

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



**Farnesoid-X-Rezeptor-Agonismus schützt vor diabetischer Tubulopathie und wirkt
ergänzend zur Standardtherapie der RAAS-Inhibition**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades
Dr. med.
(doctor medicinae)
an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Andi Marquardt
aus Magdeburg
Magdeburg 2017

Bibliographische Beschreibung:

Marquardt, Andi:

Farnesoid-X-Rezeptor-Agonismus schützt vor diabetischer Tubulopathie und wirkt ergänzend zur Standardtherapie der RAAS-Inhibition. – 2017. – 48 Blätter, 20 Abbildungen, 70 Referenzen.

Kurzreferat

Bis heute etablierte Therapien der diabetischen Nephropathie (dNP) sind lediglich in der Lage die Progression der Erkrankung zu verzögern. Ein Grund für die insuffiziente Effektivität der Standardtherapien kann ein mangelhafter Effekt auf das tubuläre Kompartiment sein. Das Gallensäurederivat und chemische Chaperon TUDCA (Tauroursodeoxycholsäure, T) verbessert maladaptive Stress-Reaktionen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und wirkt lindernd auf die dNP. Zusätzlich aktiviert TUDCA den Farnesoid-X-Rezeptor (FXR), welcher überwiegend tubulär exprimiert wird. Wir stellten die Hypothese auf, dass TUDCA maladaptive ER-Stress-Reaktionen *via* FXR-Agonismus spezifisch in tubulären Zellen positiv beeinflusst. Tatsächlich induzierte TUDCA die Expression FXR-abhängiger Gene (SOCS3, DDAH1) in tubulären Zellen, nicht aber in endothelialen Zellen oder Podozyten. *In-vivo* reduzierte TUDCA sowohl glomeruläre als auch tubuläre Schäden in db/db Mäusen. Der FXR-Antagonist Z-Guggulsteron (Gu) hob den ER-stabilisierenden und nephroprotektiven Effekt von TUDCA nahezu vollständig auf. Interessanterweise annullierte Z-Guggulsteron (Gu) die tubuläre, aber nicht die glomeruläre Protektion durch TUDCA. Eine Kombinationstherapie (E+T) aus TUDCA und dem ACE-Inhibitor (ACEi) Enalapril (E) reduzierte die Albuminurie in db/db Mäusen effektiver als die jeweilige Monotherapie. Beide Einzeltherapien reduzierten glomeruläre Schäden, doch nur TUDCA zeigte eine zusätzliche Linderung tubulärer Pathologien. Diese Arbeit zeigt, dass FXR-Agonismus *via* TUDCA eine tubulospezifische Protektion innerhalb der dNP, zusätzlich zum nephroprotektiven Effekt durch Inhibition des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), bereitstellt.

Schlüsselwörter

Diabetes mellitus (DM) – Diabetische Nephropathie (dNP) – FXR-Agonismus – ACE-Inhibitoren – RAAS-Inhibition (RAASi) – TUDCA (Tauroursodeoxycholsäure) – Glomerulopathie – Tubulopathie – ER-Stress

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
Abbildungsverzeichnis	7
1 Einleitung	8
2 Materialien und Methoden	10
2.1 Antikörper, Reagenzien und Geräte.....	10
2.2 Mausmodell und <i>in-vivo</i> Interventionen	11
2.2.1 <i>Diabetisches Mausmodell (db/db Maus)</i>	11
2.2.2 <i>In-vivo Interventionen</i>	11
2.2.3 <i>Harngewinnung und ΔUACR-Bestimmung</i>	13
2.2.4 <i>Blutgewinnung und Bestimmung der Blutglukosekonzentration</i>	13
2.3 Histologische Analyse der Nieren	14
2.3.1 <i>PAS-Färbung (Periodic Acid-Schiff)</i>	14
2.3.2 <i>Determination der FMA (fractional mesangial area)</i>	14
2.3.3 <i>Analyse der glomerulären und tubulären Dilatation</i>	15
2.4 Humane renale Biopsien	15
2.5 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	16
2.6 Angiotensin II (AT II) - Bestimmung.....	16
2.7 Immunfluoreszenz (IF)	17
2.8 Proteinisolation	18
2.9 Immunoblot.....	18
2.10 Nephroseq-Datenbank.....	19
2.11 <i>In-vitro</i> Experiment (Zellkulturelle Arbeit).....	19
2.12 Statistische Analyse	20
3 Ergebnisse	21
3.1 FXR und FXR-abhängige Gene werden vorrangig in Tubuluszellen exprimiert	21
3.2 TUDCA schützt das tubuläre Kompartiment in db/db Mäusen <i>via</i> FXR	23
3.3 TUDCA wirkt ergänzend zur Standardtherapie der RAASi in db/db Mäusen	28
3.4 TUDCA reduziert, im Gegensatz zu Enalapril, ER-Stress in tubulären Zellen...	33
4 Diskussion	36
5 Zusammenfassung der Ergebnisse	40
6 Referenzen	41
7 Danksagung	46
8 Ehrenerklärung	47
9 Publikationen und Darstellung des Bildungsweges	48

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ACEi	Angiotensin Converting Enzyme-Inhibitor
ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
APS	Ammoniumpersulfat
AT II	Angiotensin II
ATF6	Aktivierender Transkriptionsfaktor 6 (activating transcription factor 6)
BARs	Gallensäure-Rezeptoren (bile acid receptors)
BCA	Bicinchoninsäure (bicinchoninic acid)
C	Kontrolle (Control)
C/EBP	CCAAT/verstärkendes Bindungsprotein (CCAAT/enhancer-binding-protein)
CHOP	C/EBP-homologes Protein
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
db/db	Diabetisches Mausmodell
db/m	Nicht-diabetische Kontrollmäuse
DDAH1	Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase 1
DM	Diabetes mellitus
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's F-12 Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNP	Diabetische Nephropathie
DPBS	Dulbecco's Phosphatpuffer (Dulbecco's phosphate buffered saline)
E	Enalapril
E+T	Enalapril + TUDCA
EA.hy926	Humane Endothelzellen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat (Antikoagulans)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FBS	Fetales Rinderserum (fetal bovine serum)
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FMA	Extrazellulärmatrixmarker (fractional mesangial area)
FXR	Farnesoid-X-Rezeptor (= NR1H4)

GBM	Glomeruläre Basalmembran
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor (G-protein-coupled receptor)
Gu	Z-Guggulsteron
HKC-8	Humane proximale Tubulusepithelzellen (human proximal tubular epithelial cells)
h.Podo	Humane Podozyten
HRP	Meerrettich Peroxidase (horseradish peroxidase)
IF	Immunfluoreszenz
IFN- γ	Interferon Gamma
IP	Intraperitoneal (Applikationsform)
IRE1	Inositol-requiring enzyme 1
ITS	Insulin-Transferrin-Selenium Medium (für Zellkultur)
JAK	Januskinase
KG	Körpergewicht
KIM1	Marker der Nierenschädigung (kidney injury molecule 1)
L-NMMA	N ^ε -Monomethyl-L-Arginin
LEP	Leptin
LEP-R	Leptin-Rezeptor
M.O.M.	Mouse on mouse
NO	Stickstoffmonoxid
(e)NOS	(endotheliale) Stickstoffmonoxid-Synthase
NR1H4	Nukleärer Rezeptor der Subfamilie 1 Gruppe H Mitglied 4 (nuclear receptor subfamily 1 group H member 4 = FXR)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS	Periodic acid-Schiff (Färbung)
PBS	Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)
PBST	Phosphatpuffer-Tween (phosphate buffered saline-tween 20)
PCI	Proteaseninhibitormix (protease cocktail inhibitors)
PERK	Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVE	Phaseolus vulgaris erythro-agglutinin
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RAASi	RAAS-Inhibition
RIPA-Puffer	Radioimmunoprecipitation Assay-Puffer

RPMI 1640	Nährmedium für Zellkultur (Roswell Park Memorial Institute - 1640)
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate) für PAGE
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (standard error of the mean)
SOCS3	Suppressor of cytokine signaling 3
STAT	Signal transducers and activators of transcription
T	TUDCA
T+Gu	TUDCA + Z-Guggulsteron
TBST	Tris-Puffer (tris-buffered saline tween 20)
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TGR5	Takeda G-Protein-gekoppelter Rezeptor 5 (Takeda G-protein-coupled receptor 5)
TIM1	Marker der Nierenschädigung (T-cell transmembrane, immunoglobulin and mucin 1 [= KIM1])
TUDCA	Tauroursodeoxycholsäure (tauroursodeoxycholic acid)
UACR	Albumin-Kreatinin Quotient im Urin (Urine Albumin-to-Creatinine Ratio)
UPR	Antwort auf ungefaltete Proteine (unfolded protein response)
WB	Western Blot

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Versuchsablauf der Interventionsstudie.....	12
Abbildung 2: FMA-Determination mittels ImageJ.....	15
Abbildung 3: Nephroseq zeigt überwiegend tubulointerstitielle Expression von FXR, SOCS3 und DDAH1	21
Abbildung 4: Vornehmlich tubuläre Expression von SOCS3 und DDAH1 in humanen- und Mausnieren	22
Abbildung 5: Die SOCS3- und DDAH1-Expression ist in-vitro ausschließlich in HKC-8 induzierbar	22
Abbildung 6: TUDCA zeigt keine Auswirkungen auf die Blutglukosekonzentration in db/db Mäusen.....	23
Abbildung 7: TUDCA induziert die Expression von SOCS3 und DDAH1 in vivo.....	23
Abbildung 8: TUDCA induziert die SOCS3- und DDAH1-Expression vorrangig in Tubuluszellen.....	24
Abbildung 9: TUDCA reduziert die ATF6- und CHOP-Expression in Nieren von db/db Mäusen.....	25
Abbildung 10: TUDCA lindert glomeruläre Schäden FXR-unabhängig und reduziert die Δ UACR durch Bereitstellung tubuloprotektiver FXR-abhängiger Effekte.....	26
Abbildung 11: TUDCA schützt das tubuläre Kompartiment FXR-abhängig.....	27
Abbildung 12: TUDCA zeigt keine signifikante Beeinflussung der Blutglukosekonzentration und der AT II-Konzentration.....	28
Abbildung 13: TUDCA in Kombination mit Enalapril führt zu einer zusätzlichen Reduktion der Δ UACR in db/db Mäusen.....	29
Abbildung 14: TUDCA in Kombination mit Enalapril führt zu einer signifikanten Reduktion glomerulopathischer Effekte in db/db Mäusen.....	30
Abbildung 15: TUDCA verbessert die elektronenmikroskopische Struktur der GBM in db/db Mäusen	31
Abbildung 16: TUDCA reduziert, im Gegensatz zu Enalapril, tubuläre Schäden	32
Abbildung 17: TUDCA reduziert, im Gegensatz zu Enalapril, ER-Stress-Mediatoren in renalen Extrakten.....	33
Abbildung 18: TUDCA reduziert, im Gegenteil zu Enalapril, ER-Stress-Mediatoren im Nierenmark und der Nierenrinde.....	34
Abbildung 19: TUDCA reduziert ER-Stress im tubulären Kompartiment FXR-abhängig, während es im glomerulären Kompartiment ER-Stress-Mediatoren unabhängig vom FXR vermindert.....	35
Abbildung 20: Hypothetisches Modell der FXR-abhängigen und -unabhängigen Wirkungsweise von TUDCA.....	36

1 Einleitung

Früheren Hochrechnungen zufolge schätzte man, dass die weltweite Prävalenz der an Diabetes mellitus (DM) erkrankten Menschen von 171 Millionen im Jahr 2000 auf bis zu 336 Millionen im Jahr 2030 ansteigen wird [1]. Heutzutage weiß man, dass jetzt schon mehr Menschen weltweit mit Diabetes leben, als früher für das Jahr 2030 vorhergesagt wurden. Nach aktuellen Ergebnissen (2016) litten bereits 2014 ca. 422 Millionen Menschen (Alter: mind. 18 Jahre) weltweit an DM [2]. Ungefähr ein Drittel aller Diabetespatienten entwickeln im Laufe ihrer Erkrankung eine diabetische Nephropathie (dNP). Darüber hinaus ist die dNP mit einem Anteil von über 40 % an den neu diagnostizierten terminalen Nierenerkrankungen beteiligt [3-5]. Neben einer möglichst physiologischen Einstellung der Blutglukosekonzentration steht als einziges etabliertes Therapeutikum die Inhibition des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) zur Verfügung. Während eine strikte Blutzuckereinstellung und ein frühestmöglicher Therapiebeginn mittels RAAS-Inhibitoren (RAASi) in Frühstadien der dNP zu einer signifikanten Linderung führen [6], vermittelt die bis zum heutigen Tage unveränderte Standardtherapie der RAASi lediglich eine Verlangsamung der Progression der Nierenerkrankung [7-9]. Ein Grund für diese insuffiziente Therapie könnte der vorrangig glomeruloprotektive Effekt der Inhibition des RAAS [6, 10, 11], bei nur spärlichem Nachweis eines protektiven Effektes auf das tubuläre Kompartiment [12], sein. Andere Studien ziehen sogar einen Zusammenhang zwischen einer RAASi-Therapie und akutem Nierenversagen bis hin zu Tubulonekrosen in Betracht [13, 14], was auf eine zu ausgeprägte Hypotension zurückgeführt wird. Dies zeigt auf, wie stark die Ergebnisse bezüglich einer Protektion des tubulären Kompartiments durch RAASi divergieren.

Bei der Pathogenese des DM und der daraus resultierenden dNP handelt es sich um ein multifaktorielles Geschehen [15], welches viele Ansatzpunkte für eine mögliche Therapie bereitstellt. Eine zentrale Rolle wird in den letzten Jahren fehlerhaften Signalkaskaden innerhalb einer Zelle, speziell einer gestörten Funktion des Endoplasmatischen Retikulums (ER), zugeschrieben [16]. Das ER ist in Verbindung mit Ribosomen das Hauptkompartiment der Proteinsynthese, Proteinfaltung und weiterer posttranslationaler Modifikationen. Doch was geschieht, wenn funktionslose pathologisch gefaltete Proteine innerhalb des ER akkumulieren? Die Konsequenz ist eine charakteristische Stressreaktion des ER. Diese äußert sich in der Aktivierung unterschiedlicher ER-abhängiger Signalkaskaden, die der Elimination der fehlgefalteten Proteine und damit einer Reduktion des ER-Stresses (unfolded protein

response, UPR) dienen [17]. Primär kommt es zu einer vermehrten Synthese von Chaperonen, die die Proteinfaltung optimieren und somit den ER-Stress reduzieren. Sekundär besitzt eine Zelle sensible sensorische Mechanismen, die einen weiterhin erhöhten Zellstress (ER-Stress) detektieren können und somit die UPR induzieren [18]. Die etablierten Regulationsmechanismen der UPR bestehen aus der Proteinkinase IRE1 (Inositol-requiring enzyme 1), PERK (Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase) und ATF6 (aktivierender Transkriptionsfaktor 6) [19]. Sollte die zusätzliche Synthese von Chaperonen und der Versuch eine zelluläre Homöostase wieder herzustellen erfolglos sein, führt die UPR schließlich zum programmierten Zelltod [20] aufgrund einer Überexpression des proapoptotischen Proteins CHOP (C/EBP-homologes Protein) [21].

