

Aus dem Lehrstuhl
für Physiologie II
Prof. Dr. med. Frank Schweda
der Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

**Anpassungsvorgänge des Nephrons an die Hemmung der Glukoseresorption durch
SGLT2-Inhibitoren**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Magdalena Schwarzfischer

2023

Aus dem Lehrstuhl
für Physiologie II
Prof. Dr. med. Frank Schweda
der Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

**Anpassungsvorgänge des Nephrons an die Hemmung der Glukoseresorption durch
SGLT2-Inhibitoren**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Magdalena Schwarzfischer

2023

Dekan:	Prof. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Frank Schweda
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Matthias Mack
Tag der mündlichen Prüfung:	03. April 2023

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	6
1.	Aufbau und Funktion der Niere	6
1.1	Glomerulus.....	6
1.2	Tubulussystem	7
1.2.1	Proximaler Tubulus	9
1.2.1.1	Wesentliche Resorptionsvorgänge im proximalen Tubulus	9
1.2.1.2	Glukoseresorption im proximalen Tubulus	9
1.2.1.3	Wasserresorption im proximalen Tubulus	11
1.2.2	Distaler Tubulus	12
1.2.2.1	Dicker aufsteigender Teil der Henle-Schleife.....	12
1.2.2.2	Makula densa	12
1.2.2.3	Distales Konvolut.....	14
1.2.3	Sammelrohr	14
2.	Diabetische Nephropathie	15
2.1	Diabetes mellitus - Epidemiologie, Pathophysiologie und Therapie.....	15
2.2	Diabetische Nephropathie und chronische Nierenerkrankung (Chronic Kidney Disease, CKD).....	16
3.	SGLT2-Inhibitoren: Wirkmechanismus und protektive Effekte.....	18
3.1	Wirkmechanismus und pharmakologische Eigenschaften.....	18
3.2	Aktuelle Studienlage zur beobachteten Kardio- und Nephroprotektion unter Therapie mit SGLT2-Inhibitoren	19
3.3	Renale Hypertrophie unter SGLT2-Inhibition.....	23
4.	Fragestellung der Arbeit.....	23
II.	Material und Methoden	25
1.	Zellbiologische Methoden (Zellkultur)	25

1.1	Kultivierung und Passagieren der Zelllinien.....	25
1.2	Einfrieren und Auftauen der Zelllinien.....	26
1.3	Zählen und Aussäen der Zellen.....	26
2.	Stimulation der Zellen.....	27
3.	Superfusion von proximalen Tubuluszellen.....	27
4.	DNA- und Protein-Bestimmung.....	29
4.1	Lyse der Zellen	29
4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	29
4.3	Bestimmung der DNA-Konzentration	29
5.	Molekularbiologische Methoden.....	30
5.1	RNA-Isolation aus Zellpellets.....	30
5.2	RNA-Quantifizierung	31
5.3	Reverse Transkription der isolierten RNA (cDNA-Synthese).....	31
5.4	Real Time Quantitative Polymerasekettenreaktion (RTqPCR)	32
5.5	DNA-Agarosegelelektrophorese.....	33
III.	Ergebnisse	34
1.	Stimulationsversuche unter statistischen Bedingungen	34
1.1	MDCK-C7-Zelllinie.....	35
1.2	LLC-PK1-Zelllinie.....	38
1.3	M-1-Zelllinie.....	40
2.	Superfusionsversuche mit LLC-PK1-Zellen.....	45
3.	Real Time Quantitative PCR.....	49
3.1	SGLT2- und SGLT1-Gen	49
3.2	TGFBR1- und TGFBR2-Gen	50
IV.	Diskussion	52
1.	Anpassungsvorgänge des Nephrons infolge der SGLT2-Inhibition durch Empagliflozin - Vergleich Tierversuch vs. Zellkulturexperiment	52

1.1	Distaler Tubulus (MDCK-C7) und Sammelrohr (M-1).....	53
1.2	Proximaler Tubulus (LLC-PK1).....	55
2.	Nephroprotektive Mechanismen unter SGLT2-Inhibition.....	57
2.1	Reaktivierung des tubuloglomerulären Feedback-Mechanismus	57
2.2	Verringerte Aktivität des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems	58
2.3	Steigerung der Ketogenese	58
2.4	Schutz vor Hypoxie, oxidativem Stress und Fibrose - Rolle des Transkriptionsfaktors HIF-1 α	59
3.	Induktion einer Hypertrophie durch TGF β	61
V.	Zusammenfassung und Ausblick	62
VI.	Anhang	64
VII.	Literaturverzeichnis.....	68
VIII.	Danksagung.....	80

I. Einleitung

1. Aufbau und Funktion der Niere

Die paarig angelegten Nieren spielen eine Schlüsselrolle in der Regulation verschiedener Körperfunktionen. Sie sind nicht nur Ausscheidungsorgan, sondern tragen ebenso zur Elektrolythomöostase bei, justieren den Blutdruck und sind metabolisch aktiv. Darüber hinaus sind sie einerseits Angriffsort verschiedener Hormone, andererseits werden in ihnen selbst Botenstoffe mit systemischer Wirkung synthetisiert [92].

Die menschliche Niere gliedert sich grundsätzlich in Rinde (*Kortex*), Mark (*Medulla*) und Nierenbecken (*Pyelon*) mit angeschlossenem Abflusssystem - beginnend mit dem Ureter. Im Gegensatz zu kleinen Säugern, die unipapilläre Nieren besitzen, ist die humane Niere multipapillär aufgebaut. Das heißt, dass sie sich aus etwa sieben bis neun homologen Untereinheiten, sogenannten *Lobi renales*, zusammensetzt, die pränatal zu einem Organ verschmelzen. Die etwa 1 cm dicke Nierenrinde, die die Nierenkörperchen (*Glomeruli*) enthält, umschließt dabei die etwa sieben bis neun Markpyramiden an deren Basis und dehnt sich auch zwischen diesen als *Columnae renales* aus [57].

Die funktionelle Untereinheit des Nierenparenchyms stellen der Glomerulus und das daran angeschlossene Tubulussystem dar, welche zusammengefasst als Nephron bezeichnet werden. Über einen Verbindungstubulus fließt der Harn von etwa elf Nephronen in ein gemeinsames Sammelrohr ab. Mehrere dieser vereinigen sich zu immer größeren Gangsystemen und münden schließlich als *Ductus papillares* in die Spitze (Papille) des pyramidenförmigen Marks. Dort wird der Endharn in das Nierenbeckenkelchsystem ausgeschieden [57, 92].

1.1 Glomerulus

Bei den Glomeruli handelt es sich um feine Kapillarknäuel, die jeweils über ein Vas afferens gespeist werden und in ein Vas efferens abfließen. Die beiden Gefäße bilden den sogenannten Gefäßpol des Nierenkörperchens. Eingebettet sind die Gefäße in ein sogenanntes Mesangium, das das feine Gefäßgeflecht stützt und an Phagozytose von Proteinen sowie Entzündungsprozessen mitwirkt [10, 57].

Jeder Glomerulus wird von einer doppelwandigen Bowman-Kapsel umschlossen und bildet damit ein Nierenkörperchen im eigentlichen Sinne. In der physiologischen Terminologie werden die Begriffe Glomerulus und Nierenkörperchen häufig synonym verwendet. Das viszerale und parietale Blatt der Bowman-Kapsel, die sich am Gefäßpol vereinigen, begrenzen

dabei den Kapselraum, der den Primärharn auffängt. Zwischen Kapillarlumen und Kapselraum markiert ein dreischichtiger Filter die Blut-Harn-Schranke. Moleküle mit einer Masse über 80 kDa wie Globuline oder Erythrozyten werden dadurch zurückgehalten, wohingegen Wasser und Moleküle mit einer Masse von 6-15 kDa, beispielweise Harnstoff und Glukose, ungehindert passieren können. Diese Trennung liegt in der komplexen Architektur dieses Filters begründet, der sich aus dem Kapillarendothel, der glomerulären Basalmembran und dem Schlitzdiaphragma zwischen den Podozyten – den fingerförmigen sekundären Epithelausläufern des viszeralen Blattes der Bowman-Kapsel – zusammensetzt. Jede der einzelnen Schichten enthält negativ geladene Bestandteile und bedingt damit eine zusätzliche Selektion der gefilterten Moleküle nach ihrer Ladung, wobei nach aktuellem Stand die Glykokalyx des Kapillarendothels vermutlich den größten Beitrag leistet. Pro Minute filtrieren die Glomeruli durch dieses hochspezialisierte Maschenwerk 120 mL Plasmaflüssigkeit, wobei der effektive Filtrationsdruck, der durch den Kapillardruck, den onkotischen Druck des Plasmas sowie den Druck im Tubulus beeinflusst wird, die Triebkraft dieses Vorgangs darstellt. Ergebnis dessen ist ein Ultrafiltrat des Blutes, der sogenannte Primärharn [57, 92].

1.2 Tubulussystem

Im Tubulussystem wird der Primärharn durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Resorptions- und Sekretionsvorgänge zum Endharn konzentriert. Dem glomerulären Gefäßpol gegenüberliegend befindet sich der Harnpol. Hier schließt sich ausgehend von der Bowman-Kapsel der proximale Tubulus, der den Beginn des mehrsegmentären Tubulussystem definiert, an. Die Nierenkanälchen (*Tubuli renales*) gliedern sich jeweils in einen proximalen Tubulus, einen Intermediärtubulus, einen distalen Tubulus und einen Verbindungstubulus mit Mündung in ein Sammelrohr (siehe Abbildung 1.1). Proximaler und distaler Tubulus werden weiter in eine im Rindenlabyrinth lokalisierte *Pars convoluta* und eine in der Medulla liegende *Pars recta* unterteilt, die beiden Anteile definieren so die Grenze zwischen Kortex und Medulla. Der Intermediärtubulus gliedert sich in ein *Crus descendens* und ein *Crus ascendens*. Der vorwiegend in der Physiologie verwendete Terminus „Henle-Schleife“ schließt Pars recta des proximalen und distalen Tubulus sowie den Intermediärtubulus mit ein [57]. Der proximale Tubulus lässt sich zusätzlich in drei Segmente untergliedern: Segment S1 umfasst den Großteil der *Pars convoluta*, Segment S2 schließt die Endabschnitte der *Pars convoluta* und den Anfang der *Pars recta* mit ein und Segment S3 meint letztendlich den Rest der *Pars recta* und befindet sich vollständig intramedullär [92].

