephropathy in the mouse: progressive fibrosis correlates with tubulointerstitial chemokine expression and accumulation of CC chemokine receptor 2- and 5-positive leukocytes*. J Am Soc Nephrol, 2001. **12**(6): p. 1173-87.
122. Wada, T., et al., *Up-regulation of monocyte chemoattractant protein-1 in tubulointerstitial lesions of human diabetic nephropathy*. Kidney Int, 2000. **58**(4): p. 1492-9.
123. Boini, K.M., et al., *Activation of inflammasomes in podocyte injury of mice on the high fat diet: Effects of ASC gene deletion and silencing*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1843**(5): p. 836-45.
124. Forbes, J.M., M.T. Coughlan, and M.E. Cooper, *Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes*. Diabetes, 2008. **57**(6): p. 1446-54.
125. Misawa, T., et al., *Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome*. Nat Immunol, 2013. **14**(5): p. 454-60.
126. Tschopp, J. and K. Schroder, *NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production?* Nat Rev Immunol, 2010. **10**(3): p. 210-5.
127. Wei, M., et al., *Effects of ROS-relative NF-kappaB signaling on high glucose-induced TLR4 and MCP-1 expression in podocyte injury*. Mol Immunol, 2015. **68**(2 Pt A): p. 261-71.
128. Mirza, R.E., et al., *Sustained inflammasome activity in macrophages impairs wound healing in type 2 diabetic humans and mice*. Diabetes, 2014. **63**(3): p. 1103-14.
129. Sakai, N. and T. Wada, *Revisiting inflammation in diabetic nephropathy: the role of the Nlrp3 inflammasome in glomerular resident cells*. Kidney Int, 2015. **87**(1): p. 12-4.
130. Granata, S., et al., *NLRP3 inflammasome activation in dialyzed chronic kidney disease patients*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0122272.
131. Brandes, R.P., N. Weissmann, and K. Schroder, *Redox-mediated signal transduction by cardiovascular Nox NADPH oxidases*. J Mol Cell Cardiol, 2014. **73**: p. 70-9.
132. Parving, H.H., et al., *Aliskiren combined with losartan in type 2 diabetes and nephropathy*. N Engl J Med, 2008. **358**(23): p. 2433-46.
133. Rodriguez-Vargas, J.M., et al., *ROS-induced DNA damage and PARP-1 are required for optimal induction of starvation-induced autophagy*. Cell Res, 2012. **22**(7): p. 1181-98.
134. Szabo, C., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors ameliorate nephropathy of type 2 diabetic Leprdb/db mice*. Diabetes, 2006. **55**(11): p. 3004-12.
135. Li, J., et al., *Minocycline Protects Against NLRP3 Inflammasome-Induced Inflammation and P53-Associated Apoptosis in Early Brain Injury After Subarachnoid Hemorrhage*. Mol Neurobiol, 2015.
136. Cai, Z., et al., *Increases in beta-amyloid protein in the hippocampus caused by diabetic metabolic disorder are blocked by minocycline through inhibition of NF-kappaB pathway activation*. Pharmacol Rep, 2011. **63**(2): p. 381-91.

7 Danksagung

Als erstes möchte ich an dieser Stelle meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Berend Isermann danken, der mir die Möglichkeit gegeben und die Mittel zur Verfügung gestellt hat, meine Promotion durchzuführen. Er unterstützte mich in jeder Phase außerordentlich intensiv, professionell und motivierend.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Khurram Shahzad und Fabian Bock, die zu jeder Zeit ein offenes Ohr für Fragen hatten und mich mit Geduld und Hilfsbereitschaft bestärkten.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Wei Dong, der mir viele praktische Hinweise im Labor zeigte und mir so ein effektiveres Arbeiten ermöglichte.

Allen meinen Korrekturlesern und Korrekturleserinnen ist dieser Absatz gewidmet. Ich weiß es ist anstrengend und manchmal schwer nachzuvollziehen, insbesondere den „Fachfremden“ gebührt mein Respekt.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie für die Unterstützung. Ohne den Rückhalt meiner Eltern und den Einsatz meiner Frau wäre vieles nicht möglich gewesen.

8 Ehrenerklärung

Name: Christian Friedrich Wacker

Anschrift: Bonner Straße 17, 76185 Karlsruhe

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Das Nlrp3-Inflammasom verstärkt die diabetische Nephropathie in ortsständigen Zellen der Niere“

im Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg

mit der Unterstützung durch Prof. Dr. med. Berend Isermann

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- und ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 02.11.2016

Christian Wacker

9 Publikationen

Christian Wacker
geboren am 24.03.1985 in Stuttgart

Publikationen

K. Shahzad, F. Bock, *C. Wacker*, H. Wang, S. Ranjan, J. Wolter, S. Stoyanov, K. Reymann, M. Thati, B. Isermann **Activation of the inflammasome in glomerular cells aggravates experimental diabetic nephropathy. *EASD 2013 poster presentation***

K. Shahzad, F. Bock, W. Dong, H. Wang, S. Kopf, S. Kohli, M. Al-Dabet, R. Biemann, S. Ranjan, J. Wolter, *C. Wacker*, S. Stoyanov, K. Reymann, P. Söderkvist, O. Groß, V. Schwenger, S. Pahernik, P. P. Nawroth, H.-J. Gröne, T. Madhusudhan, B. Isermann ***Nlrp3-inflammasome activation in non-myeloid-derived cells aggravates diabetic nephropathy.*** *Kidney Int*, 2015. **87**(1): p. 74-84.