In den letzten Jahren konnte *in-vitro* gezeigt werden, dass insbesondere das chemische Chaperon Tauroursodeoxycholsäure (tauroursodeoxycholic acid, TUDCA, T), sowohl durch seine Wirkung als Chaperon, als auch durch die Regulation des UPR ausgeprägtem ER-Stress entgegenwirken kann [22-25]. Dies führt zu der Annahme, dass die seit Jahren in der Klinik eingesetzten Gallensäurederivate [26-28] eine effektive und sichere Behandlungsoption für die dNP darstellen könnten. Interessanterweise konnte bereits *in-vitro* nachgewiesen werden, dass TUDCA (T) einen protektiven Effekt sowohl auf Zellen des tubulären Kompartiments [29, 30] als auch des glomerulären Kompartiments besitzt [31]. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass TUDCA (T) *in-vivo* einen protektiven Effekt auf beide Kompartimente aufweisen könnte, was aber bisher unklar ist. Über welche Rezeptoren TUDCA (T) die anzunehmenden glomeruloprotektiven- und tubuloprotektiven Effekte verwirklicht, ist bis heute ebenfalls ungeklärt. Wie auch andere Gallensäurederivate wirkt TUDCA (T) als Agonist am Farnesoid-X-Rezeptor (FXR), welcher nachweislich in renalen tubulären Zellen exprimiert wird [32, 33]. Diese Erkenntnisse brachten uns zu der Annahme, dass TUDCA (T) nicht nur einen glomeruloprotektiven Effekt, mittels Stabilisierung der Homöostase des ER, aufweist, sondern einen zusätzlichen protektiven Effekt auf das tubuläre Kompartiment, mittels Aktivierung des FXR, vermittelt. Ein dabei zu erwartender Vorteil wäre, dass TUDCA (T) unabhängig vom RAAS zu agieren scheint und durch die kombinierte Gabe der Standardtherapie (RAASi) und des Gallensäurederivats, der starke glomeruloprotektive Effekt der RAASi mit einem ER-stabilisierenden und tubuloprotektiven Effekt der Gallensäure kombiniert werden könnte. Dies könnte einen therapeutischen Mehrwert gegenüber einer Monotherapie mit RAASi darstellen.

2 Materialien und Methoden

2.1 Antikörper, Reagenzien und Geräte

Die folgenden Antikörper wurden für das Material aus der *in-vivo* Studie verwendet: Polyklonaler Ziege-anti-DDAH1 Antikörper und polyklonaler Hase-anti-SOCS3 Antikörper (erworben von Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA); Polyklonaler Hase-anti-TIM1 (= KIM1) Antikörper (erworben von Abcam, Cambridge, UK); Monoklonaler Maus-anti-ATF6 Antikörper und polyklonaler Hase-anti-CHOP Antikörper (erworben von Novusbio, Minneapolis, USA); Polyklonaler Hase-anti-GAPDH Antikörper (erworben von Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); TEXAS RED anti-Hase/Maus/Ziege Antikörper (erworben von Vector Laboratories [BIOZOL Diagnostica GmbH], Eching, Deutschland); HRP-konjugierte Antikörper (erworben von Cell Signaling Technology, Danvers, USA).

Zusätzlich wurden folgende Reagenzien und Geräte verwendet: Tauroursodeoxycholsäure (TUDCA)-Natrium-Salz (erworben von Merck Millipore, Billerica, USA); Z-Guggulsteron (erworben von Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA); Methylzellulose, Angiotensin II ELISA, Enalapril und Affen-Serum (erworben von Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); Maus Albumin ELISA (Bethyl Laboratories, Montgomery, USA); DMEM/F12, RPMI 1640 Medium, Trypsin-EDTA, Penicillin, Streptomycin, DPBS, FBS (erworben von Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); ITS (Insulin-Transferrin-Selenium Medium) und HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure; erworben von PAA Laboratories, Pasching, Österreich); Interferon Gamma (IFN- γ ; erworben von Cell Sciences, Newburyport, USA); Accu-Chek Glucometer inkl. Akku-Chek Teststreifen und protease cocktail inhibitors (PCI; erworben von Roche Diabetes Care GmbH, Mannheim, Deutschland); Nonidet P-40 (erworben von AppliChem, Gatersleben, Deutschland); BCA-Reagenz (erworben von ThermoScientific, Waltham, USA); Vectashield mounting medium mit DAPI, PVE und M.O.M. Kit (erworben von Vector Laboratories [BIOZOL Diagnostica GmbH], Eching, Deutschland); Ammoniumpersulfat (APS; erworben von Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland); PVDF Membranen ImmobilonTM und HRP-Substrat (erworben von Merck Millipore, Billerica, USA); Period-Säure, Schiff-Reagenz, Mayer-Hämatoxylin-Lösung und Dimethylsulfoxid (DMSO; erworben von Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland).

2.2 Mausmodell und *in-vivo* Interventionen

2.2.1 Diabetisches Mausmodell (db/db Maus)

Die db/db Maus zeichnet sich durch eine Punktmutation innerhalb ihres Genoms aus (Chromosom 4, Austausch von Glycin in Threonin) [34], welche einen Defekt des Leptinrezeptors (LEP-R) nach sich zieht [35]. Durch diesen Defekt kann das Hormon Leptin (LEP) nicht mehr im Hypothalamus an den dafür vorgesehenen LEP-R binden. LEP ist verantwortlich für das Hungergefühl und den Energiehaushalt eines Individuums. Infolge der Mutation des LEP-R in db/db Mäusen kommt es zu einem nicht reglementierten Hungergefühl und zu einer übermäßigen Nahrungsaufnahme. Diese führt zu einer pathologischen Gewichtszunahme, gepaart mit Dyslipidämie und dauerhaft erhöhten Blutglukosekonzentrationen [36, 37]. Innerhalb kürzester Zeit (sieben bis zehn Wochen nach Geburt) entwickeln die Tiere eine signifikante Hyperglykämie und Hyperinsulinämie, bei gleichzeitig signifikanter Gewichtszunahme (Technisches Datenblatt bereitgestellt von Janvier-Labs: http://www.janvier-labs.com/tl_files/_media/images/FICHE_RESEARCH_MODEL_DIABETIC.pdf). Im Alter von acht bis zwölf Wochen weisen die Mäuse eine signifikante Proteinurie auf, die, wenn nicht interveniert wird, zu einer stetigen Chronifizierung der dNP führt. Mit einem Alter von 16 Wochen starteten wir die Interventionsstudie.

2.2.2 *In-vivo* Interventionen

Kommerziell erworbene männliche db/db Mäuse (C57BL/KSJrj-db, Janvier, France) wurden in einem Alter von 16 Wochen zufällig einer von insgesamt fünf Interventionsgruppen zugeteilt: db/db Kontrollmäuse (db/db C, N=10); db/db Mäuse mit ACEi-Therapie (Enalapril [E], 50 mg/l per os im Trinkwasser [38], N=6); db/db Mäuse mit TUDCA-Therapie (T, 150 mg/kg KG, täglich [22], IP, N=8); db/db Mäuse mit Kombinationstherapie (E+T, N=8); db/db Mäuse mit TUDCA-Therapie und einem kommerziellen FXR-Inhibitor (Z-Guggulsteron, CAS39025-23-5; T+Gu, c_{Gu} = 10 mg/kg KG, täglich, IP, N=7). Z-Guggulsteron wurde in 100 mM DMSO aufgelöst und in 1 % Methylzellulose verdünnt [39]. Die anfänglichen 10 db/db Kontrollmäuse (db/db C) wurden in zwei Kontrollgruppen eingeteilt. Eine Hälfte (N=5) erhielt 100 mM DMSO verdünnt in 1 % Methylzellulose, während die andere Hälfte (N=5) PBS appliziert bekam. Zusätzlich verwendeten wir nicht diabetische Kontrollmäuse (db/m C, N=6), um physiologische Vergleichsergebnisse generieren zu können.

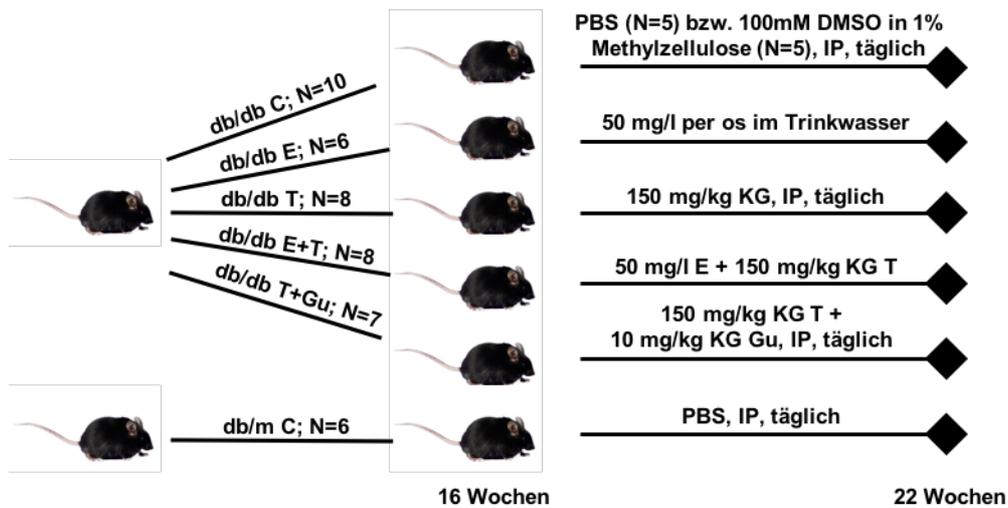


Abbildung 1: Versuchsablauf der Interventionsstudie

Nach sechswöchiger Intervention opferten wir die Mäuse. Hierzu applizierten wir 100 μ l Heparin-Natrium-Lösung (Braun, 5000 I.E./ml), gefolgt von einer letalen Dosis (250 μ l) eines Anästhetikums (Ketanest [Esketaminhydrochlorid] 25 mg/ml). Nach erloschenem Zwischenzehenreflex erfolgte die Fixierung und die oberflächliche Desinfektion der Maus. Darauf folgend wurde von ventral eine Longitudinalinzision entlang der Mediansagittalebene bis unter das Peritoneum durchgeführt, um den Situs zu eröffnen. Es erfolgte die Punktion der Vena cava inferior mit anschließender Aspiration frischem Blutes für eine spätere Bestimmung der Angiotensin II (AT II) – Konzentration. Nachfolgend eröffneten wir den Thorax, um per intrakardialer Injektion eine Perfusion der Organe mit eiskalter PBS zu ermöglichen [22, 40, 41]. Die anschließende Resektion einer Niere erfolgte nach stattgehabter Perfusion unter Ligation der zu- und abführenden Gefäße. Darauf folgend wurde die Niere in ungleich große Teile präpariert und für zukünftige Protein- und RNA-Bestimmungen konserviert. Anschließend erfolgte die intrakardiale Perfusion der übrigen Organe mittels 4-%igem Paraformaldehyd, bevor die zweite Niere unter gleichen Bedingungen entnommen und separiert wurde, um sie darauf folgend in Paraffin einzubetten und dem Zuschnitt mittels Mikrotom zuzuführen.

Dieses Tierexperiment wurde mit der Zustimmung des Landesverwaltungsamtes Halle (Sachsen-Anhalt, Deutschland, Aktenzeichen: 42502-2-1085) und unter Berücksichtigung aller Vorschriften und Standards durchgeführt.

2.2.3 Harngewinnung und Δ UACR-Bestimmung

Für die Gewinnung eines „Sammelurins“ wurden die Mäuse, zu zwei Zeitpunkten, separat für 12 Stunden in metabolische Käfige überführt. Diese ermöglichen ein gezieltes Auffangen des ausgeschiedenen Urins. Die erste Harngewinnung erfolgte im Alter von 16 Wochen kurz vor Start der Interventionsstudie. Die zweite Harngewinnung erfolgte im Alter von 22 Wochen unmittelbar nach Ende der Interventionsstudie. Zur Bestimmung der Urin-Albumin-Konzentration wurde ein kommerziell erhältlicher Maus Albumin ELISA (Mouse Albumin ELISA quantification set), unter Berücksichtigung und Einhaltung der Herstellerangaben, verwendet. Die Kreatinin-Konzentration wurde mithilfe eines kommerziell erhältlichen Messsystems (X-Pand automatisierte Plattform, Siemens, Eschborn, Deutschland) [22, 40-42], welches nach der modifizierten Jaffé-Methode arbeitet, gemessen. Durch Division beider Werte ließ sich die UACR (Urine Albumin-to-Creatinine Ratio) ermitteln. Die Bestimmung des Δ UACR erfolgte durch Division des absoluten Messwertes ($\mu\text{g}/\text{mg}$) am Ende, mit dem absoluten Messwert ($\mu\text{g}/\text{mg}$) der UACR zu Beginn der Interventionsstudie. Durch diese Methode konnte ein direkter Vergleich für jede einzelne Maus erreicht werden.

2.2.4 Blutgewinnung und Bestimmung der Blutglukosekonzentration

Die Bestimmung der Blutglukosekonzentration erfolgte wöchentlich, durch Punktion der Schwanzvene und anschließender Messung mittels Accu-Chek Glucometer unter Verwendung der dazugehörigen Teststreifen.

2.3 Histologische Analyse der Nieren

2.3.1 PAS-Färbung (Periodic Acid-Schiff)

Die angefertigten Paraffinschnitte des Nierengewebes wurden zuerst deparaffinisiert und anschließend rehydriert. Hierfür wurden die Objektträger für 30 Minuten bei 65°C erhitzt und anschließend für zweimal 10 Minuten in Xylol inkubiert, bevor die Rehydrierung mittels absteigender Alkoholreihe erfolgte. Zur anschließenden Reinigung von eventuell anhaftenden Xylol- oder Ethanolspuren erfolgte ein zweimaliger Waschvorgang in PBS für jeweils 5 Minuten. Zur Oxidation des Gewebes verwendeten wir 0,5-%ige Period-Säure für 5 Minuten, um anschließend die Färbung mithilfe des kommerziell erhältlichen Schiff-Reagenz (gebrauchsfertig, 15 Minuten) zu ermöglichen. Nach einem Waschvorgang erfolgte die Gegenfärbung mithilfe der kommerziell erworbenen Mayer-Hämatoxylin-Lösung (gebrauchsfertig, 1 Minute) [40]. Zum Abschluss wurden die Objektträger gereinigt, durch eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert und anschließend mithilfe eines synthetischen Mediums konserviert (ROTHI Histo Kit).

2.3.2 Determination der FMA (fractional mesangial area)

Für die Bestimmung der FMA wurden Paraffinschnitte mittels PAS-Färbung angefärbt. Bei jedem Glomerulum wurde anfänglich ausschließlich die Fläche des Kapillarknäuels (rote Umrandung in Abb. 2) erfasst [40]. Anschließend wurde jedes Bild einer Aufnahmeserie mithilfe der Software ImageJ in ein dem Original am ähnlichsten erscheinendes schwarz-weiß-Bild überführt. Dies geschah unter Verwendung des sogenannten Thresholdings. Beim Thresholding wird das Bild so lange angepasst, bis es den gesuchten Farbton (in unserem Fall die dunkelrote Fläche, welche die PAS-positive Fläche beschreibt und die FMA repräsentiert) adäquat determiniert. Dieser Threshold-Wert wurde für alle Bilder einer Aufnahmeserie konstant gehalten, um vergleichbare Ergebnisse zu generieren. Das in Abb. 2 gezeigte Glomerulum (links, original; rechts, schwarz-weiß für die Bestimmung mit ImageJ; rote Linie umrandet das zu determinierende Kapillarknäuel) zeigt eine exemplarische Darstellung der Aufbereitung für die FMA-Determination.

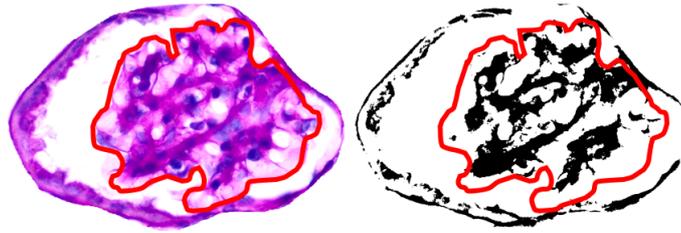


Abbildung 2: FMA-Determination mittels ImageJ

Links: Dargestellt ist ein mithilfe des Thresholdings aufbereitetes Glomerulum; **Rechts:** Ein mithilfe der Software ImageJ in schwarz-weiß überführtes Bild des linken Glomerulums für die Bestimmung der PAS-positiven Fläche, welche die fractional mesangial area (FMA) repräsentiert. Die rote Umrandung stellt das zu determinierende Kapillarknäuel dar.

2.3.3 Analysierung der glomerulären und tubulären Dilatation

Die Analyse der glomerulären und tubulären Dilatation erfolgte ebenfalls mit der Software ImageJ. Um zu garantieren, dass es sich um den maximalen Durchmesser handelt, wurden bei benachbarten Schnitten ausschließlich die größten Glomeruli und Tubuli bestimmt. Um eine repräsentative Anzahl zu erhalten, wurden pro Interventionsgruppe mindestens 30 zufällig ausgewählte Glomeruli und Tubuli analysiert.