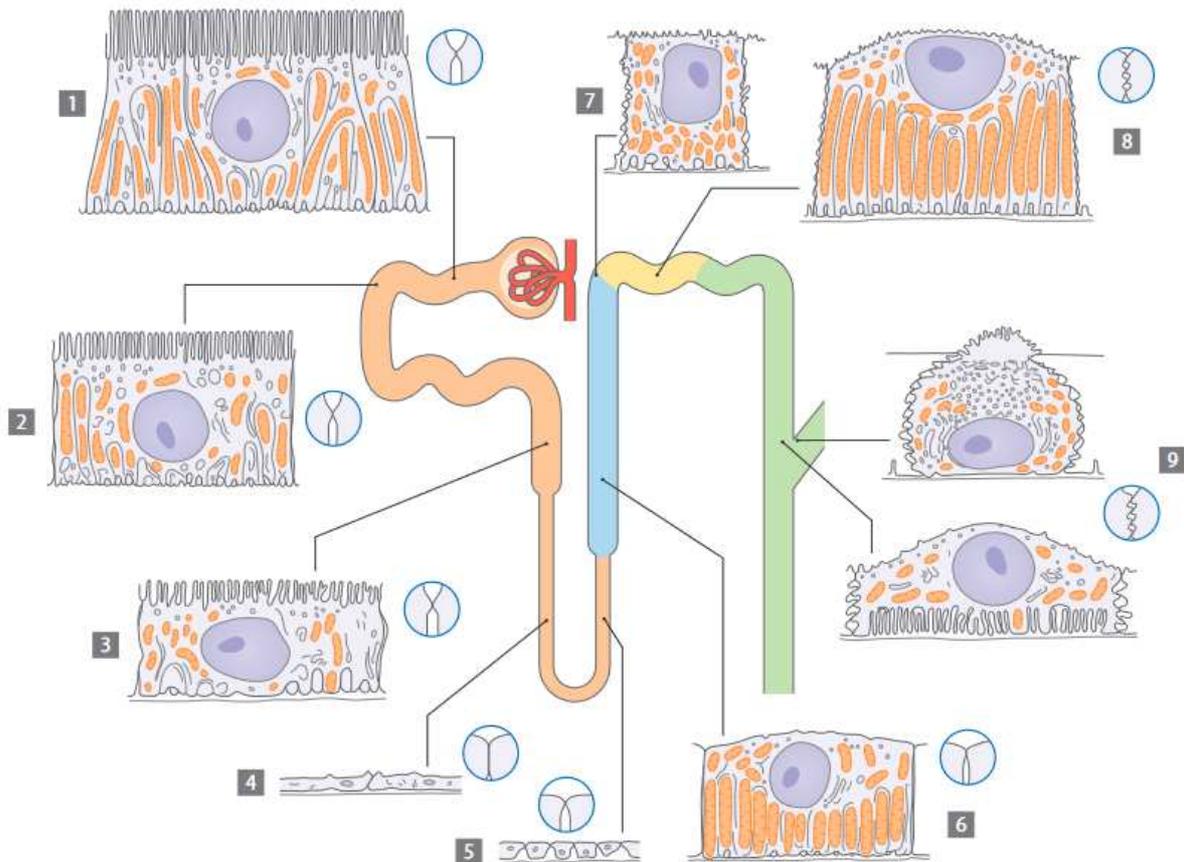


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des Nephrons mit histologischem Aufbau und Zell-Zell-Kontakten der Epithelzellen der einzelnen Tubulusabschnitte; (1-3) Segmente des proximalen Tubulus, (4-5) Crus descendens (4) und ascendens (5) des Intermediärtubulus, (6) Pars recta des distalen Tubulus, (7) Makula densa, (8) distales Konvolut, (9) kortikaler Teil des Sammelrohres mit Schaltzelle und Hauptzelle

(Nach Bulger u. Dobyán 1982, Kriz u. Kaissling 1992 aus Bleich M, Lang F (2019) Aufbau der Niere und glomeruläre Filtration. In: Brandes R, Lang F, Schmidt R F (Hrsg.) Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie, 32. Auflage. Springer, Berlin, S. 398 [10])

Da in der vorliegenden Arbeit lediglich die Abschnitte proximaler und distaler Tubulus sowie Sammelrohr im Zellkulturmodell simuliert wurden, wird an dieser Stelle auf eine nähere Charakterisierung der Eigenschaften des Intermediärtubulus und Verbindungstubulus verzichtet und auf die Inhalte entsprechender Standardwerke verwiesen [57, 92].

1.2.1 Proximaler Tubulus

Der proximale Tubulus leistet im Gesamtsystem den größten Anteil, um die im Primärharn enthaltenen Moleküle gemeinsam mit dem Wasser zu resorbieren. So werden etwa zwei Drittel des im Glomerulus filtrierte Wassers, des Natriums und des Chlorids entlang dieses Tubulusabschnittes zurückgewonnen [26]. Dies spiegelt sich auch im histologischen Aufbau der Zellen wider, die optimal an ihre Transportaufgabe angepasst sind. Ein Bürstensaumepithel mit langen Mikrovilli an der luminalen Membran sowie eine ausgeprägte Fältelung basolateral vergrößern die für Transportvorgänge zur Verfügung stehende Gesamtoberfläche enorm. Allein die luminalen Seite der proximalen *Partes convolutae* beider Nieren weist damit eine Gesamtfläche zwischen 40 und 80 m² auf [57, 92]. Zahlreiche Mitochondrien liefern die Energie für die basolateralen Na⁺/K⁺-ATPasen, die den wesentlichen Motor für sämtliche Resorptionsvorgänge im gesamten Tubulussystem darstellen, indem sie einen transepithelialen elektrochemischen Gradienten über der luminalen Zellmembran aufbauen [57].

1.2.1.1 Wesentliche Resorptionsvorgänge im proximalen Tubulus

Insbesondere Na⁺-gekoppelte Transportprozesse leisten einen wesentlichen Beitrag an den im proximalen Tubulus stattfindenden Resorptionsvorgängen. Unterschieden werden dabei elektroneutrale Na⁺/H⁺-Antiportcarrier und Na⁺-Symportcarrier. Erstere sind entscheidend an der Resorption von Bikarbonat beteiligt. Im Austausch mit einem Na⁺-Ion nach intrazellulär erfolgt der Transport eines H⁺-Ions nach extrazellulär, welches dort mit Bikarbonat zu Kohlensäure reagiert und unter Katalyse durch die Carboanhydrase IV in der luminalen Zellwand in Kohlenstoffdioxid und Wasser zerfällt. Kohlenstoffdioxid diffundiert schließlich transmembranär in die Zelle, wo es über eine intrazelluläre Carboanhydrase letztendlich wieder in Bikarbonat umgewandelt wird, das über einen basolateral sitzenden Na⁺,3HCO³⁻-Symporter aus der Zelle transportiert wird [12, 92]. D-Glukose, Galactose, Phosphat, Sulfat, L-Aminosäuren, Laktat, Acetat, Citrat, Acetoacetat, Succinat sowie weitere organische Säuren wie Vitamin C hingegen verlassen das Tubulussystem über Na⁺-Symportcarrier [12, 92]. Im Hinblick auf die Thematik der Arbeit soll der Fokus im Folgenden auf der Glukoseresorption liegen, während auf die genauen Resorptionsvorgänge der restlichen Stoffe im proximalen Tubulus nicht näher eingegangen wird.

1.2.1.2 Glukoseresorption im proximalen Tubulus

D-Glukose gelangt von luminal über SGLT1 und SGLT2 (sodium-glucose transporter, Typ 1 und 2) in die proximale Tubuluszelle und verlässt den Intrazellulärraum über GLUT2 (glucose transporter 2) auf der basalen Zellmembran (siehe Abbildung 1.2).

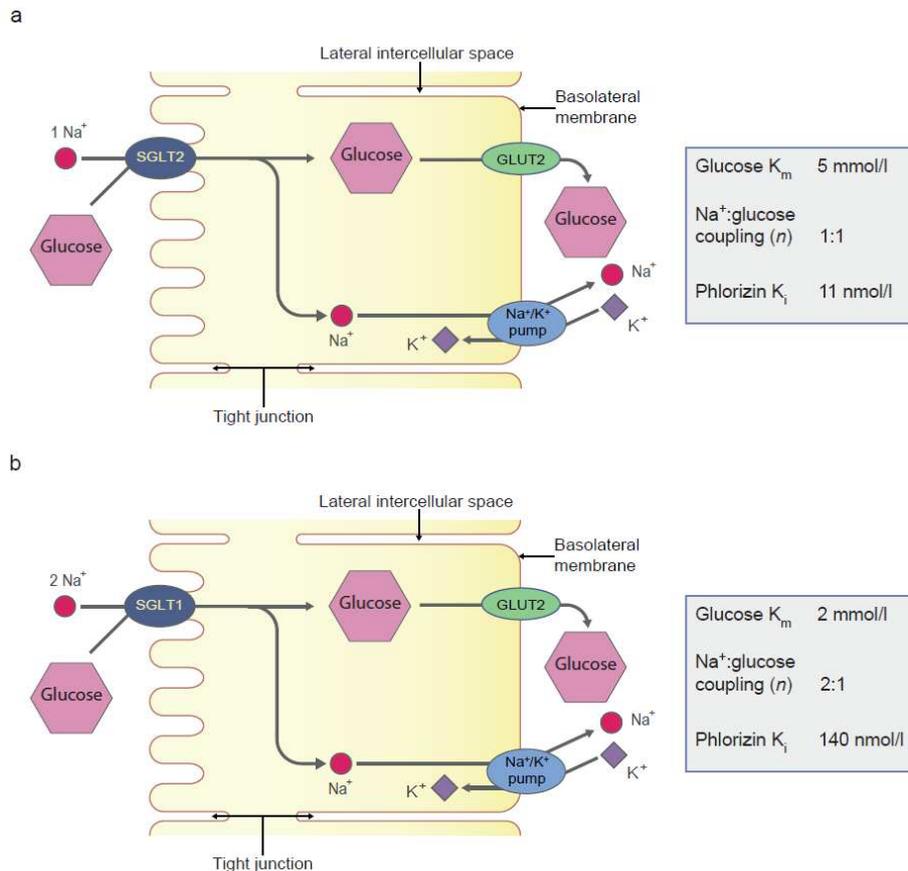


Abbildung 1.2: Glukoseresorption im proximalen Tubulus

(aus Ghezzi et al (2018) Diabetologia DOI 10.1007/s00125-018-4656-5; Adapted from Wright et al (2011), distributed under the terms of the CC BY 4.0 Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)[32])

Beide Natrium-Glucose-Transporter weisen unterschiedliche Eigenschaften auf. Gemeinsam ist ihnen aber, dass sie über den durch die basolaterale Na⁺/K⁺-ATPase aufgebauten elektrochemischen Na⁺-Gradienten sekundär aktiv Glukose im Symport mit Na⁺-Ionen nach intrazellulär befördern. SGLT2 wird vor allem in den Segmenten S1 und S2 des proximalen Tubulus exprimiert. Der Transporter besitzt zwar einerseits eine hohe Transportkapazität, andererseits ist seine Affinität jedoch gering. Pro Glukosemolekül wird gleichzeitig ein Na⁺-Ion ins Zytoplasma befördert. Der hochaffine SGLT1 hingegen findet sich im Segment S3, wobei mit jedem transportierten Glukosemolekül zwei Na⁺-Ionen in die Zelle gelangen, wodurch der Carrier eine hohe Triebkraft besitzt. Der Großteil der filtrierten Glukose wird in den Segmenten S1/S2 und somit über SGLT2 resorbiert. SGLT1 leistet unter physiologischen Umständen einen deutlich geringeren Anteil an der Glukosetransportkapazität im proximalen Tubulus, hat aber gleichzeitig eine hohe potentielle Reservetransportkapazität von bis zu 70 %

der filtrierten Glukosemenge. Durch diese luminalen Resorptionsvorgänge ist der Primärharn am Ende des proximalen Tubulus fast vollständig glukosefrei [12, 32, 92].

Der Uniporter GLUT2 wird basolateral sowohl im S1/S2- als auch S3-Segment exprimiert, über ihn verlässt die intrazellulär akkumulierte Glukose die Epithelzelle und gelangt so in den Blutstrom [32, 92].

Die Glukoseaufnahme im proximalen Tubulus unterliegt einer Sättigungskinetik. Unter physiologischen Bedingungen beträgt die Glukoseplasmakonzentration 5 mmol/L. Bis zu einer Glukoseplasmakonzentration von 10 mmol/L, entsprechend 180 mg/dL, kann die Transportkapazität für Glukose gesteigert werden bis sie ihr Maximum erreicht. Wird diese Konzentrationsschwelle schließlich überschritten, sind die luminalen Symporter erschöpft und die Glukose wird nicht resorbiert, sondern mit dem Harn ausgeschieden. Da Glukose im Tubulussystem zusätzlich als osmotisch aktives Molekül wirkt, wird gleichzeitig auch weniger Wasser resorbiert, was letztendlich in einer Polyurie und Glukosurie resultiert. Dies lässt sich beispielweise bei unbehandelten oder medikamentös schlecht therapierten Diabetikern mit stark erhöhten Blutglukosespiegel beobachten [92].

1.2.1.3 Wasserresorption im proximalen Tubulus

Insgesamt erfolgt die Resorption im proximalen Tubulus isoosmotisch. Das heißt, dass die Menge an resorbiertem Wasser proportional zur Menge an resorbierten osmotisch aktiven Molekülen – hier vor allem Natrium- und Chlorid-Ionen – ist [26].