Alle Aufnahmen wurden mithilfe eines Olympus BX43 Mikroskops mit dazugehöriger XC30 Kamera und Software (Olympus Cell Sens Dimension 1.5 Image Software) aufgenommen. Während der Aufnahmen wurden die Helligkeits- und Kontrasteinstellungen konstant gehalten.

2.4 Humane renale Biopsien

Humane Nierenstanzbiopsien von ausschließlich nierenkranken Individuen (ohne Komorbiditäten) wurden von der Gewebebank des Nationalen Centrum für Tumorerkrankungen (NCT, Heidelberg, Deutschland, mit freundlicher Genehmigung von Dr. Schwenger, Ethik-Votum 204/2004) bezogen.

2.5 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Um hochauflösende Bilder der glomerulären Basalmembran (GBM) darstellen zu können, fertigten wir transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen an. Zur Verwirklichung dieses Schrittes wurde das renale Gewebe mittels einer auf pH 7,4 gepufferten Lösung, bestehend aus 2,5-%igem Glutaraldehyd, 2,5-%igem Polyvidon 25 und 0,1 mM Natriumcacodylat, fixiert. Nach wiederholtem Waschen in 0,1 mM Natriumcacodylat erfolgte eine einstündige post-Fixation in der o.g. Lösung mit Zusatz von 2-%igem Osmiumtetroxid und 1,5-%igem Kaliumferrocyanid. Es folgten ein erneutes Waschen, die Kontrastierung mittels Uranylacetat, die Dehydrierung des Gewebes mittels aufsteigender Alkoholreihe und die anschließende Einbettung des Gewebes in Glycidylether-100-basiertem Resin [22]. Ultradünnschnitte wurden mit einem Reichert Ultracut S Ultramikrotom (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) angefertigt. Für die Aufnahmen wurde ein EM 10 CR Elektronenmikroskop der Carl Zeiss Microscopy GmbH (Oberkochen, Deutschland) verwendet. Die Dicke der GBM wurde unter Verwendung der Software ImageJ bestimmt, wobei eine GBM an 15 unterschiedlichen und gleichmäßig verteilten Lokationen gemessen wurde. Pro Interventionsgruppe wurden mindestens 30 zufällig ausgewählte GBM analysiert.

2.6 Angiotensin II (AT II) - Bestimmung

Blut wurde über die Vena cava inferior der zuvor antikoagulierten 22 Wochen alten Maus (500 I.E. Heparin-Natrium-Lösung, 10 Minuten prä-OP, IP [Braun, 5000 I.E./ml]) gewonnen und bis zur anschließenden Zentrifugation fachgerecht bei 4°C gelagert [43]. Nach Abschluss der Präparation aller Tiere erfolgte die Zentrifugation der zuvor gewonnenen Blutproben für 10 Minuten bei 2000 g. Hierdurch konnte eine Auftrennung in Blutplasma und zelluläre Bestandteile erreicht werden. Die Plasmaproben wurden bis zur Analyse bei -80°C gelagert. Die darauffolgende Konzentrationsbestimmung von AT II wurde mithilfe eines kommerziell erhältlichen Maus Angiotensin II ELISA (Angiotensin II EIA, Sigma Aldrich) unter Befolgung der Herstellerinstruktionen durchgeführt.

2.7 Immunfluoreszenz (IF)

In Paraffin eingebettete Gewebeschnitte wurden deparaffinisiert und rehydriert. Hierzu wurden die Objektträger für 30 Minuten bei 65°C inkubiert, anschließend zweimal für jeweils 10 Minuten in Xylol belassen und darauffolgend in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Die Demaskierung der gesuchten Antigene (Antigen retrieval) erfolgte durch dreißigminütiges Kochen in einer Antigen unmasking solution (Vector # H-3300; 1:100). Diese Antigen unmasking solution zeichnet sich durch einen auf Zitratpuffer basierenden pH-Wert von 6 aus. Dieser stabile und leicht saure pH-Wert stellte für die von uns gesuchten Antigene (SOCS3, DDAH1, ATF6, CHOP) eine adäquate Demaskierung bereit und ermöglichte so die Anfärbung der gesuchten Strukturen.

Da es sich bei dem von uns verwendeten Antikörper gegen ATF6 in Mausnieren um einen ebenfalls aus Mäusen gewonnenen Antikörper handelt, waren wir gezwungen spezielle mouse on mouse (M.O.M.) Reagenzien zu nutzen. Diese M.O.M. Reagenzien sind als M.O.M. Kits kommerziell erhältlich und wurden speziell für diese Gegebenheiten konzipiert. Mithilfe einer einstündigen Inkubation in M.O.M. blocking solution, gefolgt von einer zehnminütigen Inkubation in M.O.M. protein concentrate solution (Herstellerangaben), konnte eine ATF6-Anfärbung ermöglicht werden. Die Gewebeschnitte wurden anschließend über Nacht, bei 4°C, mit Primärantikörper (ATF6, 1:50 in protein concentrate solution) benetzt und inkubiert. Am nächsten Morgen erfolgte ein zweimaliger Waschvorgang in PBS, bevor die Objektträger für 90 Minuten bei Raumtemperatur im Sekundärantikörper (TEXAS RED Anti-Maus IgG, 1:100 in protein concentrate solution) inkubiert wurden. Es folgte die Abdeckung der Gewebeschnitte mittels Vectashield mounting medium mit DAPI (4',6-Diamidin-2-Phenylindol).

In Vorbereitung auf die CHOP-Anfärbung wurden die Gewebeschnitte für 60 Minuten in PBST inkl. 1 % Affen-Serum (D9663, Blockpuffer) inkubiert. Die Inkubation des Primärantikörpers (CHOP, 1:50 in Blockpuffer) erfolgte über Nacht bei 4°C. Es folgte ein zweimaliger Waschvorgang in PBS und die anschließende Inkubation mit dem Sekundärantikörper (TEXAS RED Anti-Hase IgG [H+L] TI-1000, 1:100 in Blockpuffer) für 90 Minuten bei Raumtemperatur. Für die Farbentwicklung wurden die Objektträger für 10 Minuten in Kupfer-II-Sulfat-Lösung und anschließend für 25 Minuten in 0,5-%iger Sudan Black B Lösung belassen. Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit Vectashield mounting medium inkl. DAPI (4',6-Diamidin-2-Phenylindol) luftdicht verschlossen.

SOCS3 und DDAH1 Immunfluoreszenzen wurden an humanen Nierenbiopsien durchgeführt. Dazu wurden die humanen Paraffinschnitte für eine Minute in eiskaltem Aceton fixiert,

anschließend für 10 Minuten in PBST inkubiert, bevor sie für 60 Minuten in 2,5-%igem Affen-Serum (D9663, Blockpuffer) geblockt wurden. Der Primärantikörper gegen humanes SOCS3 (1:25 in Blockpuffer) oder DDAH1 (1:25 in Blockpuffer) wurde bei 4°C über Nacht auf den Gewebeproben belassen. Der korrespondierende Sekundärantikörper (TEXAS RED Anti-Hase IgG [H+L] TI-1000, 1:300 in Blockpuffer) verblieb für 60 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Gewebe, bevor ein abschließender Waschvorgang durchgeführt wurde, um die Objektträger anschließend mittels Vectashield mounting medium mit DAPI (4',6-Diamidin-2-Phenylindol) zu bedecken.

Alle Aufnahmen wurden mithilfe eines Olympus BX43 Mikroskops mit dazugehöriger XC30 Kamera und Software (Olympus Cell Sens Dimension 1.5 Image Software) aufgenommen. Während der Aufnahmen wurden die Expositionszeiten und die Belichtung mittels Laser konstant gehalten.

2.8 Proteinisolation

Die Zelllysate wurden mithilfe des RIPA-Puffers (50 mM Tris pH 7,4, 1 % Nonidet P-40, 0,25 % Natriumdeoxycholat, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄ und 1 mM NaF + PCI) hergestellt. Mittels zehnmütiger Zentrifugation bei 4°C und 10000 g wurde das Zelllysate von nichtlöslichem Zelldebris getrennt. Der unlösliche Detritus wurde verworfen, bevor die Proteinkonzentration des Überstandes mittels BCA-Reagenz bestimmt wurde [41, 42, 44, 45].

2.9 Immunoblot

Die aus der Proteinisolation gewonnenen Eiweiße wurden unter Zuhilfenahme der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) nach Molekülmasse aufgetrennt. Hierzu wurden gleiche Proteinmengen auf 10- oder 12,5-%ige SDS Polyacrylamidgele aufgetragen, elektrophoretisch separiert und nachfolgend auf PVDF Membranen transferiert. Die Membranen wurden anschließend mit dem jeweils erwünschten Primärantikörper (KIM1 [1:1000], ATF6 [1:400] oder CHOP [1:1000]) bei 4°C über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag erfolgte nach dreimaligem Waschvorgang in TBST die einstündige Inkubation mit HRP-konjugierten Antikörpern (anti-Maus IgG [1:5000], anti-Hase IgG [1:2000] oder anti-Ziege IgG [1:2000]) bei Raumtemperatur. Im weiteren Verlauf wurden die Blots mit einem Chemilumineszenz-System (MicroChemi 4.2) entwickelt und digitalisiert.

Um die verschiedenen Proteinlevel quantifizieren und miteinander vergleichen zu können, wurde die Dichte jeder einzelnen Bande mithilfe der Software ImageJ gemessen. Für eine adäquate Überprüfung der aufgetragenen Proteinmengen wurde bei dem jeweils identischen Blot GAPDH bestimmt [22].

2.10 Nephroseq-Datenbank

Wir nutzten die Nephroseq-Datenbank (Life Technologies, Ann Arbor, MI; früher bekannt unter dem Namen Nephromine; nephroseq.org) um humane renale Expressionsdaten zu analysieren und zu visualisieren. Nephroseq ist eine frei zugängliche, internetbasierte Plattform für integrative Datenanalysen von Microarray-Genexpressionen speziell für Nierenerkrankungen [46]. Die mRNA-Expression von FXR, SOCS3 und DDAH1 wurde in mikrodisezierten Glomeruli gesunder Individuen, innerhalb des Woroniecka-Datensets, analysiert. Die detaillierten klinischen Charakteristika sind in der Originalarbeit beschrieben worden [47]. Dargestellte Signifikanzen und *p*-Werte spiegeln Ergebnisse wider, welche bei Abfrage der Nephroseq-Datenbank, bezüglich Überexpression, generiert wurden.

2.11 *In-vitro* Experiment (Zellkulturelle Arbeit)

Für unser *in-vitro* Experiment nutzten wir drei unterschiedliche Zellreihen:

1. Humane proximale Tubulusepithelzellen (HKC-8)
2. Humane endotheliale Hybrid-Zellen (EA.hy926)
3. Humane Podozyten (h.Podo)

Humane proximale Tubulusepithelzellen (HKC-8) wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's F-12 (DMEM/F12 Nährlösung [1:1]) in Anwesenheit von 10-%igem fetalem Kälberserum (fetal calf serum, FCS) und 1-%igem Insulin-Transferrin-Selenium Medium (ITS) kultiviert. Bei 37°C wurde ein Wachstum bis zu einem konfluierenden einschichtigen Zellrasen abgewartet, bevor die Zellen trypsiniert (0,01 % Trypsin in PBS [pH 7,4] inkl. 0,54 mM EDTA und 5,5 mM Glukose) und für die Experimente aufgeteilt wurden [48].

Die humanen endothelialen Hybridzellen (EA.hy926) wurden in DMEM bei 37°C und einem CO₂-Gehalt in der Umgebungsluft von 7 % kultiviert. Das Kulturmedium wurde alle 3-5 Tage gewechselt und bei Erreichen eines geschlossenen Zellrasens wurden die Zellen trypsiniert

(0,01 % Trypsin in PBS [pH 7,4] inkl. 0,54 mM EDTA und 5,5 mM Glukose) und anschließend in geringerer Dichte subkultiviert [49].

Humane Podozyten (h.Podo) wurden routinemäßig bei 33°C auf mit Kollagen Typ I beschichteten Schalen kultiviert. Um die Expression eines Thermosensitiven T-Antigens zu forcieren, wurde dem Nährmedium zusätzlich Interferon- γ (IFN- γ) in einer Konzentration von 10 U/ml beigefügt. Durch diese Bedingungen wird erreicht, dass die Zellen stark proliferierten und undifferenziert blieben. Für die spätere Differenzierung der h.Podo entzogen wir den Zellen, bei Wachstum in 37°C warmer Umgebung, das IFN- γ für 12-14 Tage. Nach 12 Tagen Differenzierung wurden dann die Experimente durchgeführt. Der Nachweis der abgelaufenen Differenzierung der h.Podo erfolgte durch die Bestimmung der Synaptopodin- und Wilms-Tumor-1 Proteinexpression [42].

Die unterschiedlichen Zellreihen wurden nachfolgend in je eine Kontrollgruppe (C) und eine TUDCA-Gruppe (T, 500 μ M in PBS für 24 h) unterteilt. Die zusammengefassten Ergebnisse erhielten wir aus mindestens drei unabhängig voneinander wiederholten Experimenten, jedes mit drei getrennten Replikaten.

2.12 Statistische Analyse

Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM, standard error of the mean) dargestellt. Die statistische Analyse wurde mittels zweiseitigem Student'schem *t*-Test oder ANOVA und einer nachträglichen Vergleichskorrektur nach der Methode von Tukey durchgeführt. Mithilfe der Software GraphPad Prism 5 (www.graphpad.com) wurden die Daten ausgewertet. Eine statistische Signifikanz wurde für Werte von $p < 0,05$ angenommen, wobei $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ und $***p < 0,001$ entspricht.

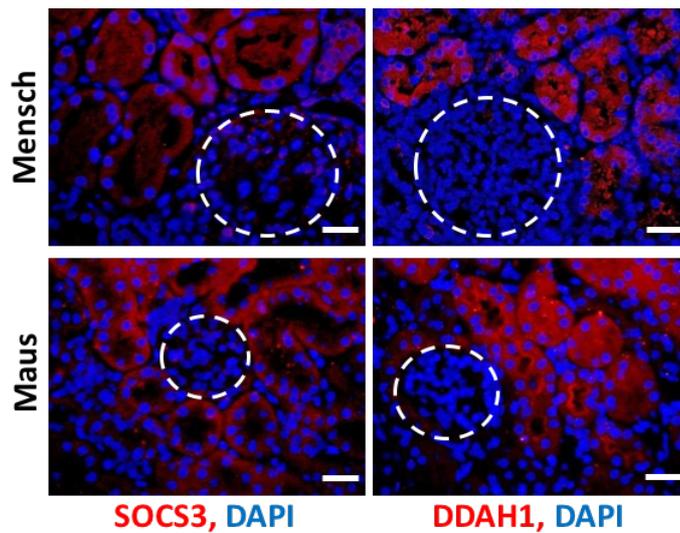


Abbildung 4: Vornehmlich tubuläre Expression von SOCS3 und DDAH1 in humanen- und Mauseieren
 Dargestellt sind Immunfluoreszenzen (IF) von SOCS3 und DDAH1 (rot) in gesundem Nierengewebe, wobei sich eine fast ausschließliche Expression im tubulären Kompartiment nachweisen ließ; blau: nukleäre Gegenfärbung mittels DAPI (4',6-Diamidin-2-Phenylindol); weiße Kreise markieren Glomeruli; weiße Linien entsprechen 20µm.

Folglich analysierten wir humane proximale Tubulusepithelzellen (HKC-8), endotheliale Zellen (EA.hy926) und Podozyten (h.Podo), ohne (C) und mit (T) stattgehabter TUDCA-Therapie. Diese Analyse zeigte eine Induktion von SOCS3 und DDAH1 ausschließlich in tubulären Zellen (Abb. 5). Diese Resultate legten nahe, dass TUDCA das tubuläre Kompartiment mittels FXR-abhängiger Mechanismen beeinflussen kann.

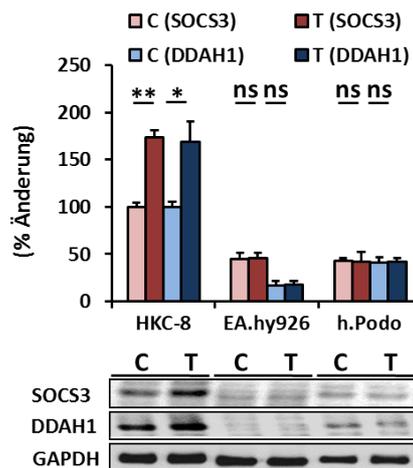


Abbildung 5: Die SOCS3- und DDAH1-Expression ist in-vitro ausschließlich in HKC-8 induzierbar
Oben: Dargestellt ist die prozentuale Veränderung der Expression von SOCS3 und DDAH1 durch TUDCA (T), verglichen mit verschiedenen unbehandelten Kontrollzellen (C); Eine Expressionserhöhung durch TUDCA (T) ist ausschließlich in tubulären Zellen (HKC-8) nachweisbar, nicht aber in endothelialen Zellen (EA.hy926) oder Podozyten (h.Podo); Ausgangswert (C) und verstärkte Expression nach TUDCA-Applikation (T; 500 µM; 24 h) spezifisch in tubulären Zellen; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (zweiseitiger Student'scher-t-Test);
Unten: Repräsentative Immunoblots.

3.2 TUDCA schützt das tubuläre Kompartiment in db/db Mäusen *via* FXR

Um die *in-vivo* Relevanz des FXR-Agonismus durch TUDCA zu untersuchen, behandelten wir 16 Wochen alte db/db Mäuse mit TUDCA (T, 150 mg/kg) in Abwesenheit (T) oder in Kombination (T+Gu) mit dem FXR-Inhibitor Z-Guggulsteron (Gu, 10 mg/kg) [52, 53]. Zwischen den experimentellen Gruppen waren keine Unterschiede hinsichtlich der Blutglukosekonzentrationen eruiert (Abb. 6).

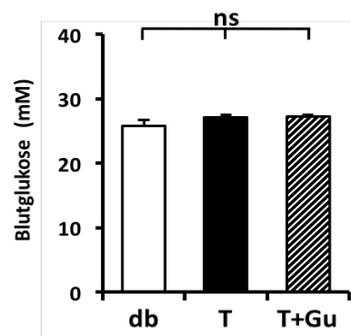


Abbildung 6: TUDCA zeigt keine Auswirkungen auf die Blutglukosekonzentration in db/db Mäusen. Dargestellt sind Mittelwerte der Blutglukosekonzentration in db/db Mäusen ohne (db) und mit Intervention (T, T+Gu); Sowohl die Behandlung mit TUDCA (T), als auch TUDCA in Kombination mit Z-Guggulsteron (T+Gu) zeigte keinen signifikanten Effekt auf die Blutglukosewerte verglichen mit denen der unbehandelten Kontrollmäuse (db); Anzahl Mäuse: 10 (db), 8 (T), 7 (T+Gu); ns: nicht signifikant (ANOVA).

Nach sechswöchiger Intervention zeigte sich eine durch TUDCA induzierte Expression von SOCS3 und DDAH1. Dieser Effekt wurde durch die zusätzliche Gabe von Z-Guggulsteron (T+Gu) aufgehoben (Abb. 7).

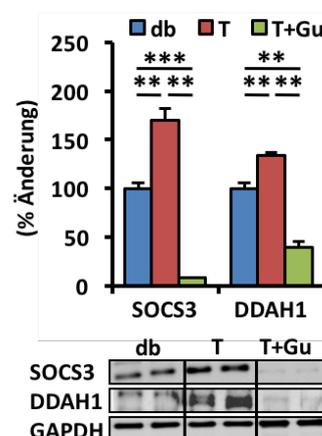


Abbildung 7: TUDCA induziert die Expression von SOCS3 und DDAH1 *in vivo*

Oben: Dargestellt ist die durch TUDCA (T) induzierte Proteinexpression (in Form der prozentualen Veränderung) von SOCS3 und DDAH1 in Nieren von db/db Mäusen im Gegensatz zu unbehandelten Kontrollmäusen (db) nach sechswöchiger Intervention; Die zusätzliche Gabe des FXR-Antagonisten Z-Guggulsteron (T+Gu) verringerte die SOCS3- und DDAH1-Expression; Anzahl Mäuse: 10 (db), 8 (T), 7 (T+Gu); ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (ANOVA); **Unten:** Repräsentative Immunoblots.

Übereinstimmend mit den nachgewiesenen *in-vitro* Effekten induzierte TUDCA auch *in-vivo* die SOCS3- und DDAH1-Expression spezifisch in tubulären Zellen (Abb. 8).

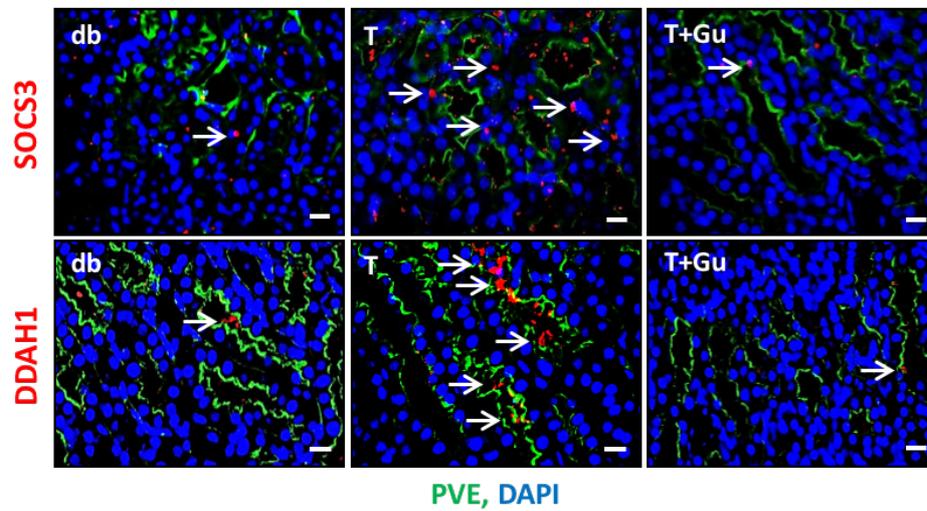


Abbildung 8: TUDCA induziert die SOCS3- und DDAH1-Expression vorrangig in Tubuluszellen
 Dargestellt sind Immunfluoreszenzen (IF), die eine durch TUDCA (T) induzierte Expression von SOCS3 und DDAH1 (rot) in proximalen Tubuluszellen von db/db Mäusen, im Gegensatz zu unbehandelten Kontrollmäusen (db), aufzeigt; Die zusätzliche Gabe des FXR-Antagonisten Z-Guggulsteron (T+Gu) führte zu einer Verringerung der SOCS3- und DDAH1-Expression; Anzahl Mäuse: 10 (db), 8 (T), 7 (T+Gu); grün: PVE (*Phaseolus vulgaris erythro-agglutinin*); blau: nukleäre Gegenfärbung mittels DAPI (4',6-Diamidin-2-Phenylindol); weiße Linien entsprechen 20 µm.

Entsprechend der bekannten Induktion einer ER-Stress-Reaktion im Rahmen der diabetischen Nephropathie (dNP) und der Funktion von TUDCA (T) als Chaperon verminderte eine Behandlung der db/db Mäuse mit TUDCA (T) die Expression der ER-Stress-assoziierten Proteine ATF6 (aktivierender Transkriptionsfaktor 6) und CHOP (C/EBP-homologes Protein) nach sechswöchiger Intervention. Dieser Effekt wurde wiederum durch die zusätzliche Gabe von Z-Guggulsteron (T+Gu) aufgehoben (Abb. 9).

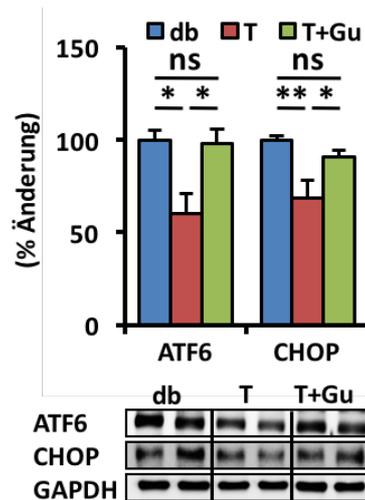


Abbildung 9: TUDCA reduziert die ATF6- und CHOP-Expression in Nieren von db/db Mäusen

Oben: Dargestellt ist die durch TUDCA (T) reduzierte Proteinexpression (in Form der prozentualen Veränderung) von ATF6 und CHOP in Nieren von db/db Mäusen im Gegensatz zu unbehandelten Kontrollmäusen (db) nach sechswöchiger Intervention; Die zusätzliche Gabe des FXR-Antagonisten Z-Guggulsteron (T+Gu) verringerte die ATF6- und CHOP-Expression; Anzahl Mäuse: 10 (db), 8 (T), 7 (T+Gu); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ns: nicht signifikant (ANOVA); **Unten:** Repräsentative Immunoblots.

Bei unseren weiteren Untersuchungen konzentrierten wir uns auf einen für die humane dNP ausschlaggebenden Messwert: Albuminurie. Hier konnten wir zeigen, dass TUDCA (T) die Albuminurie (dargestellt als Δ UACR) innerhalb der Intervention deutlich reduzierte (Abb. 10a), was für eine Protektion der Nieren der db/db Mäuse spricht. Darüber hinaus linderte TUDCA (T) die histologisch nachweisbaren glomerulären Schäden, wiedergegeben durch die Akkumulation der Extrazellulärproteine (fractional mesangial area, FMA) und dem glomerulären Diameter (Abb. 10b-d). Während die Verbesserung der Δ UACR durch die zusätzliche Gabe des FXR-Antagonisten Z-Guggulsteron (T+Gu) teilweise aufgehoben wurde, blieben die glomerulären Schäden unverändert bestehen (Abb. 10b-d). Dieses Ergebnis deutet auf einen nephroprotektiven Effekt von TUDCA, unabhängig von dem Schutz der Glomeruli, hin.

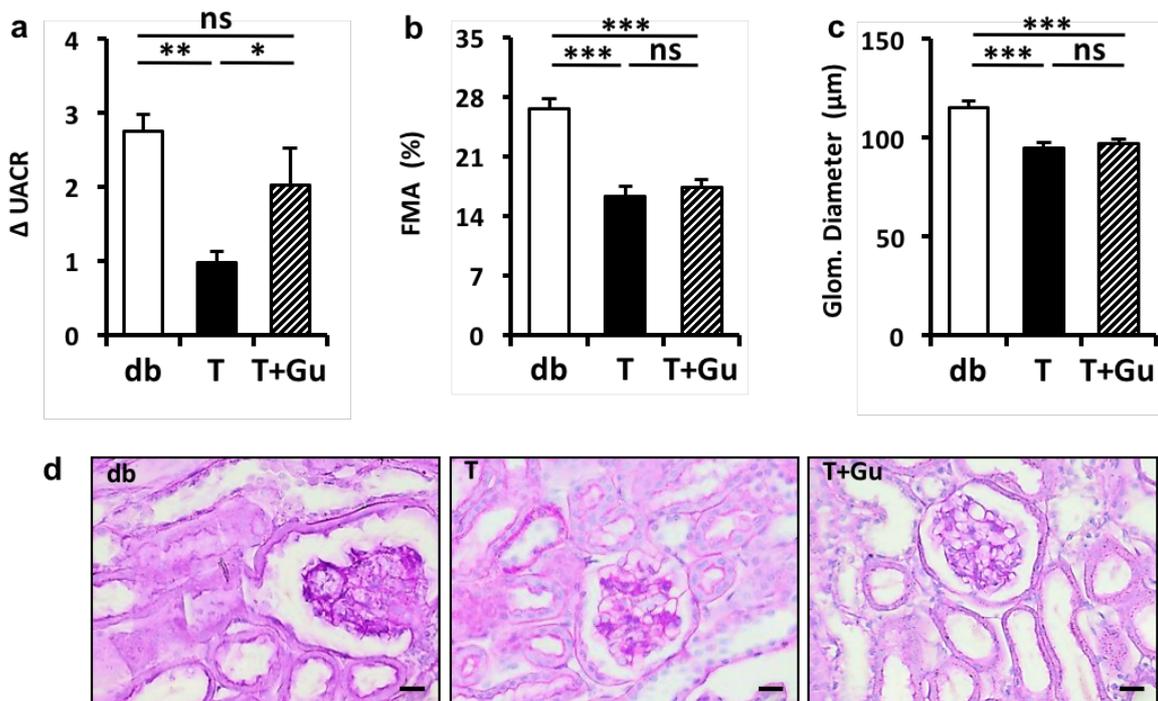


Abbildung 10: TUDCA lindert glomeruläre Schäden FXR-unabhängig und reduziert die Δ UACR durch Bereitstellung tubuloprotektiver FXR-abhängiger Effekte

a: Dargestellt ist die durch TUDCA (T) reduzierte Δ UACR nach sechswöchiger Intervention in db/db Mäusen im Gegensatz zu unbehandelten Kontrollmäusen (db); Dieser Effekt wurde durch die zusätzliche Gabe des FXR-Antagonisten Z-Guggulsteron (T+Gu) teilweise aufgehoben; **b, c:** TUDCA (T) verringerte signifikant die Akkumulation der extrazellulären Matrixproteine (fractional mesangial area, FMA, b) und den glomerulären Diameter (Glom. Diameter, c). Die zusätzliche Gabe des FXR-Antagonisten Z-Guggulsteron (T+Gu) hebt diesen Effekt nicht auf; **d:** Dargestellt sind repräsentative histologische Nierengewebsschnitte, welche mithilfe der PAS-Färbung angefärbt wurden. Während die unbehandelten Kontrollmäuse (db) sowohl eine massive glomeruläre als auch tubuläre Dilatation zeigten, vermittelte TUDCA (T) eine glomeruläre Protektion auch unter kombinierter Gabe mit Z-Guggulsteron (T+Gu), wohingegen der tubuloprotektive Effekt bei gleichzeitiger Gabe von Z-Guggulsteron (T+Gu) ausblieb; Pro Interventionsgruppe wurden mindestens 30 zufällig ausgewählte Glomeruli untersucht; Anzahl Mäuse: 10 (db), 8 (T), 7 (T+Gu); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns: nicht signifikant (ANOVA); schwarze Linien entsprechen 20 μ m.

Das zweite Kompartiment einer Niere, neben dem glomerulären, ist das tubuläre. Die zuvor von uns erhobenen Daten zeigten, dass es einen durch TUDCA (T) vermittelten FXR-unabhängigen Mechanismus der Glomeruloprotektion gibt (Abb. 10b-d). Gleichzeitig konnten wir jedoch eine FXR-abhängige Reduktion der Δ UACR nachweisen (Abb. 10a), welche die Hypothese eines FXR-abhängigen Mechanismus im tubulären Kompartiment weiter stützte. Hier konnten wir zeigen, dass TUDCA (T) die tubuläre Dilatation (Abb. 10d, 11b) und die Expression des KIM1 (kidney injury molecule 1, Abb. 11a) nach sechswöchiger Intervention signifikant reduzierte. Beide Parameter reflektieren die tubulären Schäden in Nieren von db/db Mäusen. Diese protektiven Effekte waren in kombiniert behandelten db/db Mäusen (T+Gu) nach sechswöchiger Applikation nicht zu finden (Abb. 11), was eine FXR-abhängige Tubuloprotektion der Niere durch TUDCA (T) nahelegt.