Wasser wird neben dem transzellulären Weg über Aquaporin-1 auch parazellulär resorbiert. Letzteres wird durch die Tatsache ermöglicht, dass die Epithelzellen im proximalen Tubulus den Intra- vom Extrazellulärraum nicht dicht abschließen, sondern es sich bei den Zell-Zell-Kontakten um sogenannte „lecke“ Tight Junctions handelt [57]. Verschiedene Moleküle und Ionen gelangen über die unterschiedlichen, oben beschriebenen Transporter in die Tubuluszelle und wirken dort osmotisch aktiv. Die dadurch entstehenden Konzentrationsunterschiede zwischen Tubuluslumen und Interstitium stellen die Triebkraft für den Wassereinstrom auf parazellulärem Wege dar. Gemeinsam mit dem Wasser strömen gelöste Ionen wie Na^+ , Cl^- , K^+ , Ca^{2+} oder Mg^{2+} , die die Tight Junctions problemlos passieren können, im Sinne eines *solvent drags* trotz geringen elektrochemischen Gradienten ebenfalls nach parazellulär [12, 92]. Den größeren Anteil an der Wasserpermeabilität in diesem Abschnitt haben allerdings die in der apikalen und basolateralen Zellmembran exprimierten Aquaporin-1-Kanäle, über die Wasser transzellulär das Lumen verlässt [92].

1.2.2 Distaler Tubulus

Entscheidender Unterschied zwischen proximalem und distalem Tubulus ist die Wasserundurchlässigkeit des Epithels. Die Resorption von Stoffen erfolgt nun nicht mehr isoosmotisch, sondern dem Harn werden Elektrolyte entzogen, ohne dass gleichzeitig Wasser resorbiert wird, wodurch er insgesamt hypoton wird [57].

Wie unter 1.2 beschrieben unterteilt sich der distale Tubulus in eine *Pars recta*, die gleichzeitig dem dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife entspricht, und eine *Pars convoluta*. Im Bereich zwischen beiden *Partes* schmiegt sich der distale Tubulus eng an das Mesangium zwischen Vas afferens und Vas efferens. Das Tubulusepithel an dieser Stelle wird als Makula densa bezeichnet [57].

1.2.2.1 Dicker aufsteigender Teil der Henle-Schleife

Bedeutendster Carrier im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife ist der luminale Na^+ , K^+ , 2Cl^- -Kotransporter 2 (NKCC2), der pro Transportzyklus ein Natrium-Ion gemeinsam mit einem Kalium-Ion und zwei Chlorid-Ionen nach intrazellulär befördert. Auch hier ist wiederum eine basolaterale Na^+/K^+ -ATPase Triebkraft für den elektrogenen Na^+ -Symport. Das intrazellulär akkumulierte K^+ verlässt die Zelle entweder über einen luminalen K^+ -Kanal (ROMK) oder im Symport mit Cl^- auf der basolateralen Seite. Cl^- wird daneben ebenfalls über basolaterale Cl^- -Kanäle (ClCKb/Barttin) nach extrazellulär aus der Zelle geschleust [12, 92].

Infolge dieser beschriebenen Transportprozesse wird ein lumenpositives transepitheliales Potential aufgebaut, welches einen parazellulären Transport von Na^+ , Ca^{2+} und Mg^{2+} ermöglicht. Insgesamt werden je nach Quellen im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife so 20-30 % des filtrierten Ca^{2+} sowie 60-70 % des filtrierten Mg^{2+} resorbiert. Dabei spielt vor allem das Tight-Junction-Protein Claudin-16 (= Paracellin-1) eine entscheidende Rolle [12, 92].

1.2.2.2 Makula densa

Die Makula densa bildet gemeinsam mit dem extraglomerulären Mesangium und den juxtaglomerulären Zellen den juxtaglomerulären Apparat. Bei den juxtaglomerulären Zellen handelt es sich um die glatten Muskelzellen in der Wand des Vas afferens des Glomerulus. In ihnen ist das Enzym Renin gespeichert. Das System ist entscheidend an der Vermittlung des sogenannten tubuloglomerulären Feedbacks – einem Regulationsmechanismus zur raschen Anpassung der glomerulären Filtrationsrate an Tonizitätsschwankungen im Tubulussystem – beteiligt. Die Zellen der Makula densa messen dabei einerseits über den apikalen

Na^+ , K^+ , 2Cl^- -Kotransporter 2 (NKCC2) die Natriumchloridkonzentration im Urin, andererseits auch über ihre apikalen Zilien den Fluss im Tubuluslumen [10, 26, 57, 94].

Insbesondere der Höhe des Cl^- -Spiegels kommt dabei eine entscheidende Bedeutung zu. Werden die Transportkapazitäten proximaler Tubulusabschnitte überschritten steigt die Tonizität des Urins und die Zellen der Makula densa registrieren eine erhöhte Cl^- -Konzentration im Vergleich zum Sollwert. Cl^- strömt apikal über den NKCC2 ins Zytoplasma und verlässt die Zelle auf der basolateralen Seite über einen entsprechenden Cl^- -Kanal, was zu einer Depolarisation der Zellmembran führt, was eine Ausschüttung der Mediatoren Adenosintriphosphat (ATP) oder seines Metaboliten Adenosin triggert (siehe Abbildung 1.3). Die Muskelzellen des Vas afferens verfügen in ihrer Membran über entsprechende Purinrezeptoren, an die ATP und Adenosin binden können. Über komplexe Signalkaskaden wird dadurch ein intrazellulärer Einstrom von Ca^{2+} induziert, der eine Kontraktion des Vas afferens zur Folge hat. Der intraglomeruläre Druck und damit die glomeruläre Filtrationsrate sinken [6–8, 11, 26, 40, 72, 85, 94].

Bei zu niedriger Urintonizität und damit niedrigerer Cl^- -Konzentration im Vergleich zum Sollwert schütten die Epithelzellen der Makula densa vasodilatatorische Mediatoren wie Prostaglandine (z.B. PGE_2) (siehe Abbildung 1.3) oder Stickstoffmonoxid (NO) aus, während die Ausschüttung von Adenosin sistiert. Durch die Vasodilatation des Vas afferens steigt der Filtrationsdruck und mit ihm die glomeruläre Filtrationsrate [26].

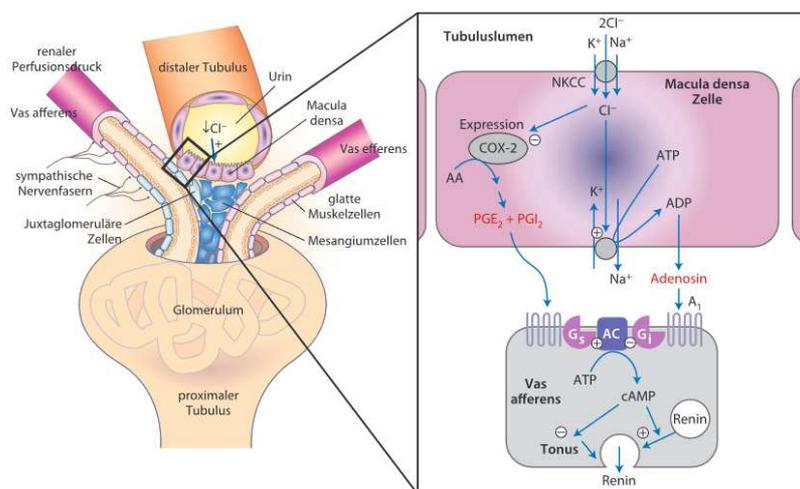


Abbildung 1.3: Prinzip des tubuloglomerulären Feedbacks

(aus Offermanns S (2016) Diuretika. In: Freissmuth M, Offermanns S, Böhm S (Hrsg.) Pharmakologie und Toxikologie. Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie, 2. Aufl. 2016. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S. 396 [69])

Jedes Nephron hat dabei seinen eigenen juxtaglomerulären Apparat und reguliert so über das tubuloglomeruläre Feedback ganz individuell seine eigene spezifische glomeruläre Filtrationsrate unabhängig von den anderen Nephronen [10].

Auch die Freisetzung von Renin wird unter anderem über die durch die Zellen der Makula densa registrierte Natriumchloridkonzentration vermittelt, Renin spielt jedoch keine Rolle beim tubuloglomerulären Feedbackmechanismus [11].

1.2.2.3 Distales Konvolut

Im distalen Konvolut wird ein positiv geladenes Na^+ -Ion gemeinsam mit einem negativ geladenen Cl^- -Ion und damit elektroneutral über einen NaCl -Kotransporter in die Tubuluszelle aufgenommen. Na^+ verlässt die Zelle über eine basale Na^+/K^+ -ATPase. Das intrazellulär angesammelte K^+ rezirkuliert entweder über basale K^+ -Kanäle oder gemeinsam mit Cl^- über einen KCl -Symport wieder nach extrazellulär. Cl^- kann daneben auch über basale Cl^- -Kanäle wieder in den Extrazellulärraum strömen [12].

Daneben ist dieser Tubulusabschnitt an der Kalziumhomöostase beteiligt, indem er die Ausscheidung von Ca^{2+} reguliert. Über apikale Ca^{2+} -Kanäle (TRPV5) gelangt Ca^{2+} nach intrazellulär, wird dann dort durch Calbindin gebunden und verlässt die Zelle auf der basalen Seite über eine Ca^{2+} -ATPase oder einen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter. Auf vergleichbarem Wege wird im distalen Konvolut ebenfalls Mg^{2+} über TRP-Kanäle (TRPM6 und TRPM7) resorbiert und über Mg^{2+} -ATPasen oder $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Antiporter wieder in den Blutkreislauf aufgenommen [12].

1.2.3 Sammelrohr

Im Sammelrohr erfolgt die Feinjustierung der Urinkonzentration. Man unterscheidet hier grundsätzlich zwei Arten von Zelltypen: Haupt- und Schaltzellen, welche sich weiter in Typ A- und Typ B-Schaltzellen unterteilen lassen [12, 57].

Die beiden wichtigsten luminalen Transporter der Hauptzellen sind Na^+ (ENaC, Epithelial Natrium Channel) - und K^+ -Kanäle (v.a. ROMK), deren Expression unter dem Einfluss des Hormons Aldosteron steht. Aldosteron bindet an einen intrazellulären Mineralokortikoidrezeptor und induziert so die Transkription und Aktivität der beiden Kanäle. Eine vermehrte Hormonausschüttung führt so zu einer verstärkten Na^+ -Resorption und K^+ -Sekretion. Die Aufnahme von Na^+ -Ionen ist eng an die Abgabe von K^+ -Ionen geknüpft. Die Aufnahme eines positiv geladenen Na^+ -Ions geht mit einer Depolarisation der Zellmembran einher, was die Triebkraft für die Sekretion des ebenfalls positiv geladenen K^+ -Ions darstellt.

Motor für den elektrogenen Na^+ -Transport ist wiederum eine basolateral lokalisierte Na^+/K^+ -ATPase, welche ebenfalls aldosteronabhängig exprimiert und aktiviert wird [11, 12].

Die Schaltzellen erfüllen eine wichtige Aufgabe in der Regulation des Säure-Base-Haushalts. Vereinfacht dargestellt sezernieren Typ A-Schaltzellen bei Azidose H^+ -Ionen und resorbieren HCO_3^- -Ionen. Umgekehrt sezernieren die in geringerem Maße vorhandenen Typ B-Schaltzellen bei Alkalose HCO_3^- -Ionen und resorbieren H^+ -Ionen. Dabei ist anzumerken, dass es sich bei Typ A und Typ B weniger um verschiedene Zellarten handelt, sondern vielmehr um unterschiedliche Funktionszustände und deshalb je nach Stoffwechsellage entsprechende Umbauvorgänge von einem Funktionszustand in den anderen möglich sind [12, 57, 92].

Die luminale Wasserresorption im Sammelrohr erfolgt über Aquaporin-2-Kanäle, die basolaterale Wassersekretion hingegen über Aquaporin-3-Kanäle beziehungsweise in den marknahen Bereichen auch über Aquaporin-4-Kanäle. Während Aquaporin-3 und -4 quasi dauerhaft in der basalen Zellmembran exprimiert werden, wird Aquaporin-2 erst unter dem Einfluss des Antidiuretischen Hormons (ADH, Synonym: Vasopressin) in die luminale Membran eingebaut. ADH, das im Hypophysenhinterlappen synthetisiert wird, bindet dabei an einen membranösen V_2 -Rezeptor und stimuliert über eine cAMP-vermittelte Signalkaskade die Freisetzung des in zytoplasmatischen Vesikeln gespeicherten Aquaporin-2 mittels Exozytose, wodurch das Epithel permeabel für Wassermoleküle wird [57, 87].