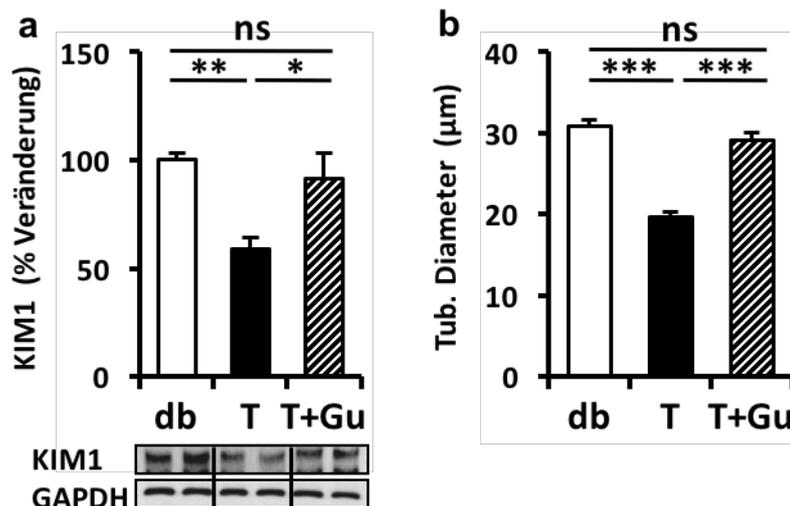


Abbildung 11: TUDCA schützt das tubuläre Kompartiment FXR-abhängig

a: oben: Dargestellt ist die durch TUDCA (T) reduzierte Expression von KIM1 nach sechswöchiger Intervention in db/db Mäusen im Gegensatz zu unbehandelten Kontrollmäusen (db); Dieser Effekt wurde durch die zusätzliche Gabe des FXR-Antagonisten Z-Guggulsteron (T+Gu) nahezu vollständig aufgehoben; **unten:** Repräsentative Immunoblots; **b:** TUDCA (T) verringerte signifikant den tubulären Durchmesser (Tub. Diameter), wobei durch die gleichzeitige Gabe von Z-Guggulsteron dieser tubuloprotektive Effekt aufgehoben wurde, was dem Phänotyp der unbehandelten Kontrollmäuse (db) gleichkam; Pro Interventionsgruppe wurden mindestens 30 zufällig ausgewählte Tubuli untersucht; Anzahl Mäuse: 10 (db), 8 (T), 7 (T+Gu); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns: nicht signifikant (ANOVA).

3.3 TUDCA wirkt ergänzend zur Standardtherapie der RAASi in db/db Mäusen

Die bis hier erhobenen Daten demonstrieren, dass TUDCA (T) db/db Mäuse vor dNP schützt, indem es FXR-unabhängig glomeruloprotektiv und zusätzlich FXR-abhängig schützend auf das tubuläre Kompartiment wirkt. Da die RAAS-Inhibition (RAASi) und TUDCA (T) scheinbar zwei unterschiedliche Pathomechanismen in der dNP beeinflussen, evaluierten wir als nächstes, ob TUDCA (T) einen zusätzlichen Nutzen zur Standardtherapie der RAASi zur Verfügung stellen kann. Hierzu behandelten wir 16 Wochen alte db/db Mäuse sechs Wochen lang täglich mit PBS (Kontrolle, db/db C), dem ACE-Inhibitor (ACEi) Enalapril (E), TUDCA (T) oder mit einer Kombination aus beiden Therapien (E+T). Sowohl die beiden Einzeltherapien (E, T), als auch die Kombinationstherapie (E+T) zeigten keinen Effekt auf die Blutglukosekonzentration der db/db Mäuse (Abb. 12a). Enalapril entfaltete wie erwartet seine normalisierende Wirkung auf die Plasmakonzentration des Vasokonstriktors Angiotensin II (AT II), während TUDCA keine signifikante Reduktion zeigte (Abb. 12b).

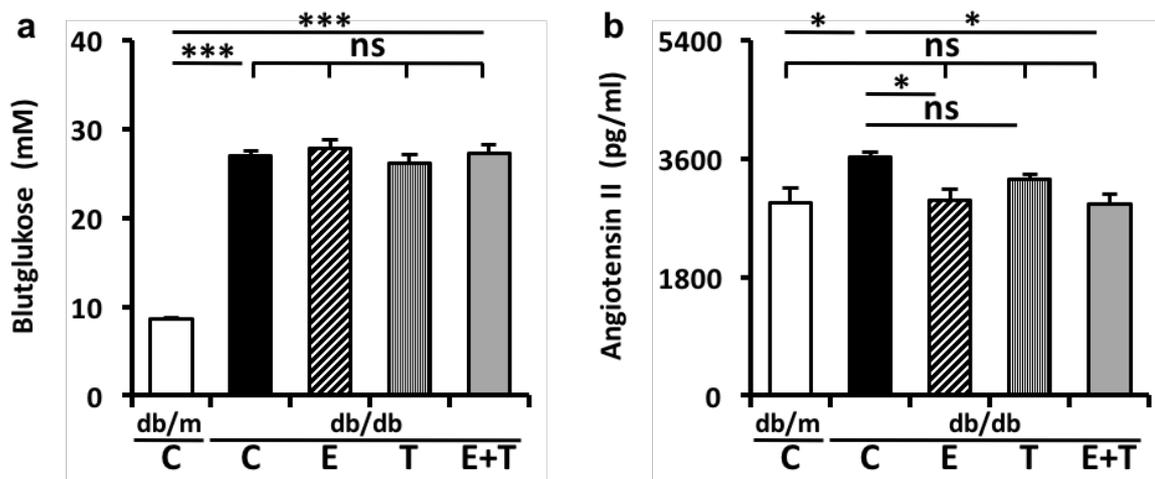


Abbildung 12: TUDCA zeigt keine signifikante Beeinflussung der Blutglukosekonzentration und der AT II-Konzentration

a: Dargestellt sind die Blutglukosekonzentrationen in allen vier Interventionsgruppen nach sechswöchiger Therapie (alle signifikant erhöht) im Vergleich zu nicht-diabetischen Kontrollmäusen (db/m C). Weder Enalapril (E) oder TUDCA (T) als Einzeltherapie, noch die Kombinationstherapie (E+T) zeigten signifikante Einflüsse auf die Blutglukosekonzentration verglichen mit unbehandelten 22 Wochen alten db/db Mäusen (db/db C; nach sechswöchiger Intervention); **b:** Die Plasmakonzentration von AT II ist in unbehandelten db/db Mäusen (db/db C) nach sechs Wochen signifikant erhöht im Vergleich zu unbehandelten nicht-diabetischen Kontrollmäusen (db/m C). Lediglich Enalapril, sowohl als Einzeltherapie (E), als auch in Kombination mit TUDCA (E+T) entfaltete seine AT II-normalisierende Wirkung nach sechswöchiger Intervention in 22 Wochen alten db/db Mäusen, verglichen mit unbehandelten gleichaltrigen db/db Mäusen (db/db C). TUDCA (T) zeigte keine signifikante Reduktion des AT II-Plasmaspiegels; Anzahl Mäuse: 6 (db/m C), 10 (db/db C), 6 (E), 8 (T), 6 (E+T); * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; ns: nicht signifikant (ANOVA).

Als ausschlaggebenden Parameter für die dNP bestimmten wir zunächst die Änderung der Albuminurie (Δ UACR) nach sechswöchiger Intervention. Hierbei stellten wir eine deutliche Erhöhung der Δ UACR der unbehandelten Kontrollmäuse (db/db C) fest, wohingegen die Enalapril (E)- und TUDCA (T)-Gruppe die Progression der Δ UACR-Erhöhung signifikant verringerte, allerdings zu keiner Reduktion, verglichen zum Ausgangswert führte. Dies vermochte nur die Kombinationstherapie (E+T) zu erreichen, womit wir einen funktionellen Zusatznutzen von TUDCA zur Standardtherapie der RAAS-Inhibition (RAASi) aufzeigen konnten (Abb. 13).

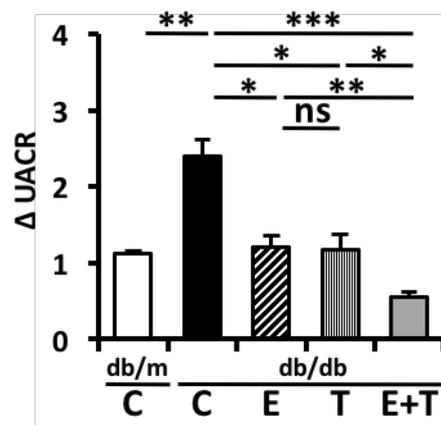


Abbildung 13: TUDCA in Kombination mit Enalapril führt zu einer zusätzlichen Reduktion der Δ UACR in db/db Mäusen

Dargestellt ist die Δ UACR (Änderung des Albumin-Kreatinin-Quotienten) nach sechswöchiger Intervention. Hierfür wurden die im Alter von 22 Wochen (direkt nach Ende der Intervention) gemessenen UACR-Werte ($\mu\text{g}/\text{mg}$) durch die UACR-Werte ($\mu\text{g}/\text{mg}$), welche im Alter von 16 Wochen (kurz vor Interventionsbeginn) bestimmt wurden, dividiert. Die unbehandelten Kontrollmäuse (db/db C) zeigten eine ca. 2,5-fache Erhöhung der Δ UACR, verglichen mit unbehandelten nicht-diabetischen Kontrollmäusen (db/m C) nach nur sechs Wochen. TUDCA (T) und Enalapril (E) verringerten die Erhöhung der Δ UACR signifikant. Die Kombinationstherapie zeigte sogar eine signifikante Reduktion der Δ UACR unter eins. Dies bedeutet, dass die UACR-Werte sich nach sechs Wochen Therapie unterhalb des Ausgangsniveaus befanden, was auf eine teilweise Wiederherstellung der Nierenfunktion hindeutet; Anzahl Mäuse: 6 (db/m C), 10 (db/db C), 6 (E), 8 (T), 6 (E+T); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns: nicht signifikant (ANOVA).

Darüber hinaus konnten wir für beide Substanzen in der Einzeltherapie (E, T) eine vergleichbare Reduktion der histologisch nachweisbaren glomerulären Schäden, dargestellt durch die FMA und die glomeruläre Dilatation, beobachten, wenngleich Enalapril (E) zu einer stärkeren Reduktion des glomerulären Durchmessers (Glom. Diameter) führte (Abb. 14a-c). Die Kombinationstherapie (E+T) resultierte in einer signifikant besseren FMA-Reduktion (Abb. 14a), ohne einen zusätzlichen Nutzen, bezogen auf den glomerulären Durchmesser, erkennen zu lassen (Abb. 14b, 14c). Folglich konnte ein klinisch relevanter Zusatznutzen, durch die Verringerung glomerulopathischer Effekte, aufgezeigt werden.

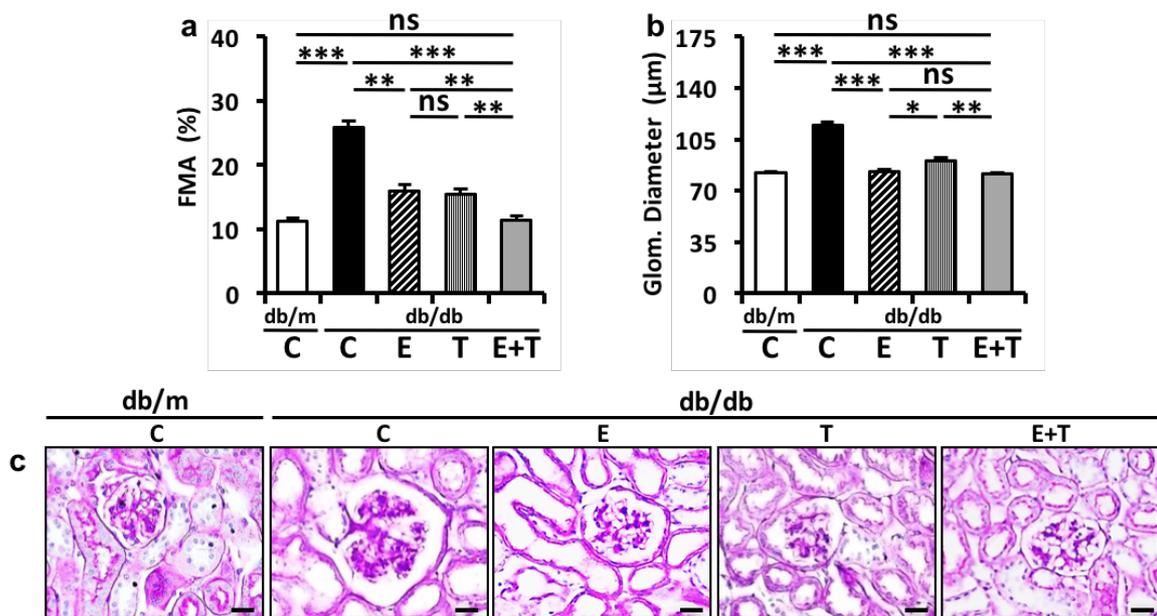


Abbildung 14: TUDCA in Kombination mit Enalapril führt zu einer signifikanten Reduktion glomerulopathischer Effekte in db/db Mäusen

a: Dargestellt ist die Akkumulation extrazellulärer Matrixproteine (fractional mesangial area, FMA) in allen vier Interventionsgruppen nach sechswöchiger Therapie im Vergleich zu nicht-diabetischen Kontrollmäusen (db/m C). Enalapril (E) und TUDCA (T) als Einzeltherapie zeigten eine signifikante Reduktion der FMA verglichen mit unbehandelten 22 Wochen alten db/db Mäusen (db/db C; nach sechswöchiger Intervention). Die Kombination beider Präparate führte zu einem klinisch relevanten Zusatznutzen, der zu einer FMA führte, vergleichbar mit der von unbehandelten nicht-diabetischen Kontrollmäusen (db/m C); **b:** Der glomeruläre Diameter ist in unbehandelten db/db Mäusen (db/db C) nach sechs Wochen signifikant erhöht im Vergleich zu unbehandelten nicht-diabetischen Kontrollmäusen (db/m C). Enalapril (E) führte zu der stärksten Reduktion des glomerulären Durchmessers, wenngleich TUDCA (T) ebenfalls eine signifikante Reduktion, nach sechswöchiger Intervention, verglichen mit unbehandelten db/db Mäusen (db/db C) aufzeigte. Eine Kombinationstherapie (E+T) zeigte keinen zusätzlichen Nutzen bezogen auf den glomerulären Durchmesser; **c:** Dargestellt sind repräsentative histologische Nierengewebschnitte, welche mithilfe der PAS-Färbung angefärbt wurden. Während die unbehandelten Kontrollmäuse (db/db C) sowohl eine massive glomeruläre, als auch tubuläre Dilatation zeigten, konnte Enalapril (E) ausschließlich zur glomerulären Protektion beitragen (durch Verringerung des glomerulären Durchmessers), während TUDCA (T) sowohl glomerulo- als auch tubuloprotektive Effekte (durch Reduktion der tubulären Dilatation [Abb. 16a]) zur Verfügung stellte; Pro Interventionsgruppe wurden mindestens 30 zufällig ausgewählte Glomeruli untersucht; Anzahl Mäuse: 6 (db/m C), 10 (db/db C), 6 (E), 8 (T), 6 (E+T); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns: nicht signifikant (ANOVA); schwarze Linien entsprechen 20 µm.

Für eine ultrastrukturelle Analyse führten wir transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Aufnahmen durch, um die Struktur und Dicke der glomerulären Basalmembran (GBM) zu beurteilen. Hierbei zeigte sich eine signifikant dünnere GBM sowohl durch Enalapril (E), als auch durch die sechswöchige Therapie mit TUDCA (T) (Abb. 15). Interessanterweise kam es hier zu keinem signifikanten Zusatznutzen einer Kombinationstherapie (E+T) (Abb. 15). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Reduktion der Albuminurie (Abb. 13) nicht nur auf den glomeruloprotektiven Effekt von TUDCA (T) zurückgeführt werden kann und es führte dazu, dass unsere Hypothese der zusätzlichen Tubuloprotektion durch TUDCA (T) weiter gestärkt wurde.

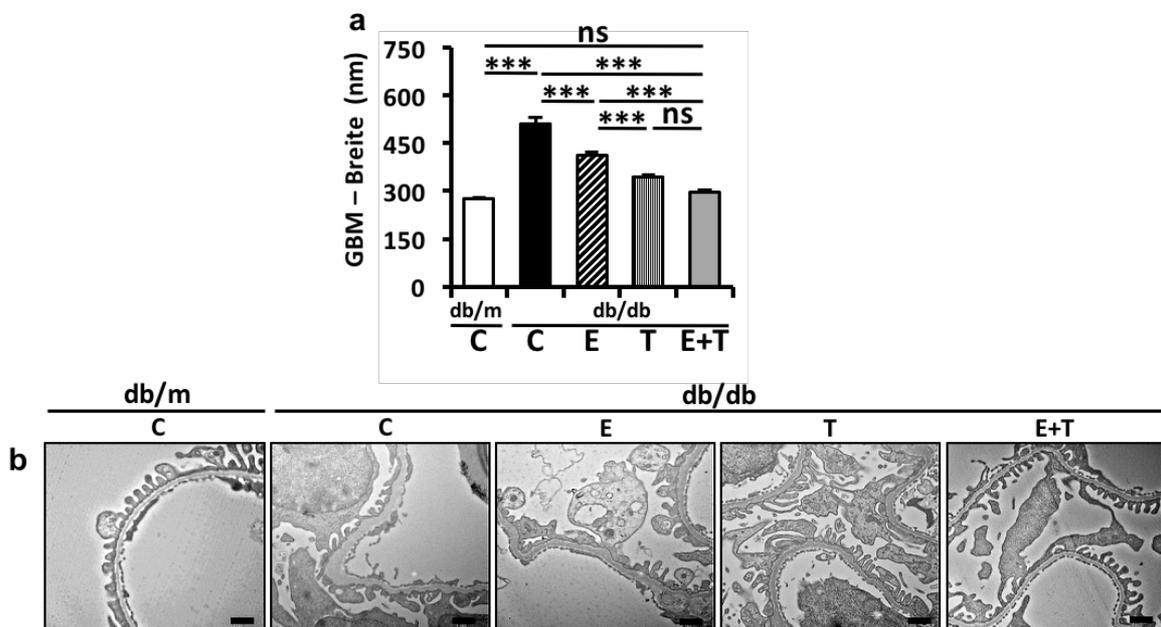


Abbildung 15: TUDCA verbessert die elektronenmikroskopische Struktur der GBM in db/db Mäusen
a: Dargestellt ist die durchschnittliche Dicke der glomerulären Basalmembran (GBM) in allen vier Interventionsgruppen nach sechswöchiger Therapie im Vergleich zu nicht-diabetischen Kontrollmäusen (db/m C). Enalapril (E) und TUDCA (T) als Einzeltherapie zeigten eine signifikante Reduktion der GBM-Breite verglichen mit unbehandelten 22 Wochen alten db/db Mäusen (db/db C; nach sechswöchiger Intervention). Die Kombination beider Präparate führte zu keinem signifikanten Zusatznutzen; **b:** Dargestellt sind TEM-Aufnahmen die eine deutliche Abnahme der GBM-Dicke in der Enalapril (E)- und TUDCA (T)-Gruppe zeigen, verglichen mit unbehandelten db/db Kontrollmäusen (db/db C). Für die Kombinationstherapie (E+T) konnte kein signifikanter Zusatznutzen nachgewiesen werden, wenngleich die Struktur (ebenso der Podozyten) der nicht-diabetischen GBM (db/m C) am nächsten kommt; Pro Interventionsgruppe wurden mindestens 30 zufällig ausgewählte GBM (mit jeweils 15 Messungen in gleichen Abständen auf der GBM) untersucht; Anzahl Mäuse: 6 (db/m C), 10 (db/db C), 6 (E), 8 (T), 6 (E+T); *** $p < 0,001$; ns: nicht signifikant (ANOVA); schwarze Linien entsprechen 1 μm .

Durch die bereits nachgewiesene vorwiegende Expression von FXR im Tubulointerstitium (siehe 3.1 und 3.2) und der daraus resultierenden Tubuloprotektion durch TUDCA (T) analysierten wir Marker der tubulären Schädigung. Hierbei konnten wir zeigen, dass TUDCA (T) im Gegensatz zu Enalapril (E) in der Lage war, tubuläre Schäden, dargestellt als tubuläre Dilatation (Tub. Diameter, Abb. 14c, 16a) und KIM1-Expression (Abb. 16b), zu vermindern. Dieser Befund stützt die Hypothese weiter, dass TUDCA (T) einen zusätzlichen nephroprotektiven Effekt zur Standardtherapie der RAAS-Inhibition (RAASi) bereitstellt und dass dieser hauptsächlich durch eine zusätzliche tubuläre Protektion realisiert wird.

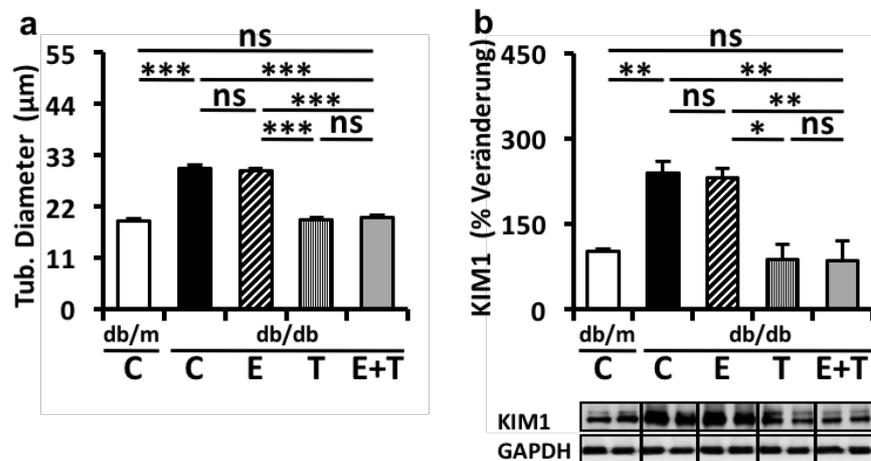


Abbildung 16: TUDCA reduziert, im Gegensatz zu Enalapril, tubuläre Schäden

a: Dargestellt ist der durchschnittliche tubuläre Durchmesser in allen vier Interventionsgruppen nach sechswöchiger Therapie im Vergleich zu nicht-diabetischen Kontrollmäusen (db/m C). TUDCA (T) zeigte, im Gegensatz zu Enalapril (E), eine signifikante Reduktion des tubulären Durchmessers, verglichen mit unbehandelten 22 Wochen alten db/db Mäusen (db/db C; nach sechswöchiger Intervention). TUDCA (T) reduzierte den tubulären Durchmesser auf den durchschnittlichen Tubulusdurchmesser unbehandelter nicht-diabetischer Kontrollmäuse (db/m C). Die Kombination beider Präparate führte zu keinem signifikanten Zusatznutzen; **b: oben:** Dargestellt ist die ausschließlich durch TUDCA (T) reduzierte KIM1-Expression im Nierengewebe von db/db Mäusen, nach sechswöchiger Intervention, verglichen mit unbehandelten db/db Mäusen (db/db C) gleichen Alters; Auch hier zeigte die Kombination beider Präparate keinen signifikanten Zusatznutzen; **unten:** Repräsentative Immunoblots; Pro Interventionsgruppe wurden mindestens 30 zufällig ausgewählte Tubuli untersucht; Anzahl Mäuse: 6 (db/m C), 10 (db/db C), 6 (E), 8 (T), 6 (E+T); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns: nicht signifikant (ANOVA).

3.4 TUDCA reduziert, im Gegensatz zu Enalapril, ER-Stress in tubulären Zellen

Um festzustellen, ob TUDCA (T) einen protektiven Effekt auf die Nierentubuli durch einen Mechanismus, der durch Enalapril (E) nicht beeinflusst wird, vermittelt, untersuchten wir die tubuläre und glomeruläre Expression zweier Mediatoren, die mit fehlerhaften Signalkaskaden im ER assoziiert sind und zu sogenanntem ER-Stress führen. Bei diesen zwei Mediatoren handelt es sich um den aktivierenden Transkriptionsfaktor 6 (ATF6) und das C/EBP-homologe Protein (CHOP). Beide Proteine werden bei erhöhtem ER-Stress vermehrt exprimiert [22] und sind Teil der eingangs erwähnten UPR (unfolded protein response). Mittels Immunoblot wiesen wir eine signifikante Reduktion der ATF6- (Abb. 17a) und CHOP-Expression (Abb. 17b) in mit TUDCA (T) behandelten db/db Mäusen nach, während wir bei Enalapril (E) als Einzelintervention keinen reduzierenden Effekt auf die Expression dieser ER-Stress-Marker nachweisen konnten.

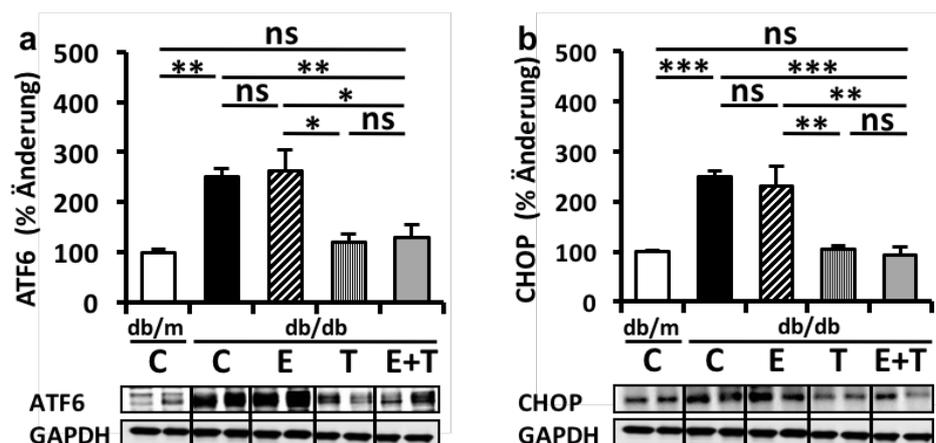


Abbildung 17: TUDCA reduziert, im Gegensatz zu Enalapril, ER-Stress-Mediatoren in renalen Extrakten

a: oben: Dargestellt ist die Expression des aktivierenden Transkriptionsfaktors 6 (ATF6) renaler Extrakte in allen vier Interventionsgruppen nach sechswöchiger Therapie im Vergleich zu nicht-diabetischen Kontrollmäusen (db/m C). TUDCA (T) zeigte im Gegensatz zu Enalapril (E) eine signifikante Reduktion der ATF6-Expression verglichen mit unbehandelten 22 Wochen alten db/db Mäusen (db/db C; nach sechswöchiger Intervention). TUDCA (T) reduzierte die ATF6-Expression auf die durchschnittliche ATF6-Expression un behandelter nicht-diabetischer Kontrollmäuse (db/m C). Die Kombination beider Präparate (E+T) führte zu keinem signifikanten Zusatznutzen; **unten:** Repräsentative Immunoblots; **b: oben:** Dargestellt ist die Expression des C/EBP-homologen Proteins (CHOP) renaler Extrakte in allen vier Interventionsgruppen nach sechswöchiger Therapie im Vergleich zu nicht-diabetischen Kontrollmäusen (db/m C). Ausschließlich die sechswöchige Therapie mit TUDCA (T) reduzierte die CHOP-Expression im renalen Extrakt der db/db Mäuse signifikant, verglichen mit unbehandelten db/db Mäusen (db/db C) gleichen Alters; Die Kombination beider Präparate (E+T) führte zu keinem signifikanten Zusatznutzen; **unten:** Repräsentative Immunoblots; Anzahl Mäuse: 6 (db/m C), 10 (db/db C), 6 (E), 8 (T), 6 (E+T); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns: nicht signifikant (ANOVA).

Für die Bestätigung dieser Ergebnisse mit einer weiteren Methode, fertigten wir Immunfluoreszenzen der Nierengewebe an. Hierbei konnten wir frühere Studienergebnisse bestätigen, welche ebenfalls zeigten, dass TUDCA (T) einen reduzierenden Effekt auf die ATF6- (Abb. 18a) und CHOP-Expression (Abb. 18b) im glomerulären Kompartiment besitzt [22, 54]. Darüber hinaus konnten wir eine durch TUDCA (T) verminderte tubuläre ATF6- und CHOP-Expression feststellen. Enalapril (E) zeigte in unserer Studie keine signifikanten Reduktionen der ER-Stress-Marker (ATF6, CHOP) unabhängig vom Kompartiment (Abb. 18). Das bedeutet, dass TUDCA (T) einen zusätzlichen ER-Stress-reduzierenden Effekt auf das tubuläre Kompartiment hat, was die zusätzliche Tubuloprotektion gegenüber den Schäden der dNP vermittelt haben könnte (Abb. 18). Diese Tubuloprotektion war sowohl im Nierenmark als auch in der Nierenrinde zu beobachten (Abb. 18).

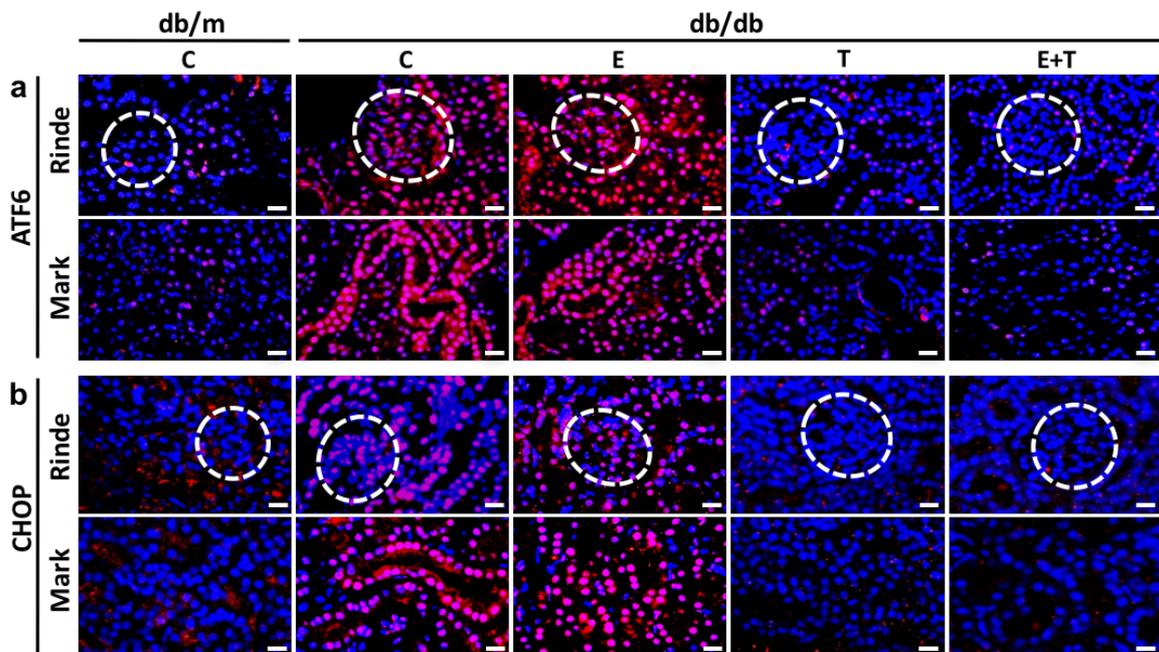


Abbildung 18: TUDCA reduziert, im Gegenteil zu Enalapril, ER-Stress-Mediatoren im Nierenmark und der Nierenrinde

a: Dargestellt sind Immunfluoreszenzen (IF) des aktivierenden Transkriptionsfaktors 6 (ATF6, rot) in Nierengewebe aller vier Interventionsgruppen nach sechswöchiger Therapie im Vergleich zu nicht-diabetischen Kontrollmäusen (db/m C). TUDCA (T) zeigte im Gegensatz zu Enalapril (E) eine signifikante Reduktion der ATF6-Expression, gleichermaßen in Mark und Rinde, verglichen mit unbehandelten 22 Wochen alten db/db Mäusen (db/db C; nach sechswöchiger Intervention). TUDCA (T) reduzierte die ATF6-Expression auf die durchschnittliche ATF6-Expression unbehandelter nicht-diabetischer Kontrollmäuse (db/m C). Die Kombination beider Präparate (E+T) führte zu keinem signifikanten Zusatznutzen; **b:** Dargestellt ist die Expression des C/EBP-homologen Proteins (CHOP, rot) im Nierengewebe aller vier Interventionsgruppen nach sechswöchiger Therapie im Vergleich zu nicht-diabetischen Kontrollmäusen (db/m C) mittels IF-Analyse. Ausschließlich die sechswöchige Therapie mit TUDCA (T) reduzierte die CHOP-Expression im medullären und kortikalen Nierengewebe der db/db Mäuse signifikant, verglichen mit unbehandelten db/db Mäusen (db/db C) gleichen Alters; Die Kombination beider Präparate (E+T) führte zu keinem signifikanten Zusatznutzen; Anzahl Mäuse: 6 (db/m C), 10 (db/db C), 6 (E), 8 (T), 6 (E+T); blau: nukleäre Gegenfärbung mittels DAPI (4',6-Diamidin-2-Phenylindol); weiße Kreise markieren Glomeruli; weiße Linien entsprechen 20 µm.