2. Diabetische Nephropathie

2.1 Diabetes mellitus - Epidemiologie, Pathophysiologie und Therapie

Aus der letzten Datenerhebung der International Diabetes Federation (IDF) im Jahr 2021 geht hervor, dass weltweit mehr als 537 Millionen Menschen zwischen 20 und 79 Jahren an Diabetes mellitus leiden, was einer Prävalenz von rund zehn Prozent in der Gesamtbevölkerung entspricht [44].

Durch eine gestörte Insulinproduktion und/oder -wirkung gerät der Glukose- und Lipidstoffwechsel bei den Betroffenen aus dem Gleichgewicht und führt dadurch zu einer Hyperglykämie, dem Leitsymptom der Krankheit [77]. Mit einem Anteil von 85 % ist der Diabetes Typ II dabei die häufigste Form. Die chronische Hyperglykämie erleichtert die nichtenzymatische Glykosylierung der Aminogruppen von Proteinen, wobei sowohl reversible als auch nichtreversible Endprodukte entstehen. Letztere lagern sich als „Advanced Glycation

End Products“ (AGEs) gemeinsam mit Lipiden und Serumproteinen in die Gefäßwände ein und begünstigen dadurch die Entstehung einer Atherosklerose [93]. Die Induktion sowohl einer unspezifischen Makroangiopathie als auch einer diabetesspezifischen Mikroangiopathie - insbesondere in Niere, Auge, Nervensystem und Herz - ebnet schließlich den Weg für verschiedene Folgeerkrankungen [79].

Die Therapie des Diabetes mellitus Typ II baut auf mehreren Säulen auf. Primär stehen dabei Lebensstilmodifikationen und die Reduktion von kardiovaskulären Risikofaktoren im Mittelpunkt. Entscheidende Stellschrauben sind dabei die Punkte Ernährungsumstellung, Bewegungssteigerung sowie Gewichtsreduktion, langfristiges Ziel ist dabei die Erhöhung der Insulinsensitivität. Erst sekundär, wenn unter diesen Maßnahmen der HbA1c-Wert nicht adäquat gesenkt werden kann, wird eine Medikation mit oralen Antidiabetika erforderlich. Mittel der ersten Wahl ist dabei bislang Metformin. Bei unzureichendem Therapieansprechen trotz Kombination zweier verschiedener oraler Antidiabetika kann schließlich auf eine ergänzende Insulintherapie eskaliert werden [78].

2.2 Diabetische Nephropathie und chronische Nierenerkrankung (Chronic Kidney Disease, CKD)

Bei 20-40 % aller Diabetiker manifestiert sich im Laufe ihrer Erkrankung eine diabetische Nephropathie, die sich durch eine persistierende Mikroalbuminurie mit einem Albumin-Kreatinin-Quotienten > 30 mg/g Kreatinin und eine reduzierte glomeruläre Filtrationsrate (GFR) von < 60 ml/min/1,73 m² auszeichnet. Die Nierenschädigung erhöht nicht nur das kardiovaskuläre Risiko, sondern ist oftmals mit einer diabetischen Retinopathie sowie - vor allem bei Typ II-Diabetikern - mit einer arteriellen Hypertonie vergesellschaftet [36, 79].

Pathogenetisch hypertrophieren die Zellen der Glomeruli unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren wie TGF- β 1, Endothelin und Angiotensin II, zudem verdickt sich die Basalmembran durch die Akkumulation von AGEs. Die glomeruläre Barriere wird undicht, wodurch Proteine im Urin erscheinen. Über die folgende Glomerulosklerose durch massiven Podozytenverlust und die interstitielle Fibrose manifestiert sich schließlich ein terminales Nierenversagen [2, 79, 83].

Klinisch verläuft die diabetische Nephropathie über drei Phasen: Initial präsentiert sie sich durch eine glomeruläre Hyperfiltration und eine ausgeprägte Proteinurie. Es kann sich ein nephrotisches Syndrom entwickeln, welches sich durch eine massive Proteinurie ($> 3,5$ g/d), Hypalbuminämie, Hypercholesterinämie und Ausbildung von Ödemen definiert, während

gleichzeitig die Niere kompensatorisch hypertrophiert. Durch die oben beschriebenen pathologischen Umbauprozesse normalisiert sich die Nierenfunktion im weiteren Verlauf vorübergehend und bleibt auf niedrigerem Niveau stabil. Im dritten Stadium der Erkrankung nimmt die Nierenleistung allerdings progredient bis zur Niereninsuffizienz ab [52, 79, 83].

Anhand der GFR unterscheidet man fünf Stadien der chronischen Nierenerkrankung (Chronic Kidney Disease, CKD). In Zusammenschau mit dem Ausmaß der gleichzeitig auftretenden Albuminurie kann daraus mit Hilfe der Kidney-Disease-Improving-Global-Outcomes (KDIGO)-Klassifikation (siehe Abbildung 1.4) die Prognose der CKD bestimmt werden [5, 47].

Prognosis of CKD by GFR and Albuminuria Categories: KDIGO 2012

				Persistent albuminuria categories		
				Description and range		
				A1	A2	A3
				Normal to mildly increased	Moderately increased	Severely increased
				<30 mg/g <3 mg/mmol	30-300 mg/g 3-30 mg/mmol	>300 mg/g >30 mg/mmol
				GFR categories (ml/min/1.73 m ²) Description and range	G1	Normal or high
G2	Mildly decreased	60-89				
G3a	Mildly to moderately decreased	45-59				
G3b	Moderately to severely decreased	30-44				
G4	Severely decreased	15-29				
G5	Kidney failure	<15				

Green: low risk (if no other markers of kidney disease, no CKD); Yellow: moderately increased risk; Orange: high risk; Red, very high risk.

Abbildung 1.4: Kidney-Disease-Improving-Global-Outcomes (KDIGO)-Klassifikation der chronischen Nierenerkrankung (CKD)

(aus Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) (Hrsg.) (2013) Summary of Recommendation Statements. Kidney international supplements 3, S. 6 [47])

Entscheidende Ziele, die in der Therapie der diabetischen Nephropathie angestrebt werden, sind neben einer Normoglykämie und Normotonie die Modifikation der Dyslipidämie. ACE (Angiotensin Converting Enzyme)-Hemmer und Angiotensin-Rezeptorantagonisten (ARBs) wirken dabei nicht nur antihypertensiv, sondern verlangsamen zusätzlich die Progredienz der Nephropathie und senken die kardiovaskuläre Gesamtmortalität. Durch die Hemmung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) wird durch eine über Bradykinin vermittelte Dilatation des Vas efferens der Filtrationsdruck im Glomerulus gesenkt und damit das Nephron

geschützt (siehe Abbildung 1.5). Bei nichtdiabetischer Nierenerkrankung kann durch RAAS-Blockade sogar eine Krankheitsregression erreicht werden [2, 50, 62, 79].

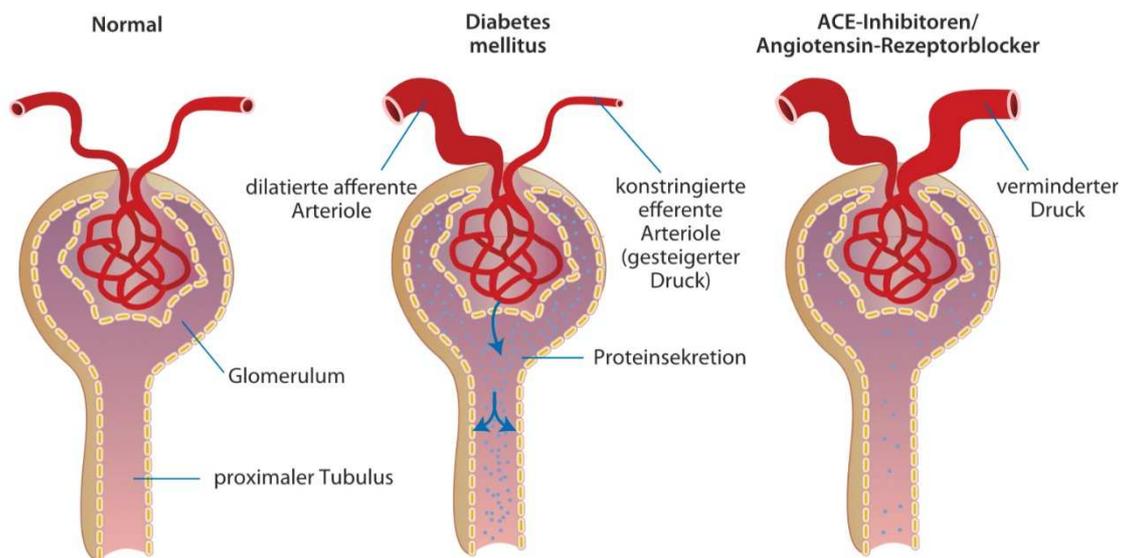


Abbildung 1.5: Wirkmechanismus der RAAS-Blockade bei diabetischer Nephropathie

(aus Offermanns S (2016) Inhibitoren des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems. In: Freissmuth M, Offermanns S, Böhm S (Hrsg.) Pharmakologie und Toxikologie. Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie, 2. Aufl. 2016. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S. 381 [70])

Trotz aller medikamentösen Interventionen zur Blutzucker- und Blutdrucksenkung machen Diabetiker noch immer knapp die Hälfte aller Dialysepatienten in Europa aus, weshalb die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien von großem gesamtgesellschaftlichem Interesse ist [14, 23].

3. SGLT2-Inhibitoren: Wirkmechanismus und protektive Effekte

3.1 Wirkmechanismus und pharmakologische Eigenschaften

Lange standen außer den RAAS-Inhibitoren keine alternativen Behandlungsmethoden zur Therapie der diabetischen Nephropathie zur Verfügung. Nun ist allerdings mit den SGLT2-Inhibitoren eine neue Substanzklasse in den Fokus gerückt, die den Markt durch ihre nephroprotektive Wirkung revolutioniert haben. Die bisherigen Beobachtungen in klinischen Studien sind insgesamt so vielversprechend, dass in der aktuellen Leitlinie der European Society of Cardiology zur Therapie des Diabetes mellitus Typ II mittlerweile SGLT2-

Inhibitoren der bisher etablierten Erstlinientherapie mit Metformin vorgezogen werden, wenn die Patienten kardiovaskuläre Risikofaktoren mitbringen [22]. Sie wirken im Gegensatz zu ACE-Hemmern und ARBs zusätzlich auf das Vas afferens und reaktivieren den durch die chronische Hyperglykämie gehemmten TGF-Mechanismus, der die pathologische Hyperfiltration bedingt (siehe Abbildung 1.5) [2]. Auf die genauen Einzelheiten der Wirk- und Protektionsmechanismen soll nun im Folgenden eingegangen werden.

Bei den SGLT2-Inhibitoren - auch als Gliflozine bezeichnet - handelt es sich um eine Klasse von Antidiabetika, die durch eine selektive Hemmung des natriumabhängigen Glukosetransporters im proximalen Tubulus der Niere zu einer vermehrten Ausscheidung von Glukose über den Urin und dadurch zu einer Senkung des Blutzuckerspiegels führen. Bekannteste Vertreter dieser Wirkstoffklasse sind Dapagliflozin, Canagliflozin und Empagliflozin, daneben sind auch Ertugliflozin und Sotagliflozin verfügbar. Bis auf Sotagliflozin ist allen bisher verfügbaren Gliflozinen eine hohe Selektivität bezüglich ihres pharmakologischen Targets SGLT2 gemeinsam. Empagliflozin weist dabei im Vergleich die höchste Affinität bezüglich SGLT2 auf und bindet 2500-mal stärker an SGLT2 als an SGLT1. Lediglich Sotagliflozin, das neben Dapagliflozin - in Kombination mit einer Insulintherapie - auch zur Behandlung eines Diabetes mellitus Typ I eingesetzt werden kann, zeigt eine ausreichend hohe Affinität bezüglich SGLT1, um die Glukoseresorption im Dünndarm zu unterbinden [3, 34, 71].

Neben der Senkung des Blutglukosespiegels ohne Risiko einer Hypoglykämie wirken SGLT2-Inhibitoren zusätzlich gewichtsreduzierend sowie harnsäuresenkend. Durch die pharmakologische Hemmung verbleibt Glukose als osmotisch aktives Molekül im Tubuluslumen und induziert folglich eine Glukosurie. Neben einer milden antihypertensiven Wirkung ergeben sich daraus aber auch etwaige unerwünschte Effekte wie Polyurie, Harndrang, Nykturie und Hypovolämie. Zusätzlich steigt das Risiko einer Ketoazidose sowie von urogenitalen Infektionen [35, 71].

3.2 Aktuelle Studienlage zur beobachteten Kardio- und Nephroprotektion unter Therapie mit SGLT2-Inhibitoren

In humanen Studien konnte nachgewiesen werden, dass SGLT2-Inhibitoren neben ihrer antidiabetischen Wirkung sowohl kardio- als auch nephroprotektive Effekte zeigen. In der EMPA-REG OUTCOME-Studie wurde bei Typ II-Diabetikern mit einem hohen kardiovaskulären Risiko unter Empagliflozin-Behandlung ein signifikant verringertes

Auftreten von letalen und nicht-letalen kardiovaskulären Ereignissen gegenüber der Kontrollgruppe verzeichnet. Die Nephroprotektion wurde hier allerdings nur als sekundärer Endpunkt registriert [109].

Um spezifisch auch die Auswirkungen auf die Nierenfunktion zu erfassen, wurde ein primärer kombinierter Endpunkt definiert, der sowohl die kardiovaskulären als auch renalen Effekte berücksichtigt, und die Daten unter neuen Gesichtspunkten analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) unter der Einnahme von Empagliflozin zunächst absank, im Verlauf aber wieder bis knapp an den ursprünglichen Wert anstieg und sich dann auf diesem Niveau stabilisierte. In der Placebo-Gruppe zeigte sich dagegen ein kontinuierlicher Abfall der Filtrationsleistung, die schließlich deutlich unter dem Wert der Behandlungsgruppe lag. Nach Absetzen des Empagliflozins erreichte die GFR schließlich wieder ihr Ausgangsniveau [101].

Auch in der CANVAS-Studie konnten die positiven Nebenwirkungen einer Therapie mit SGLT2-Inhibitoren gezeigt werden. Analog zu den Ergebnissen der EMPA-REG OUTCOME-Studie konnte durch eine Therapie mit Canagliflozin das Auftreten der vorher definierten Ereignisse Herz-Kreislauf-Tod, nicht-letaler Myokardinfarkt und nicht-letaler Schlaganfall signifikant reduziert werden. Allerdings wurde gleichzeitig eine signifikant erhöhte Zahl an Amputationen registriert [67]. Darüber hinaus zeichnete sich ebenfalls ein möglicher nephroprotektiver Effekt ab, was die Durchführung der CREDENCE-Studie mit gezielter Untersuchung renaler Endpunkte zur Folge hatte. Hierbei waren bereits die Zwischenergebnisse so erfolgsversprechend, dass die Studie vorzeitig beendet wurde. Eingeschlossen waren Patienten mit Diabetes mellitus Typ II und chronischer Nierenerkrankung mit Albuminurie. Zusätzlich zu einer vorbestehenden medikamentösen RAAS-Blockade wurden die Studienteilnehmer entweder mit Canagliflozin oder einem Placebo behandelt. Dabei zeigte sich bei dem Patientenkollektiv, welches Canagliflozin erhalten hatte, eine signifikante Reduktion des relativen Risikos, eine terminale Niereninsuffizienz zu entwickeln, um 32 %. Auch das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse war im Vergleich zur Placebo-Kontrolle signifikant verringert. In der CREDENCE-Studie wurde zudem - im Gegensatz zur CANVAS-Studie - keine erhöhte Amputationsrate unter Canagliflozin-Therapie festgestellt [75].

Im Rahmen der DECLARE-TIMI 58-Studie wurden ebenfalls Patienten mit Diabetes mellitus Typ II und kardiovaskulärem Risiko untersucht. Hier zeigte eine Behandlung mit Dapagliflozin gegenüber Placebo keinen Vorteil bezüglich des Auftretens der vorher definierten Ereignisse

Herz-Kreislauf-Tod, Myokardinfarkt und ischämischer Schlaganfall. Allerdings wurden in der DECLARE-TIMI 58-Studienpopulation Patienten mit einer Kreatinin-Clearance < 60 ml/min ausgeschlossen, bei den oben genannten Studien lag der Cut-off-Wert sonst bei einer Kreatinin-Clearance von 30 ml/min. Patienten der Dapagliflozin-Gruppe mussten jedoch seltener wegen einer Herzinsuffizienz in stationäre Krankenhausbehandlung. Auch im Zusammenhang mit dieser Studie konnte unter SGLT2-Inhibition eine Nephroprotektion beobachtet werden [102].

Bislang ist jedoch weitgehend ungeklärt, welche schützenden Mechanismen genau in der Niere durch die SGLT2-Hemmung aktiviert werden. Eine Vermutung besteht darin, dass Gliflozine an der Regulation des Gefäßtonus im Vas afferens des Glomerulus beteiligt sind. Bei Diabetes mellitus herrscht im Nephron eine hohe Glukosekonzentration vor, die über eine verstärkte Expression von Transportproteinen eine Hyperresorption von Glukose und Natriumchlorid im proximalen Tubulus induziert. Dadurch sinkt die Chloridkonzentration im Harn, was durch die Zellen der Makula densa registriert wird, und im Sinne des tubuloglomerulären Feedbacks in einer Dilatation des Vas afferens resultiert. Eine medikamentöse Inhibition des SGLT2 im proximalen Tubulus erhöht durch eine verminderte Natriumchlorid- und Glukoseaufnahme im Gegensatz dazu die Konzentration dieser Stoffe im Harn, was an der Makula densa eine verstärkte Freisetzung von Adenosin fördert, was letztendlich zu einer Vasokonstriktion im Vas afferens führt. Dadurch sinkt der Druck im Glomerulus, was unter anderem die nephroprotektive Wirkung der Gliflozine erklären könnte. Die therapeutische Kombination von SGLT2- und RAAS-Inhibitoren wird dabei als mögliche Strategie zur möglichst effektiven Senkung des intraglomerulären Drucks in Erwägung gezogen (siehe Abbildung 1.6) [2, 38].

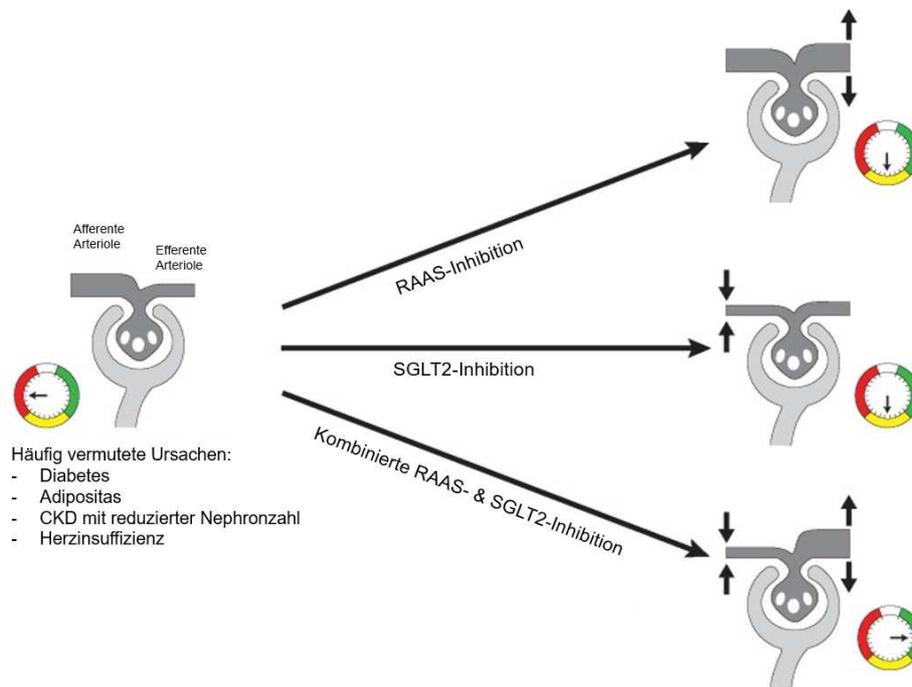


Abbildung 1.6: Auswirkungen von RAAS- und SGLT2-Inhibition auf den intraglomerulären Druck

(modifiziert aus Herrington W G, Preiss D, Haynes R, Eynatten M von, Staplin N, Hauske S J, George J T, Green J B, Landray M J, Baigent C, Wanner C (2018) The potential for improving cardio-renal outcomes by sodium-glucose co-transporter-2 inhibition in people with chronic kidney disease: a rationale for the EMPA-KIDNEY study. Clinical kidney journal 11. S. 751 [38])

Die DAPA-CKD-Studie [37] zeigt nun, dass der SGLT2-Inhibitor Dapagliflozin auch bei chronischer Niereninsuffizienz nicht-diabetischer Genese nephroprotektiv wirkt. Patienten der Dapagliflozin-Gruppe - mit und ohne Diabetes mellitus Typ II - entwickelten demnach im Vergleich zur Placebo-Gruppe seltener eine Nierenfunktionsverschlechterung oder eine terminale Niereninsuffizienz und starben seltener infolge renaler oder kardiovaskulärer Ursachen. Darüber hinaus verbesserte sich auch das Gesamtüberleben. Analog dazu erfolgte die Auswertung der EMPA-KIDNEY-Studie [39], die ähnlich der DAPA-CKD-Studie die nephroprotektiven Effekte einer Empagliflozin-Behandlung unabhängig von einer gleichzeitig vorliegenden Diabetes mellitus Typ II-Erkrankung untersuchte. Auch hier zeichnete sich frühzeitig eine Nephroprotektion unter SGLT2-Inhibition ab, weshalb die EMPA-KIDNEY-Studie genauso wie die DAPA-CKD-Studie bereits nach einer Zwischenanalyse aufgrund der positiven Ergebnisse frühzeitig beendet wurde. In diesen Beobachtungen kann möglicherweise

ein Schlüssel für die Entwicklung neuer Behandlungsansätze anderer hyperfiltrationsassoziierter Nierenerkrankungen gesehen werden [37, 39].

3.3 Renale Hypertrophie unter SGLT2-Inhibition

Im Rahmen von Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Schweda an C57BL/6JR Wildtyp Mäusen konnte unter achtwöchiger Behandlung mit dem SGLT2-Inhibitor Empagliflozin eine signifikante Zunahme des Nierengewichts im Vergleich zu Kontrolltieren beobachtet werden, während das Körpergewicht in beiden Gruppen nach acht Wochen Behandlung ähnlich hoch war (siehe Abbildung 1.7; nicht publizierte Daten AG Schweda).

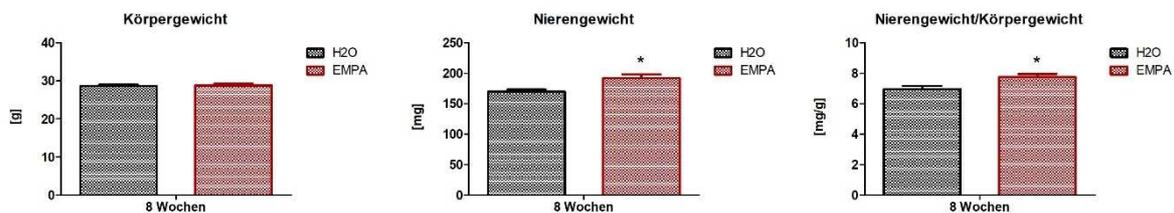


Abbildung 1.7: Körper- und Nierengewicht von C57BL/6JR Wildtyp Mäusen nach einer achtwöchigen Behandlung mit dem SGLT2-Inhibitor Empagliflozin (EMPA)

(nicht publizierte Daten AG Schweda)

In weiteren Untersuchungen der Arbeitsgruppe präsentierte sich schließlich mikroskopisch eine Zunahme der Zellfläche in SGLT2-negativen spätproximalen Tubuluszellen sowie Aquaporin-2-positiven Sammelrohrzellen (Vorarbeiten Frederick Sinha, AG Schweda). Dabei konnte jedoch nicht genauer differenziert werden, ob es sich hierbei um eine Hypertrophie im eigentlichen Sinne oder lediglich um eine Zellschwellung handelt.