Um zu erfahren wie TUDCA (T) auf das tubuläre Kompartiment seine Wirkung vermittelt, untersuchten wir Gewebeschnitte, der zusätzlich mit Z-Guggulsteron (T+Gu) behandelten db/db Mäuse (siehe 3.2). Hierdurch konnten wir zeigen, dass der FXR-Antagonist Z-Guggulsteron (Gu) den ER-Stress-lindernden Effekt von TUDCA (T) im tubulären Kompartiment abschwächte, wobei es keine erkennbaren Auswirkungen auf die Reduktion der ATF6- (Abb. 19a) und CHOP-Expression (Abb. 19b) im glomerulären Kompartiment hatte. Diese Ergebnisse legen nahe, dass TUDCA (T) im tubulären Kompartiment *via* FXR protektiv gegenüber den Schäden der dNP wirkt, während es seine glomeruloprotektive Wirkung hauptsächlich FXR-unabhängig bereitstellt.

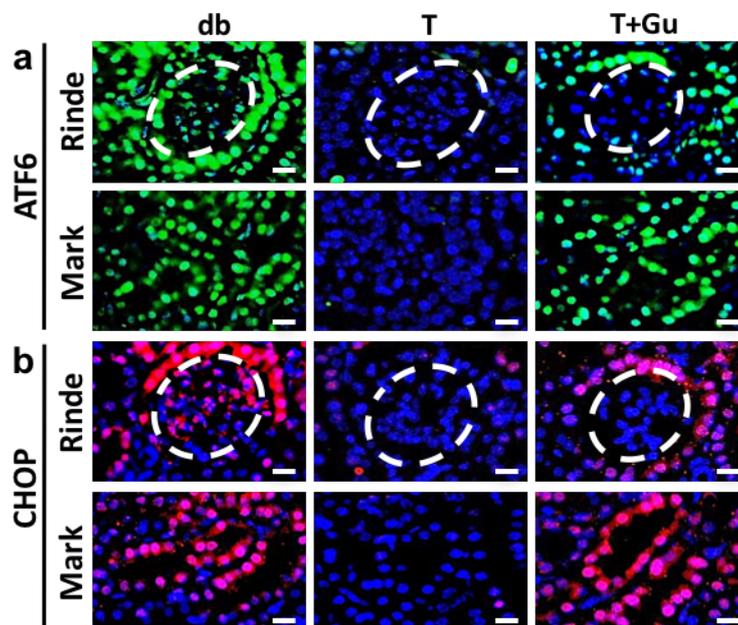


Abbildung 19: TUDCA reduziert ER-Stress im tubulären Kompartiment FXR-abhängig, während es im glomerulären Kompartiment ER-Stress-Mediatoren unabhängig vom FXR vermindert

a: Dargestellt ist die durch TUDCA (T) reduzierte ATF6-Expression (grün) medullär und kortikal nach sechswöchiger Intervention in db/db Mäusen im Gegensatz zu unbehandelten Kontrollmäusen (db) mithilfe von Immunfluoreszenzen (IF); Dieser Effekt wurde durch die zusätzliche Gabe des FXR-Antagonisten Z-Guggulsteron (T+Gu) tubulär nahezu vollständig aufgehoben, wohingegen die glomeruläre Reduktion unberührt blieb; **b:** Dargestellt ist die durch TUDCA (T) reduzierte CHOP-Expression (rot) medullär und kortikal nach sechswöchiger Intervention in db/db Mäusen im Gegensatz zu unbehandelten Kontrollmäusen (db); Dieser Effekt wurde durch die zusätzliche Gabe des FXR-Antagonisten Z-Guggulsteron (T+Gu) tubulär nahezu vollständig aufgehoben, wohingegen die glomeruläre Reduktion unberührt blieb; Anzahl Mäuse: 10 (db), 8 (T), 7 (T+Gu); blau: nukleäre Gegenfärbung mittels DAPI (4',6-Diamidin-2-Phenylindol); weiße Linien entsprechen 20 μm .

4 Diskussion

Wir konnten zeigen, dass TUDCA in Verbindung mit der Standardtherapie der RAAS-Inhibition (RAASi) einen signifikanten Zusatznutzen gegenüber der alleinigen RAASi im Tiermodell der diabetischen Nephropathie (dNP) vermittelt. Darüber hinaus konnten wir einen für die speziell durch TUDCA vermittelte Tubuloprotektion mitverantwortlichen Rezeptor, den Farnesoid-X-Rezeptor (FXR), identifizieren. Weiterhin wiesen wir nach, dass bei Inhibition des FXR der tubuloprotektive Effekt TUDCAs nahezu vollständig aufgehoben wird. Welche Rezeptoren für die Glomeruloprotektion eine entscheidende Rolle spielen, ist bisher unbekannt und könnte Teil weiterer Experimente sein. Bisher ist bekannt, dass TUDCA, wie auch andere Gallensäurederivate, an verschiedene Gallensäurerezeptoren (bile acid receptors, BARs), wie z. B. dem GPCR-TGR5 (G-protein-coupled receptor-Takeda G-protein-coupled receptor 5) binden. Interessanterweise vermittelt GPCR-TGR5 eine schützende Rolle in Bezug auf die dNP [55] (Abb. 20). Für die weitere Identifikation der in die Glomeruloprotektion involvierten BARs müssen zusätzliche Studien folgen.

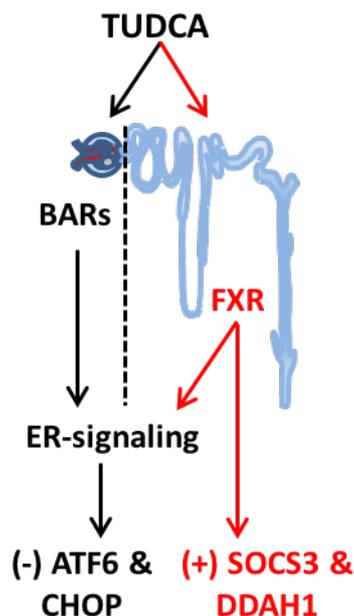


Abbildung 20: Hypothetisches Modell der FXR-abhängigen und -unabhängigen Wirkungsweise von TUDCA. Dargestellt ist ein mögliches Modell, welches den spezifischen tubuloprotektiven Effekt von TUDCA (T) via FXR-Agonismus, durch Induktion FXR-abhängiger Gene (SOCS3, DDAH1) und Reduktion von ER-Stress-Mediatoren, zeigt.

TUDCA ist in der Lage, die Expression von FXR-abhängigen Genen, wie z. B. SOCS3 und DDAH1 in der dNP zu induzieren und somit zusätzlich zur protektiven Wirkung durch Beeinflussung von ER-spezifischen Signalkaskaden, weitere Mechanismen zur Protektion des Nierengewebes zu vermitteln. Dies erhärtet die Vermutung, dass TUDCA im Zuge der dNP auf zusätzliche pathogene Reaktionswege mittels FXR-Agonismus Auswirkungen hat. Es ist bekannt, dass die Überexpression von SOCS3 die Glukose-induzierte Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges und die daraus resultierende Expression von STAT-abhängigen Genen, inklusive Wachstumsfaktoren, Chemokinen und extrazellulären Matrixproteinen, vermindern kann [56, 57]. *In-vivo* schützt die SOCS3-Überexpression Ratten vor dNP [58], was nahelegt, dass die TUDCA-FXR-vermittelte Induktion von SOCS3 zu den nephroprotektiven Effekten von TUDCA beiträgt. Zusätzlich inhibiert DDAH1 ADMA (asymmetrisches Dimethylarginin) und L-NMMA (N^ε-Monomethyl-L-Arginin), zwei Inhibitoren der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS), welche ihrerseits für die Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) verantwortlich sind [59]. Es konnte gezeigt werden, dass eine Defizienz an endothelialer Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) zu einer Verschlechterung der dNP in Mäusen führte [60]. Zusätzlich wird angenommen, dass sie eine Ursache der humanen dNP darstellt [61-63]. Die Induktion von DDAH1 mittels der TUDCA-FXR-abhängigen Signalkaskade könnte einen zusätzlichen nephroprotektiven Effekt für die Therapie der dNP darstellen. Bekanntermaßen führt die systemische Überexpression von DDAH1 zu einer Verdopplung der eNOS-Aktivität, was wiederum zur Protektion führt [64].

Ogleich wir in der aktuellen Studie *in-vivo* Studien durchführten, haben die gewählten methodischen Ansätze Limitationen. So verwendeten wir den kommerziell erhältlichen FXR-Inhibitor Guggulsteron (Gu). Dieser Inhibitor ist nicht spezifisch genug um ausschließlich und vollständig alle FXR in den Tubuluszellen zu inhibieren. Er inhibiert auch andere rezeptorbindende Proteine (z.B. Nuclear factor-κB) [65]. Versuche mit FXR-Knockout-Mäusen wurden bereits beschrieben und zeigten eine Beeinträchtigung der Urinkonzentrierung im Mausmodell [32]. Um allerdings Rückschlüsse auf einen tubulospesifischen Effekt von TUDCA zu ermöglichen, müssten FXR-loxP-Mäuse (**locus of X-over P1**) in Kombination mit einem Tubuli-Cre-exprimierenden Mausmodell (**cyclization recombination**) verwendet werden. FXR-loxP-Mäuse sind derzeit nicht verfügbar. Alternativ könnten für eine suffiziente Unterdrückung der Genexpression des FXR, FXR-Knockdown-Mäuse mithilfe des Morpholino-Oligomers [66], welches in der Molekularbiologie für die Genmodifizierung Verwendung findet, hergestellt werden. Mithilfe dessen könnte die

Spezifität der FXR-vermittelten Nephroprotektion TUDCAs weiter validiert werden, wengleich auch hier keine Spezifität auf die TUDCA-vermittelte Tubuloprotektion gegeben wäre.

Zusätzlich bleibt zu diskutieren, dass sich in bisherigen Studien widersprüchliche Daten zu ER-Stress-reduzierenden Effekten, vermittelt durch die Inhibition des RAAS (RAASi), finden. Während einige Studien keine ER-Stress-reduzierende Wirkung durch RAASi aufzeigten [67], was mit unseren Ergebnissen vereinbar wäre, zeigten andere Studien konträre Ergebnisse [68]. Ein Grund für diese gegensätzlichen Ergebnisse könnte eine unterschiedliche Behandlungsdauer der Versuchstiere sein.

Einen weiteren Diskussionspunkt stellen unterschiedliche Daten zu den Effekten TUDCAs auf den Glukosemetabolismus dar. Um aufzuzeigen, dass TUDCA seine nephroprotektiven Effekte unabhängig von einer Reduktion der Blutglukosekonzentration bereitstellt, wählten wir in unserer Arbeit eine Dosierung, bei der keine signifikanten Blutglukosereduktionen nachzuweisen waren. Andere Studien zeigten bei höheren TUDCA-Dosen (500 mg/kg KG, täglich) eine signifikante Reduktion des Blutzuckerspiegels [69]. Dies zeigt einen weiter zu verfolgenden Wirkungsmechanismus TUDCAs für die Therapie der dNP auf, da insbesondere die strikte Blutzuckereinstellung in den frühen Stadien der dNP zu einer Linderung führen kann [6]. Ebenso sollte die Dauer der Intervention Berücksichtigung finden. Wir führten lediglich eine Kurzzeitstudie mit einer Dauer von sechs Wochen durch. Hierdurch konnten mögliche spätere Blutzuckerreduktionen, eventuelle Nebenwirkungen oder Wirkungsverluste TUDCAs nicht aufgezeigt werden. Klinische Studien, die eine abschließende und auf den Menschen zutreffende Beurteilung erlauben würden, befinden sich noch in den Anfängen. So wird seit August 2015 in den USA (Columbia University) eine Interventionsstudie (TUDCA, 1750 mg, täglich vs. Placebo, NCT02218619) bei Patienten mit Diabetes mellitus (DM) Typ 1 durchgeführt und abschließende Ergebnisse werden für das Jahr 2018 erwartet. Eine klinische Studie, bei der das Outcome einer Ergänzung der Standardtherapie durch TUDCA mit der alleinigen Gabe der RAASi verglichen wird, existiert bisher nicht, soll aber in Kooperation mit Prof. L. Gnudi vom King's College in London durchgeführt werden.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass eine Intervention mit dem Gallensäurederivat TUDCA in diabetischen Mäusen nicht nur vor einer glomerulären, sondern auch vor einer tubulären Schädigung schützt. Der tubuloprotektive Effekt scheint durch den Farnesoid-X-Rezeptor (FXR) vermittelt zu werden. Sowohl in den Glomeruli als auch in den Tubuli vermindert TUDCA eine maladaptive ER-Stress-Reaktion, was dem schützenden

Mechanismus zu Grunde liegen könnte. Da TUDCA im Mausmodell einen schützenden Effekt zusätzlich zur RAASi vermittelt, ist zu hoffen, dass die vorliegenden Daten zu translationalen Studien führen werden.

5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Der Diabetes mellitus (DM) zählt mit einer weltweiten Prävalenz von 422 Millionen in 2014 ohne Zweifel zu den gehäuft in der westlichen Welt auftretenden Erkrankungen [2]. Die pathologische Manifestation des DM in verschiedenen Organsystemen, darunter auch die renale Beteiligung, erfolgt meist erst Jahrzehnte nach Krankheitsbeginn [70]. Die resultierende diabetische Nephropathie (dNP) ist dabei für ca. 40 Prozent der neu diagnostizierten Nierenerkrankungen im Endstadium verantwortlich, was bei ca. 8 Mio. an DM erkrankten Menschen allein in Deutschland (Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2010) eine beträchtliche Zahl darstellt. Die derzeitige und seit Jahren etablierte Standardtherapie der RAAS-Inhibition (RAASi) vermochte in unserem Modell zwar die Progression der dNP zu verringern, konnte aber bei fortgeschrittener dNP nicht zu einer Linderung der ausgeprägten tubulären Schäden beitragen. Wir haben in dieser Arbeit gezeigt, dass durch eine zusätzliche Gabe des Gallensäurederivats Tauroursodeoxycholsäure (tauroursodeoxycholic acid, TUDCA, T) ein zusätzlicher Schutz der Niere erreicht werden kann. Während in unserem Modell, die RAASi mithilfe des ACE-Inhibitors (ACEi) Enalapril (E) lediglich protektive Effekte auf das glomeruläre Kompartiment verzeichnete, zeigte TUDCA (T), neben einer ebenfalls nachweisbaren glomeruloprotektiven Komponente, eine hervorragende Protektion des tubulären Kompartiments. Dieser „ganzheitliche“ Schutz der Niere vor den Folgeschäden der dNP führte zu einer signifikant geringeren Albuminurie, zu einer Reduktion glomerulärer und tubulärer Schäden und zu einer teilweisen Wiederherstellung der Nierenfunktion im diabetischen Mausmodell (db/db Mäuse). Darüber hinaus konnten wir einen möglichen Rezeptor identifizieren, der in den Wirkmechanismus der TUDCA-vermittelten Tubuloprotektion eingebunden ist: der Farnesoid-X-Rezeptor (FXR). Zusätzlich konnten wir zeigen, dass dieser Rezeptor spezifisch in tubulären Zellen exprimiert wird und dass eine Inhibition des FXR durch den Antagonisten Z-Guggulsteron (Gu) den tubuloprotektiven Effekt von TUDCA (T) aufhob. Diese Ergebnisse legen nahe, dass der ACEi Enalapril (E) und das Gallensäurederivat TUDCA (T) durch zwei voneinander unabhängige Mechanismen eine Nephroprotektion vermitteln und dass die Kombination beider Therapien (E+T) zu einem zusätzlichen Schutz des renalen Gewebes führen kann. Zur Klärung der Frage, ob TUDCA (T) auch einen klinischen Nutzen für Patienten mit dNP vermittelt, sind jetzt klinische Studien notwendig. Der Nachweis eines Nutzens von TUDCA zusätzlich zur Standardtherapie der RAASi könnte ein Meilenstein für die zukünftige Therapie der dNP sein.