4. Fragestellung der Arbeit

Bislang ist ungeklärt, wodurch sich die renale Hypertrophie auf makroskopischer und mikroskopischer Ebene, die sich unter Empagliflozin-Behandlung zeigt, erklären lässt. Im Rahmen der Arbeit soll deshalb untersucht werden, ob es sich dabei entweder um eine direkte oder indirekte Empagliflozin-Wirkung handelt. Einerseits könnte Empagliflozin im Sinne eines Off-Target-Effekts in weiter distal gelegenen Nephronabschnitten einen direkten Effekt erzielen. Andererseits könnte die SGLT2-Blockade im proximalen Tubulus aber auch einen

Shift der Natriumresorption nach distal und durch den dort erhöhten Workload eine kompensatorische Hypertrophie auslösen, was einer indirekten Empagliflozin-Wirkung entspräche.

Methode der Wahl zur Untersuchung eines direkten Effektes ist in diesem Fall das Zellkulturmodell. Durch die Verwendung verschiedener Zelllinien, die unterschiedliche Abschnitte des Nephrons repräsentieren, kann quasi in vitro ein vereinfachtes Modell von proximalem und distalem Tubulus sowie des Sammelrohres simuliert und eine mögliche segmentspezifische Wirkung des Empagliflozins detektiert werden. Durch Arbeit unter standardisierten Bedingungen vermindert sich der Einfluss systemischer Prozesse und mögliche indirekte Effekte des Medikaments im Gesamtsystem Niere werden unterbunden. Die Untersuchungen erfolgen dabei nicht nur unter statischen Inkubationsbedingungen, sondern - um die physiologischen Gegebenheiten im Nephron besser nachzuahmen - auch unter Flussbedingungen durch Überspülen der Zellen mittels Schlauchpumpe.

II. Material und Methoden

1. Zellbiologische Methoden (Zellkultur)

Die Daten, auf die sich diese Arbeit stützt, wurden mithilfe von in vitro-Versuchen erhoben. Goldstandard ist dabei das sterile Arbeiten, um Kontaminationen zu vermeiden. Deshalb erfolgte die Arbeit unter einer Sterilbank, wobei stets sterile Verbrauchsmaterialien verwendet und Gebrauchsgegenstände sowie Oberflächen mit 70%igem Ethanol desinfiziert wurden. Um eine bakterielle Besiedlung zu unterbinden, wurde dem Kulturmedium je 1 % Penicillin/Streptomycin hinzugefügt. Die Medien und Reagenzien wurden im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt.

1.1 Kultivierung und Passagieren der Zelllinien

Die Experimente wurden analog mit drei verschiedenen Zelllinien durchgeführt, die dabei drei verschiedene Abschnitte des Nephrons repräsentieren.

Als Modell für den distalen Tubulus dienten dabei die MDCK-C7-Zellen caninen Ursprungs. Ihre Kultivierung erfolgte in DMEM Kulturmedium (Low Glucose 1 g/L, L-Glutamine, Sodium Pyruvate) mit dem Zusatz von 10 % FCS (fetales Kälberserum), 1 % L-Glutamin und 1 % Pencillin/Streptomycin.

Zur Repräsentierung des proximalen Tubulus wurde die LLC-PK1-Zelllinie porciner Herkunft verwendet, die in DMEM/F12 (Ham) Kulturmedium mit dem Zusatz von 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin vermehrt wurde.

M-1-Zellen murinen Ursprungs, die in DMEM/F-12/Glutamax unter Zusatz von 10 % FCS, 1 % ITS, 100 nM Dexamethason und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert wurden, dienten als Modell für das Sammelrohr.

Die Inkubation aller Zelllinien erfolgte unter Standardbedingungen, das heißt bei einer Temperatur von 37 °C und unter Zufuhr von 5 % CO₂. Die Zellen wurden bis zur Ausbildung eines konfluenten Zellrasens in 75 cm² großen Zellkulturflaschen mit in der Kappe befindlichen Filtern kultiviert.

Um die Zellen zu passagieren beziehungsweise in bestimmten Zellzahlen auf 24 Well-Platten auszusäen, wurden die Zellen nach Absaugen des Zellmediums mit 10 mL DPBS gewaschen, um etwaige Mediumsreste zu entfernen. Anschließend wurde der Zellteppich mit 5 mL 10x Trypsin-EDTA-Lösung bedeckt. Nach fünfminütiger Inkubation (37 °C, 5 % CO₂) wurden die gelösten Zellen in 8 mL Kulturmedium überführt, um die enzymatische Reaktion des

Trypsins zu stoppen und eine mögliche Zellschädigung zu unterbinden. Nach Zentrifugation (1.000 Umdrehungen, 23 °C, 3 min) des Gemisches konnte der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in 4 mL Medium gelöst werden. Danach konnten – je nach Bedarf – verschiedene Volumina dieser Zellsuspension in neue Zellkulturflaschen, die mit je 15 mL vorgewärmtem Kulturmedium vorgefüllt waren, ausgesät werden.

1.2 Einfrieren und Auftauen der Zelllinien

Um Dauerkulturen anzulegen, wurden von jeder Zelllinie Pellets wie unter 1.1 beschrieben hergestellt, in 2 mL einer Mischung aus 90 % FCS und 10 % DMSO - einem Frostschutzmittel - gelöst und in zwei 1 mL Kryotubes überführt. Nachdem die Suspensionen bei -20 °C durchgefroren waren, wurden sie in Boxen bei -80 °C aufbewahrt.

Um die Zellen wieder aufzutauen, wurde der Inhalt der Kryotubes vorsichtig im 37 °C temperierten Wasserbad aufgetaut und anschließend in 15 mL vorgewärmtes Kulturmedium pipettiert. Nach 24 h erfolgte ein Wechsel des Mediums, um die schädigende Wirkung des Frostschutzmittels zu eliminieren.

1.3 Zählen und Aussäen der Zellen

Für die Stimations- und Superfusionsversuche erfolgte die Aussaat der Zellen auf oberflächenbeschichtete 24 Well-Platten. Analog wie unter 1.1 beschrieben wurde auch hier mit den Zellen verfahren und ein Pellet hergestellt, welches ebenfalls in 4 mL Medium gelöst wurde. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels der Neubauer improved-Zählkammer (Tiefe 0,1 mm), indem zwischen Objektträger und Deckglas 10 µL einer 1:10-Verdünnung der Zellsuspension pipettiert und die vier Großquadrate in den Ecken ausgezählt, deren Werte gemittelt und in folgender Formel verrechnet wurden:

$$\text{Zellzahl} = \text{Mittelwert} * 10 (\text{Kammerfaktor}) * 10 (1:10 \text{ Verdünnung der Zellsuspension}) * \\ 4000 (\text{Volumen der Zellsuspension})$$

Anhand der ermittelten Zellzahl pro Mikroliter wurden entsprechende Verdünnungen der 4 mL Zellsuspension hergestellt, sodass für die Stimationsversuche pro 500 µL serum- und hormonhaltigem Medium 100.000 (MDCK-C7, LLC-PK1) beziehungsweise 75.000 Zellen (M-1) enthalten waren. Durch kreisförmiges Pipettieren konnte ein möglichst gleichmäßiges Wachstum der Zellen auf dem Boden des Wells erzielt werden.

Für die Superfusionsversuche wurden höhere Zellzahlen gewählt, da hierfür konfluent bewachsene Well-Platten eingesetzt wurden.

2. Stimulation der Zellen

Bei den Zelllinien MDCK-C7 und M-1 erfolgte nach 24-stündiger Inkubation ein Wechsel auf serum- und hormonfreies Medium, in dem sie weitere 24 Stunden kultiviert wurden. Da die LLC-PK1-Zellen unter serumfreien Kulturbedingungen zur Ablösung neigten, wurde bei dieser Linie auf den Wechsel verzichtet und deshalb bereits am Tag nach der Aussaat stimuliert.

Die drei Zelllinien wurden analog mit verschiedenen Substanzen behandelt, die dem Kulturmedium hinzugefügt wurden. Für die MDCK-C7- und M-1-Zelllinien wurde dafür serum- und hormonfreies Medium verwendet, wohingegen die LLC-PK1-Zellen das serumhaltige Kulturmedium erhielten.

Als Zusatz kamen Empagliflozin (Carbosynth, FE43026, 1 μ M), DMSO (Dimethylsulfoxid; PanReac AppliChem) und TGF β (R&D Systems, 500pM) zum Einsatz. Das TGF β -Konzentrat wurde entsprechend der Gebrauchsanweisung des Herstellers in steriler 4 mM Salzsäure (HCl), die zusätzlich 0,1 % bovines Serumalbumin enthielt, auf eine Konzentration von 100 μ g/mL verdünnt. Der TGF β -Stock wurde schließlich auf kleine Reaktionsgefäße aufgeteilt, bei - 80 °C aufbewahrt und bei Bedarf wieder aufgetaut.

Da Empagliflozin nur in DMSO homogen in Lösung ging, wurden – um einen eventuellen Einfluss des Lösungsmittels auszuschließen – analog Zellen mit dem entsprechenden Volumen an DMSO inkubiert. Als Negativkontrolle für die Stimulation mit TGF β wurde Zellkulturmedium verwendet.

Pro Ansatz wurden sechs Wells einer 24 Well-Platte mit je 500 μ L befüllt. Anschließend wurden die Zellen für weitere 24 Stunden unter Standardbedingungen inkubiert und wie unter 4.1 beschrieben geerntet.

3. Superfusion von proximalen Tubuluszellen

Da die unter 2. beschriebenen statischen Kulturbedingungen die in vivo-Situation nur unzureichend widerspiegeln, wurde die Stimulation der Zellen mit Empagliflozin und DMSO mit Hilfe eines in vitro-Flusssystems wiederholt, um die mechanische Belastung der

Tubuluszellen bei Mehrbeladung zu imitieren. Der dazu erforderliche kontinuierliche Flüssigkeitsstrom wurde durch die REGLO Analog Schlauchpumpe von ISMATEC (Wertheim) erzeugt, deren Aufbau unter Abbildung 2 dargestellt ist [86]. Da es sich bei dem verwendeten Gerät um eine 4-Kanal-Peristaltikpumpe handelt, konnten gleichzeitig vier Wells einer 24 Well-Platte superfundiert werden. Dazu wurden in den Deckel über den betreffenden Wells gegenüberliegend je zwei Löcher gebohrt und darin jeweils eine 20 G-Kanüle gesteckt, die miteinander über einen an die Pumpe gekoppelten Schlauch in Verbindung stehen. Die Rotation der Pumpe sorgt dafür, dass das Medium zwischen den Kanülen transportiert und die Zellen somit gleichmäßig mit Medium überspült werden. Die Pumpe wurde in diesem Aufbau auf die Stufen 5, 10, 20 und 40 eingestellt, was den Flussgeschwindigkeiten 0,125 mm/s, 0,25 mm/s, 0,5 mm/s und 1 mm/s entspricht. Als Kontrolle wurden in vier weiteren Wells die Zellen unter statischen Bedingungen inkubiert. Für den Versuch wurden serum- und hormonfreies Medium und - im Gegensatz zu den Stimulationsversuchen - konfluent mit Zellen bewachsene 24 Well-Platten verwendet. Der Betrieb der Pumpe erfolgte im Inkubationsschrank, um ein Temperaturgefälle und Unterschiede in der CO₂-Konzentration zu vermeiden. Das Gesamtvolumen des Mediums pro superfundierter Untereinheit setzte sich aus 700 µL pro Well und 1,2 mL im Schlauchsystem zusammen.

Die Superfusion erfolgte für 20 Stunden, bevor die Zellen wie unter 4.1 beschrieben geerntet wurden.

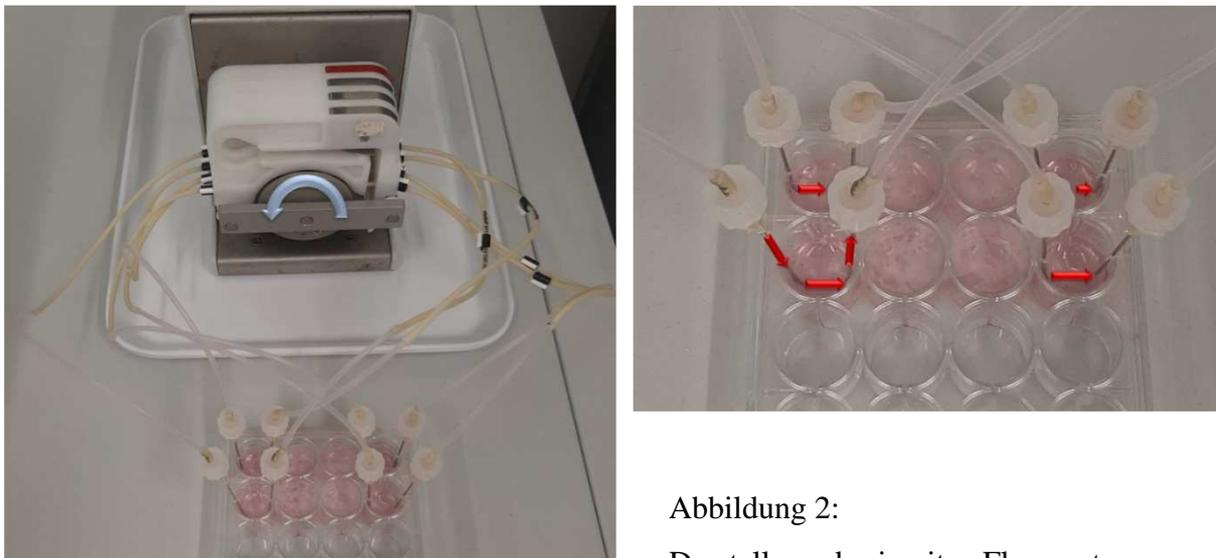


Abbildung 2:
Darstellung des in vitro-Flusssystems
(eigene Aufnahme)

4. DNA- und Protein-Bestimmung

4.1 Lyse der Zellen

Am Ende der Inkubationszeit der stimulierten beziehungsweise superfundierten Zellen wurden diese zur Bestimmung ihres Protein- und DNA-Gehaltes geerntet.

Dazu wurde zunächst das Medium in den Wells vorsichtig vom Rand ausgehend abgesaugt, woraufhin ein zweimaliges Waschen mit je 1 mL PBS-Puffer erfolgte. Anschließend wurden die Zellen mit je 400 μ L autoklaviertem und sterilfiltriertem H₂O pro Well lysiert und bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Bevor die Zelllysate bei -80 °C schockgefroren wurden, stellte man die Platten für etwa zehn Minuten auf einen Schüttler, um die Freisetzung des Zellinhalts zu fördern. Nach dem Auftauen wurde der Inhalt der Wells in beschriftete 1,5 mL Mikroreaktionsgefäße aliquotiert – 110 μ L für die Bestimmung der Proteinkonzentration und 290 μ L für die Bestimmung der DNA-Konzentration – und bis zur Verarbeitung bei -20 °C aufbewahrt.

4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die 110 μ L-Aliquots zur Bestimmung der Proteinkonzentration ließ man zunächst bei Raumtemperatur auftauen und lagerte sie während der weiteren Verarbeitung anhand des „Protein Quantification Assay“ von Macherey-Nagel auf Eis. Um die spätere Quantifizierung zu ermöglichen, wurde zunächst laut beiliegendem Protokoll eine Verdünnungsreihe des beiliegenden BSA (Rinderserumalbumin, Stammkonzentration 1 μ g/L) hergestellt, in Duplikaten zu je 20 μ L auf eine 96 Well-Platte mit flachem Boden pipettiert und pro Well 40 μ L PSB (Protein Solving Buffer) hinzugegeben. Anschließend fügte man zu jedem der Aliquots ebenfalls 40 μ L PSB hinzu und mischte diese sorgfältig, bevor man 60 μ L jeder Probe ebenfalls doppelt auf die Platte auftrug. Nachdem jedes Well mit 40 μ L Quantification Reagent QR versehen worden war, wurde nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur mit Hilfe eines Mikrotiterplattenphotometers (Sunrise Absorbance Reader, TECAN, Austria; Megallan 2) die Extinktion bei einer Wellenlänge von 620 nm gemessen.

4.3 Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde das „Fluo Reporter® Blue Fluorometric dsDNA Quantitation Kit“ (F-2962)“ (Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe) unter Modifikation des Herstellerprotokolls verwendet. Um später die Konzentration in den Proben zu berechnen, wurde zunächst eine Eichkurve erstellt, indem Kalbthymus-DNA (Sigma-Aldrich, D8661) mit TE-Puffer in Konzentrationen von 0 bis 5.000 ng/100 μ L verdünnt wurde.

Die aliquotierten Zellysate von 4.1 wurden in einem Heizblock bei 800 rpm für eine Stunde auf 55 °C erhitzt, um die DNA besser in Lösung zu bringen. Schließlich wurden sowohl die Verdünnungen des DNA-Standards sowie die Proben mit einem Volumen von je 100 µL – wie oben in Duplikaten zur Doppelbestimmung – auf eine weiße 96 Well-Platte aufgetragen und in jedes Well zusätzlich 100 µL des Bestimmungsreagenz (50 µl Hoechst 33258 in 10 ml TNE-Puffer) pipettiert. Die Messung der Fluoreszenz des DNA-gebundenen Farbstoffes erfolgte mittels eines Fluorometers (Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer, Agilent Technologies) unter Einstellung des Exzitations- und Emissionsfilter auf 360 nm beziehungsweise 460 nm.

5. Molekularbiologische Methoden

5.1 RNA-Isolation aus Zellpellets

Um die drei Zelllinien aus molekularbiologischem Blickwinkel zu betrachten, wurden von jeder Linie wie unter 1.1 beschrieben Zellpellets verschiedener Passagen hergestellt und bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert.

Zur Isolierung der RNA wurden die Zellen in 350 µL TRIzol™ (Thermo Fisher Scientific) aufgeschlossen und in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Bei der anschließenden fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur denaturierten die Proteine und lösten sich im enthaltenen Phenol. Es folgte die Zugabe von 70 µL Chloroform pro Versuchsansatz, das sich weitgehend homogen mit dem Phenol vermischte. Nach einer 20-minütigen Zentrifugation der Proben bei 4 °C und 12.000 rpm zeigte sich im unteren Teil des Gefäßes eine rote Phenolphase, im oberen Teil dagegen ein wässriger, die RNA enthaltender Überstand, von dem etwa die Hälfte abgenommen und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß pipettiert wurde. Die dazwischen liegende Interphase aus relativ hydrophilen Proteinen galt es dabei auf keinen Fall mit zu überführen. Danach gab man zu jeder Probe 3 µL einer 1:10-Mischung aus Glykogen und nukleasefreiem Wasser und fügte zusätzlich bei Raumtemperatur eine Volumeneinheit 100%igen Isopropanols hinzu. Es erfolgte eine zehnminütige Inkubation bei Raumtemperatur, bevor die Ansätze zehn Minuten bei 4 °C und 12.000 rpm zentrifugiert wurden. Nach Abpipettieren des Überstandes wurden die entstandenen RNA-Pellets mit je 1 mL 75%igem Ethanol gewaschen und schließlich weitere fünf Minuten bei 4 °C und 7.500 rpm zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes ließ man den Rückstand in einem auf 65 °C erwärmten Heizblock circa vier Minuten trocknen und löste diesen dann je nach Größe des Pellets in 20

bis 50 µL nukleasefreiem Wasser, mit dem Ziel eine Konzentration von 1 µg/µL zu erreichen. Die Lösungen wurden zum Schluss weitere vier Minuten im Heizblock bei einer Geschwindigkeitsstufe von 500 rpm auf 65 °C erwärmt, wobei die Ansätze sowohl davor als danach kurz gründlich durchmischt wurden. Die extrahierte Gesamt-RNA wurde bis zu ihrer weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

5.2 RNA-Quantifizierung

Die Bestimmung der RNA-Konzentration in den einzelnen Proben erfolgte quantitativ mit Hilfe eines NanoDrop Spektrophotometers (ND 1000, PeqLab, Erlangen), indem bei einer Wellenlänge von 260 nm, was dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren entspricht, die Absorption der Lösungen gemessen wurde. Als Maß für die Reinheit der Ansätze dient dabei die Ratio aus der Absorption bei 260 und 280 nm. Werte zwischen 1,8 und 2,0 weisen dabei auf proteinfreie RNA hin.

5.3 Reverse Transkription der isolierten RNA (cDNA-Synthese)

Zwischen der Isolierung der RNA und der Analyse der Nukleinsäuren mittels Real Time Quantitativer Polymerasekettenreaktion steht als nächster Arbeitsschritt das Umschreiben der RNA in komplementäre DNA (cDNA) im Sinne einer reversen Transkription an.

Nach der photometrischen Bestimmung der RNA-Konzentrationen in den einzelnen Probenlösungen konnten daraus die benötigten Volumina berechnet werden, um je 2 µg RNA pro Versuchsansatz einzusetzen. Ziel war das selektive Umschreiben von mRNA, weshalb jeweils 1 µL Oligo-dT(Desoxythimidin)-Primer zum Einsatz kamen, die spezifisch an den 3'-Poly(A)-Schwanz eukaryontischer mRNA binden. Die einzelnen Mischungen aus RNA und Primer wurden schließlich mit nukleasefreiem Wasser bis zu einem Endvolumen von 10 µL aufgefüllt, zentrifugiert und für fünf Minuten bei 42 °C im Blockcycler erwärmt.

Zu jeder Probe pipettierte man im Anschluss 10 µL eines Mastermix, der sich aus folgenden Komponenten zusammensetzte:

Volumen in µL	Substanz
2	5x First Strand Buffer
2	dNTPs
1	M-MLV-Reverse Transkriptase
5	nukleasefreies Wasser

Nach kurzer Zentrifugation wurde die Synthesereaktion im Thermocycler bei einer Temperatur von 42 °C gestartet. Nach Ende der 60-minütigen Inkubationszeit erfolgte eine zweiminütige Erhitzung der Ansätze auf 90 °C, um die Reverse Transkriptase zu denaturieren und damit zu inaktivieren. Abschließend füllte man jedes Reaktionsgefäß mit 20 µL nukleasefreiem Wasser auf und bewahrte die verdünnte cDNA bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20 °C auf.

5.4 Real Time Quantitative Polymerasekettenreaktion (RTqPCR)

Bei der Real Time Quantitativen Polymerasekettenreaktion, kurz RTqPCR, wird im Gegensatz zu einer herkömmlichen PCR die Menge des entstehenden Genprodukts nicht erst nach Ablauf des Versuches analysiert, sondern kontinuierlich während des Replikationsprozesses, indem das Fluoreszenzsignal eines sich einlagernden Farbstoffes – hier SYBR® Green der Firma Roche – gemessen wird. Unterschiede in der Genexpression zwischen verschiedenen cDNA-Proben werden mit Hilfe des Cp-Wertes erfasst, der die Nummer des Zyklus angibt, an dem sich dieses Signal zum ersten Mal deutlich vom Hintergrundsignal unterscheidet. Je niedriger dieser Wert, desto stärker ist die entsprechende Expression des replizierten Gens in der eingesetzten cDNA-Probe.

Pro 1 µL zu quantifizierender Probe wurden 9 µL eines Mastermix aus nachfolgend aufgelisteten Bestandteilen in die Vertiefungen einer 96 Well-Lightcycler-Platte vorgelegt:

Volumen in µL	Substanz
3	nukleasefreies Wasser
0,5	sense Primer (1:10 verdünnt)
0,5	antisense Primer (1:10 verdünnt)
5	SYBR Green Master Mix

Als Negativkontrolle kam 1 µL nukleasefreies Wasser zum Einsatz. Für die spätere Berechnung der Konzentration wurde je 1 µL cDNA einer Wildtyp Niere in den Verdünnungen 1:1, 1:3, 1:6, 1:12 und 1:24 pipettiert. Die verwendeten Primerpaare sind im Anhang aufgeführt.