6 Referenzen

1. Wild, S. et al.: *Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030*. Diabetes Care, 2004. **27**(5): p. 1047-53.
2. Collaboration, N.C.D.R.F.: *Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants*. Lancet, 2016. **387**(10027): p. 1513-30.
3. Remuzzi, G., A. Schieppati, and P. Ruggenenti: *Clinical practice. Nephropathy in patients with type 2 diabetes*. N Engl J Med, 2002. **346**(15): p. 1145-51.
4. Forbes, J.M., K. Fukami, and M.E. Cooper: *Diabetic nephropathy: where hemodynamics meets metabolism*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2007. **115**(2): p. 69-84.
5. Ghaderian, S.B. et al.: *Diabetes and end-stage renal disease; a review article on new concepts*. J Renal Inj Prev, 2015. **4**(2): p. 28-33.
6. Remuzzi, G. and P. Ruggenenti: *Slowing the progression of diabetic nephropathy*. N Engl J Med, 1993. **329**(20): p. 1496-7.
7. Fried, L.F. et al.: *Combined angiotensin inhibition for the treatment of diabetic nephropathy*. N Engl J Med, 2013. **369**(20): p. 1892-903.
8. Remuzzi, G. and T. Bertani: *Pathophysiology of progressive nephropathies*. N Engl J Med, 1998. **339**(20): p. 1448-56.
9. Abbate, M., C. Zoja and G. Remuzzi: *How does proteinuria cause progressive renal damage?* J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(11): p. 2974-84.
10. Iordache, B.E. et al.: *Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on glomerular capillary wall ultrastructure in MWF/Ztm rats*. J Am Soc Nephrol, 1994. **5**(6): p. 1378-84.
11. Macconi, D. et al.: *Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on glomerular basement membrane permeability and distribution of zonula occludens-1 in MWF rats*. J Am Soc Nephrol, 2000. **11**(3): p. 477-89.
12. Thangaraju, P. et al.: *Dual blockade of Renin Angiotensin system in reducing the early changes of diabetic retinopathy and nephropathy in a diabetic rat model*. N Am J Med Sci, 2014. **6**(12): p. 625-32.
13. Harty, J.: *Prevention and management of acute kidney injury*. Ulster Med J, 2014. **83**(3): p. 149-57.
14. Navis, G. et al.: *ACE inhibitors and the kidney. A risk-benefit assessment*. Drug Saf, 1996. **15**(3): p. 200-11.
15. Klimontov, V.V. et al.: *Acute-phase serum proteins and adipocytokines in women with type 2 diabetes mellitus: Relationships with body composition and blood glucose fluctuations*. Ter Arkh, 2016. **88**(10): p. 35-41.

16. Gnudi, L., R.J. Coward and D.A. Long: *Diabetic Nephropathy: Perspective on Novel Molecular Mechanisms*. Trends Endocrinol Metab, 2016. **27**(11): p. 820-830.
17. Cunard, R.: *Endoplasmic Reticulum Stress in the Diabetic Kidney, the Good, the Bad and the Ugly*. J Clin Med, 2015. **4**(4): p. 715-40.
18. Kozutsumi, Y. et al.: *The presence of malformed proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins*. Nature, 1988. **332**(6163): p. 462-4.
19. Hetz, C.: *The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(2): p. 89-102.
20. Jager, R. et al.: *The unfolded protein response at the crossroads of cellular life and death during endoplasmic reticulum stress*. Biol Cell, 2012. **104**(5): p. 259-70.
21. Tabas, I. and D. Ron: *Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(3): p. 184-90.
22. Madhusudhan, T. et al.: *Defective podocyte insulin signalling through p85-XBP1 promotes ATF6-dependent maladaptive ER-stress response in diabetic nephropathy*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 6496.
23. Qi, W. et al.: *Attenuation of diabetic nephropathy in diabetes rats induced by streptozotocin by regulating the endoplasmic reticulum stress inflammatory response*. Metabolism, 2011. **60**(5): p. 594-603.
24. Inagi, R.: *Endoplasmic reticulum stress as a progression factor for kidney injury*. Curr Opin Pharmacol, 2010. **10**(2): p. 156-65.
25. Cunard, R. and K. Sharma: *The endoplasmic reticulum stress response and diabetic kidney disease*. Am J Physiol Renal Physiol, 2011. **300**(5): p. F1054-61.
26. Heathcote, E.J.: *Management of primary biliary cirrhosis. The American Association for the Study of Liver Diseases practice guidelines*. Hepatology, 2000. **31**(4): p. 1005-13.
27. Leuschner, U., M.P. Manns and R. Eisebitt: *Ursodeoxycholic acid in the therapy for primary biliary cirrhosis: effects on progression and prognosis*. Z Gastroenterol, 2005. **43**(9): p. 1051-9.
28. Cullen, S.N. and R.W. Chapman: *The medical management of primary sclerosing cholangitis*. Semin Liver Dis, 2006. **26**(1): p. 52-61.
29. Peng, P. et al.: *Preconditioning With Tauroursodeoxycholic Acid Protects Against Contrast-Induced HK-2 Cell Apoptosis by Inhibiting Endoplasmic Reticulum Stress*. Angiology, 2015. **66**(10): p. 941-9.
30. Fang, L. et al.: *Involvement of endoplasmic reticulum stress in albuminuria induced inflammasome activation in renal proximal tubular cells*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e72344.

31. Chen, Y. et al.: *Effect of taurine-conjugated ursodeoxycholic acid on endoplasmic reticulum stress and apoptosis induced by advanced glycation end products in cultured mouse podocytes*. Am J Nephrol, 2008. **28**(6): p. 1014-22.
32. Zhang, X. et al.: *Farnesoid X receptor (FXR) gene deficiency impairs urine concentration in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(6): p. 2277-82.
33. Gui, T. and Z. Gai: *Genome-wide profiling to analyze the effects of FXR activation on mouse renal proximal tubular cells*. Genom Data, 2015. **6**: p. 31-2.
34. Wang, B., P.C. Chandrasekera and J.J. Pippin: *Leptin- and leptin receptor-deficient rodent models: relevance for human type 2 diabetes*. Curr Diabetes Rev, 2014. **10**(2): p. 131-45.
35. 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.
36. Considine, R.V. et al.: *Mutation screening and identification of a sequence variation in the human ob gene coding region*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **220**(3): p. 735-9.
37. Masuo, K. et al.: *Leptin-receptor polymorphisms relate to obesity through blunted leptin-mediated sympathetic nerve activation in a Caucasian male population*. Hypertens Res, 2008. **31**(6): p. 1093-100.
38. Mathew, R. et al.: *Meprin-alpha in chronic diabetic nephropathy: interaction with the renin-angiotensin axis*. Am J Physiol Renal Physiol, 2005. **289**(4): p. F911-21.
39. Meng, Q. et al.: *Alisol B 23-acetate promotes liver regeneration in mice after partial hepatectomy via activating farnesoid X receptor*. Biochem Pharmacol, 2014. **92**(2): p. 289-98.
40. Shahzad, K. et al.: *Nlrp3-inflammasome activation in non-myeloid-derived cells aggravates diabetic nephropathy*. Kidney Int, 2015. **87**(1): p. 74-84.
41. 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.
42. 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.
43. Shahzad, K. et al.: *Caspase-1, but Not Caspase-3, Promotes Diabetic Nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2016. **27**(8): p. 2270-5.
44. Madhusudhan, T. et al.: *Cytoprotective signaling by activated protein C requires protease-activated receptor-3 in podocytes*. Blood, 2012. **119**(3): p. 874-83.
45. Wang, H. et al.: *The lectin-like domain of thrombomodulin ameliorates diabetic glomerulopathy via complement inhibition*. Thromb Haemost, 2012. **108**(6): p. 1141-53.
46. He, J.C. et al.: *Systems biology of kidney diseases*. Kidney Int, 2012. **81**(1): p. 22-39.

47. Woroniecka, K.I. et al.: *Transcriptome analysis of human diabetic kidney disease*. Diabetes, 2011. **60**(9): p. 2354-69.
48. Racusen, L.C. et al.: *Cell lines with extended in vitro growth potential from human renal proximal tubule: characterization, response to inducers, and comparison with established cell lines*. J Lab Clin Med, 1997. **129**(3): p. 318-29.
49. Edgell, C.J., C.C. McDonald and J.B. Graham: *Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(12): p. 3734-7.
50. Guo, F. et al.: *FXR induces SOCS3 and suppresses hepatocellular carcinoma*. Oncotarget, 2015. **6**(33): p. 34606-16.
51. Hu, T. et al.: *Farnesoid X receptor agonist reduces serum asymmetric dimethylarginine levels through hepatic dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1 gene regulation*. J Biol Chem, 2006. **281**(52): p. 39831-8.
52. Mencarelli, A. et al.: *The plant sterol guggulsterone attenuates inflammation and immune dysfunction in murine models of inflammatory bowel disease*. Biochem Pharmacol, 2009. **78**(9): p. 1214-23.
53. Guan, B. et al.: *Inhibition of farnesoid X receptor controls esophageal cancer cell growth in vitro and in nude mouse xenografts*. Cancer, 2013. **119**(7): p. 1321-9.
54. Chen, Y.M. et al.: *Laminin beta2 gene missense mutation produces endoplasmic reticulum stress in podocytes*. J Am Soc Nephrol, 2013. **24**(8): p. 1223-33.
55. Wang, X.X. et al.: *G Protein-Coupled Bile Acid Receptor TGR5 Activation Inhibits Kidney Disease in Obesity and Diabetes*. J Am Soc Nephrol, 2016. **27**(5): p. 1362-78.
56. Carow, B. and M.E. Rottenberg: *SOCS3, a Major Regulator of Infection and Inflammation*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 58.
57. Croker, B.A., H. Kiu and S.E. Nicholson: *SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway*. Semin Cell Dev Biol, 2008. **19**(4): p. 414-22.
58. Ortiz-Munoz, G. et al.: *Suppressors of cytokine signaling abrogate diabetic nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2010. **21**(5): p. 763-72.
59. Ding, H. et al.: *A novel loss-of-function DDAH1 promoter polymorphism is associated with increased susceptibility to thrombosis stroke and coronary heart disease*. Circ Res, 2010. **106**(6): p. 1145-52.
60. Nakagawa, T. et al.: *Diabetic endothelial nitric oxide synthase knockout mice develop advanced diabetic nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(2): p. 539-50.
61. Momeni, A. et al.: *Correlation of Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphism (GG, TT and GT Genotype) with Proteinuria and Retinopathy in Type 2 Diabetic Patients*. J Clin Diagn Res, 2016. **10**(2): p. OC32-5.
62. Zeng, R. et al.: *A meta-analysis on the relationship of eNOS 4b/a polymorphism and diabetic nephropathy susceptibility*. Ren Fail, 2014. **36**(10): p. 1520-35.

63. Huo, P. et al.: *Association between genetic polymorphisms of ACE & eNOS and diabetic nephropathy*. Mol Biol Rep, 2015. **42**(1): p. 27-33.
64. Jacobi, J. et al.: *Overexpression of dimethylarginine dimethylaminohydrolase reduces tissue asymmetric dimethylarginine levels and enhances angiogenesis*. Circulation, 2005. **111**(11): p. 1431-8.
65. Noh, E.M. et al.: *Cis-guggulsterone inhibits the IKK/NF-kappaB pathway, whereas trans-guggulsterone inhibits MAPK/AP-1 in MCF7 breast cancer cells: guggulsterone regulates MMP9 expression in an isomer-specific manner*. Int J Mol Med, 2013. **31**(2): p. 393-9.
66. Summerton, J.: *Morpholino antisense oligomers: the case for an RNase H-independent structural type*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1489**(1): p. 141-58.
67. Hartner, A. et al.: *Renal protection by low dose irbesartan in diabetic nephropathy is paralleled by a reduction of inflammation, not of endoplasmic reticulum stress*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1842**(4): p. 558-65.
68. Sun, H.L. et al.: *ACE-inhibitor suppresses the apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress in renal tubular in experimental diabetic rats*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2009. **117**(7): p. 336-44.
69. Zhang, J. et al.: *Tauroursodeoxycholic Acid Attenuates Renal Tubular Injury in a Mouse Model of Type 2 Diabetes*. Nutrients, 2016. **8**(10).
70. 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.

7 Danksagung

Als erstes möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Berend Isermann danken, der mir die Möglichkeit gab, eine Forschungsarbeit in seinem Institut aufzunehmen. Ohne die finanzielle und fachliche Unterstützung seinerseits wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen.

Mein weiterer Dank gilt meinem mittlerweile langjährigen Freund, Arbeitskollegen und gleichberechtigten Erstautor Moh'd Mohanad Al-Dabet, welcher mir mit Rat und Tat zur Seite stand und mir immer wieder andere Betrachtungsweisen aufzeigte.

Zusätzlich möchte ich gerne dem kompletten Laborpersonal der Forschungsabteilung für die exzellente technische Unterstützung danken.

Das Beste kommt ja bekanntlich zum Schluss. Deshalb möchte ich hier sehr gerne meiner Frau und großen Liebe Laura danken, welche mich immer unterstützte und die immer Verständnis für lange Laborabende hatte. Darüber hinaus möchte ich natürlich auch meine zwei Prinzessinnen nicht vergessen: Leni Sophie & Lotta – Ich liebe euch über alles und danke euch und eurer Mama, dass es euch gibt.

8 Ehrenerklärung

Name: Andi Marquardt

Anschrift: Wilhelm-Niemann-Straße 1, 39112 Magdeburg

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

Farnesoid-X-Rezeptor-Agonismus schützt vor diabetischer Tubulopathie und wirkt ergänzend zur Standardtherapie der RAAS-Inhibition

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

mit 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

Andi Marquardt

9 Publikationen und Darstellung des Bildungsweges

Andi Marquardt

geboren am 13.06.1987 in Magdeburg

Publikationen

A. Marquardt, M. M. Al-Dabet, F. Bock, K. Shahzad, T. Madhusudhan, B. Isermann: *Tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) ameliorates both tubular and glomerular injury in diabetic nephropathy, thus providing an added value to ACE-inhibition*

Poster Präsentation DGKL, Okt. 2015 & ASN Kidney Week Nov. 2015

A. Marquardt, M. M. Al-Dabet, S. Ghosh, S. Kohli, J. Manoharan, A. Elwakiel, I. Gadi, F. Bock, S. Nazir, H. Wang, J. A. Lindquist, P. P. Nawroth, T. Madhusudhan, P. R. Mertens, K. Shahzad, B. Isermann: *Farnesoid X Receptor Agonism Protects against Diabetic Tubulopathy: Potential Add-On Therapy for Diabetic Nephropathy*

JASN 2017 Jul 10 (PMID 28696246)

T. Madhusudhan, H. Wang, S. Ghosh, W. Dong, V. Kumar, M. M. Al-Dabet, J. Manoharan, S. Nazir, A. Elwakiel, F. Bock, S. Kohli, **A. Marquardt**, I. Sögüt, K. Shahzad, A. J. Müller, C. T. Esmon, P. P. Nawroth, J. Reiser, T. Chavakis, W. Ruf, B. Isermann: *Signal integration at the PI3K-p85-XBP1 hub endows coagulation protease activated protein C with insulin like function*

Blood 2017 Jul 7 (PMID 28687614)

Schul- und Hochschulausbildung, beruflicher Werdegang

12/2017	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11/2016 – 11/2017	Praktisches Jahr an den Lehrkrankenhäusern des Universitätsklinikums Magdeburg (Klinikum Olvenstedt – Anästhesiologie, AMEOS Klinikum Schönebeck – Chirurgie, Pfeiffersche Stiftungen Magdeburg – Innere Medizin)
10/2016	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/2014 – 12/2017	Mitarbeit in der Forschungsabteilung des Institutes für Klinische Chemie und Pathobiochemie (Leiter Prof. Dr. med. B. Isermann)
10/2013 – 09/2016	Klinik an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
08/2013	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2011 – 07/2013	Vorklinik an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
08/2008 – 07/2011	Erlangung der allgemeinen Hochschulreife an der Schule des 2. Bildungsweges (S2B) in Magdeburg
01/2008 – 08/2008	Biologielaborant im LAV Stendal
08/2004 – 01/2008	Ausbildung zum Biologielaboranten im LAV Stendal