Anschließend wurde die Platte sorgfältig mit einer Folie abgeklebt, kurz abzentrifugiert und dann im LightCycler 480® nach folgendem Protokoll analysiert:

Phase	Temperatur [in °C]	Dauer
Aktivierung	95	5 min
Amplifikation (45 Zyklen)		

- Denaturierung	95	10 s
- Annealing	60	20 s
- Elongation	72	20 s
Melting	95	1 min
	60	1 min
	97	∞
Cooling	40	10 s

Bei dem TGFBR1-Primerpaar musste eine niedrigere Annealing-Temperatur von 52 °C gewählt werden, außerdem wurde hier als Standard ein Pool aus cDNA von MDCK-C7-Zellen verwendet, da die Expression von TGFBR1 bei der Wildtyp-Probe unzureichend war.

Um die Spezifität der Reaktion zu bestimmen, schloss sich an die Amplifikationsphase eine Schmelzkurvenanalyse an. Die Gesamtauswertung der Genexpression erfolgte mit Hilfe der LightCycler Software anhand der eingesetzten Standardkonzentrationen, bevor abschließend eine Normierung auf das „Housekeeping Gen“ RPL32 erfolgte, das dabei als endogenes Referenzsystem fungierte [24]. Letzteres ist notwendig, da bei der reversen Transkription von RNA in cDNA zwar pro Probe die gleiche Menge an RNA eingesetzt wird, die Effizienz der cDNA-Synthese in den einzelnen Reaktionsgefäßen theoretisch trotzdem leicht variieren kann. Um die Proben dennoch miteinander vergleichen zu können, wird als interne Kontrolle ein Housekeeper mitbestimmt.

5.5 DNA-Agarosegelelektrophorese

Um sicherzustellen, dass während der RTqPCR die erwünschten Produkte synthetisiert wurden, führte man nachfolgend eine DNA-Gelelektrophorese durch, bei der eine Auftrennung der DNA-Fragmente nach Ladung und Größe erfolgte. Die zu analysierenden Proben wurden dabei zunächst in den Lightcycler-Platten, die nach Abschluss der RTqPCR im Kühlschrank gelagert wurden, mit je 2 µL 6x DNA Gel Loading Dye vermischt. Je 10 µL dieser Mischungen wurden anschließend vorsichtig in die Geltaschen einer 1%igen Agarose-Gelplatte, die in der Elektrophoresekammer vollständig von 1x TAE-Puffer (TRIS-Essigsäure-Puffer) bedeckt war, pipettiert. Zur späteren Quantifizierung liefen jeweils 10 µL eines 50 bp Standard-DNA-Markers neben den vier Proben jedes Gens. Bei einer Spannung von 130 Volt, einer Stromstärke von 590 mA und 130 Watt ließ man die Front der PCR-Produkte 30 Minuten wandern, bevor man die Gelplatte zu Dokumentationszwecken in der UV-Transillumination ablichtete (Fotografie der Gelplatte im Anhang).

III. Ergebnisse

1. Stimulationsversuche unter statistischen Bedingungen

Um die unterschiedlich behandelten Zellen hinsichtlich einer möglichen Hypertrophie zu untersuchen, wurde als messbare Größe der Quotient aus Protein- und DNA-Konzentration verwendet, der im Nachfolgenden als Protein-DNA-Ratio bezeichnet wird. Hintergrund dieses Modells ist die Annahme, dass die Protein-Konzentration die Menge an Zytoplasma sowie Membranproteinen und damit näherungsweise die Zellgröße widerspiegelt. Die Protein-Konzentration wiederum wird in Relation zur DNA-Konzentration, dem Maß für die Zellzahl, gesetzt. Bei einer möglichen Hypertrophie nimmt die Zellgröße und damit die Protein-Konzentration zu, während die Zellzahl und damit auch die DNA-Konzentration annähernd gleichbleibt, was sich in einem Anstieg der Protein-DNA-Ratio zeigt.

Als Lösungsmittel für die Stimulationssubstanz Empagliflozin wurde Dimethylsulfoxid verwendet. Um den Einfluss dieses Mittels von der Medikamentenwirkung zu differenzieren, stimulierte man die Zellen analog mit dem gleichen Volumen an reinem Dimethylsulfoxid. Deshalb wurden im Folgenden die Gruppen EMPA (Empagliflozin) und DMSO (Dimethylsulfoxid) miteinander verglichen.

TGF β (Transforming Growth Factor β), das als Positivkontrolle für die Hypertrophie eingesetzt wurde, konnte direkt dem Medium zugegeben werden. Als gegenüberzustellende Negativkontrolle, die in den abgebildeten Graphen als „Kontrolle“ benannt ist, wurde Kulturbeziehungsweise Hungermedium ohne Zusatz von FCS verwendet.

Die Berechnung der Protein-DNA-Ratio erfolgte aus den ermittelten Protein- und DNA-Konzentrationen mit Hilfe von Microsoft Excel. Die Graphen wurden mit der Software GraphPad Prism® (Version 5.00) erstellt. Da es zwischen den Passagen der einzelnen Zelllinien zu stärkeren Streuungen kam, wurden zur besseren Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Versuchsdurchgängen die Gruppen EMPA und TGF β auf ihre Kontrolle DMSO beziehungsweise Medium ohne Zusatz hin normiert und damit in Relation zu dieser gesetzt. Diese Werte werden im Folgenden als Relativwerte (Abbildungen „b“) bezeichnet, mit den Absolutwerten (Abbildungen „a“) sind die Ursprungswerte der Messung ohne Normierung zur Vergleichsgruppe gemeint.

1.1 MDCK-C7-Zelllinie

Bei den distalen Tubuluszellen caninen Ursprungs führte Empagliflozin zu keiner relevanten Änderung der Protein-DNA-Ratio im Vergleich mit DMSO. Sowohl die Absolut- als auch die Relativwerte lagen in beiden Gruppen auf fast annähernd gleichem Niveau. Ebenso zeigte sich weder bei der Protein- noch bei der DNA-Konzentration ein signifikanter Unterschied zwischen den Zellen unter Empagliflozin- und denjenigen unter DMSO-Behandlung (siehe Abbildungen 3.1a und 3.1b).

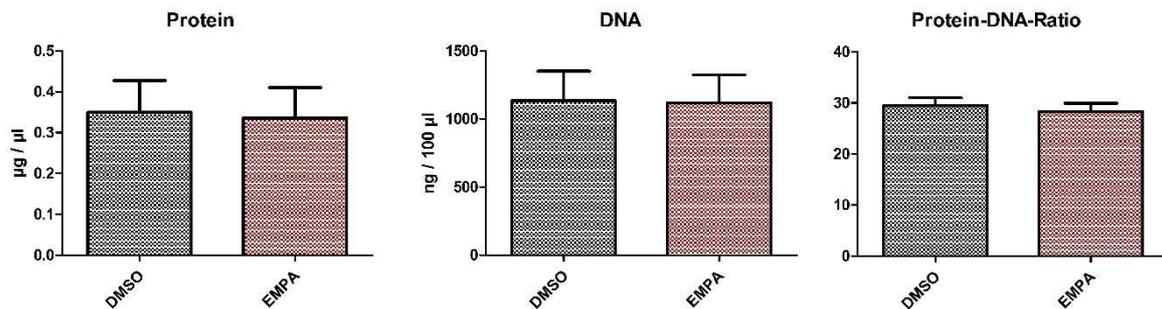


Abbildung 3.1a Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein-DNA-Ratio bei MDCK-C7-Zellen nach Stimulation mit Dimethylsulfoxid (DMSO) und Empagliflozin (EMPA) - Absolutwerte

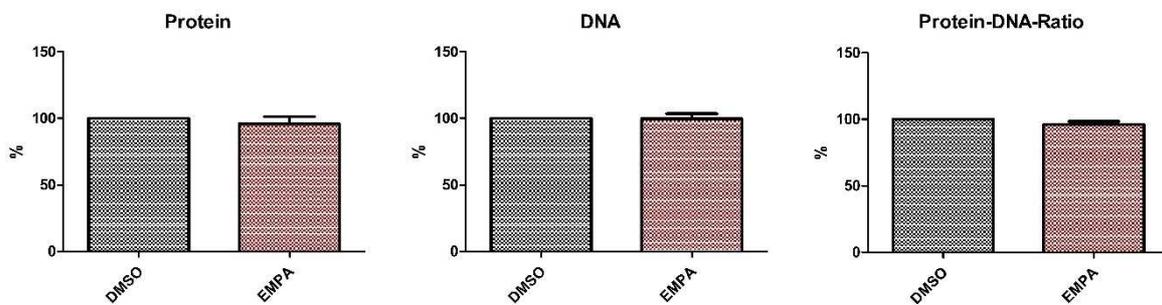


Abbildung 3.1b Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein-DNA-Ratio bei MDCK-C7-Zellen nach Stimulation mit Dimethylsulfoxid (DMSO) und Empagliflozin (EMPA) - Relativwerte

Das als Positivkontrolle eingesetzte TGF β führte zu einer bereits unter dem Lichtmikroskop sichtbaren Veränderung der Zellform im Sinne einer optischen Zunahme der Zellgröße und diskreten Zellformveränderung (siehe Abbildungen 3.2 und 3.3).

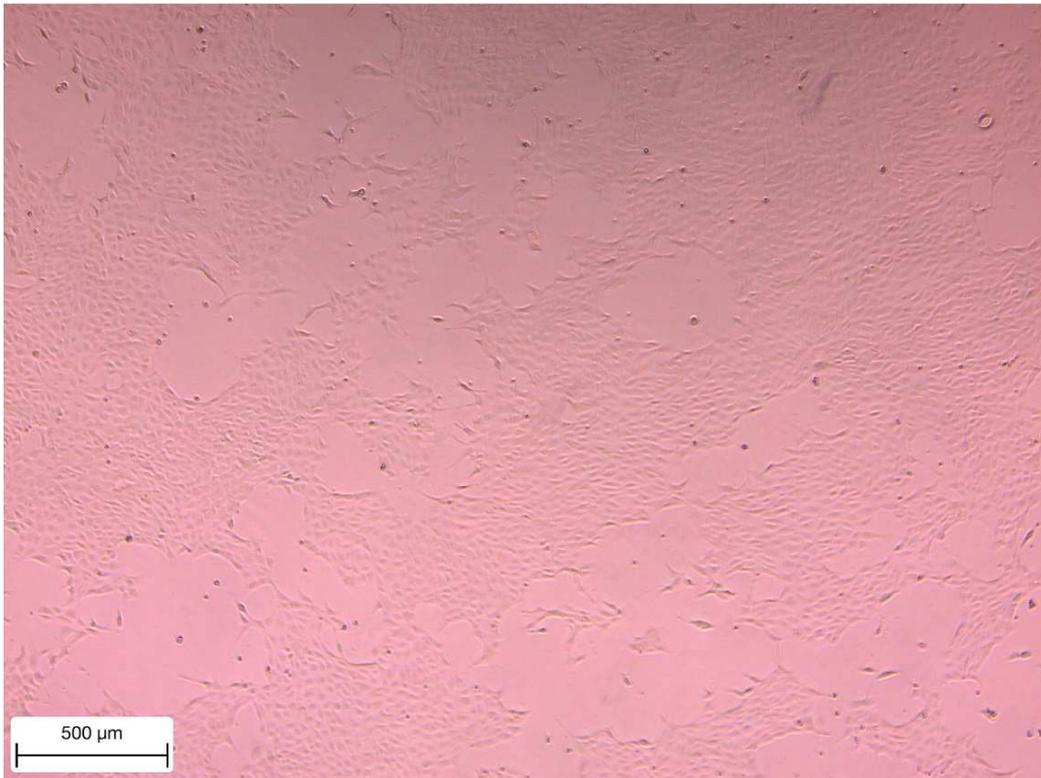


Abbildung 3.2: MDCK-C7-Zellpopulation vor Stimulation mit TGF β (eigene Aufnahme)

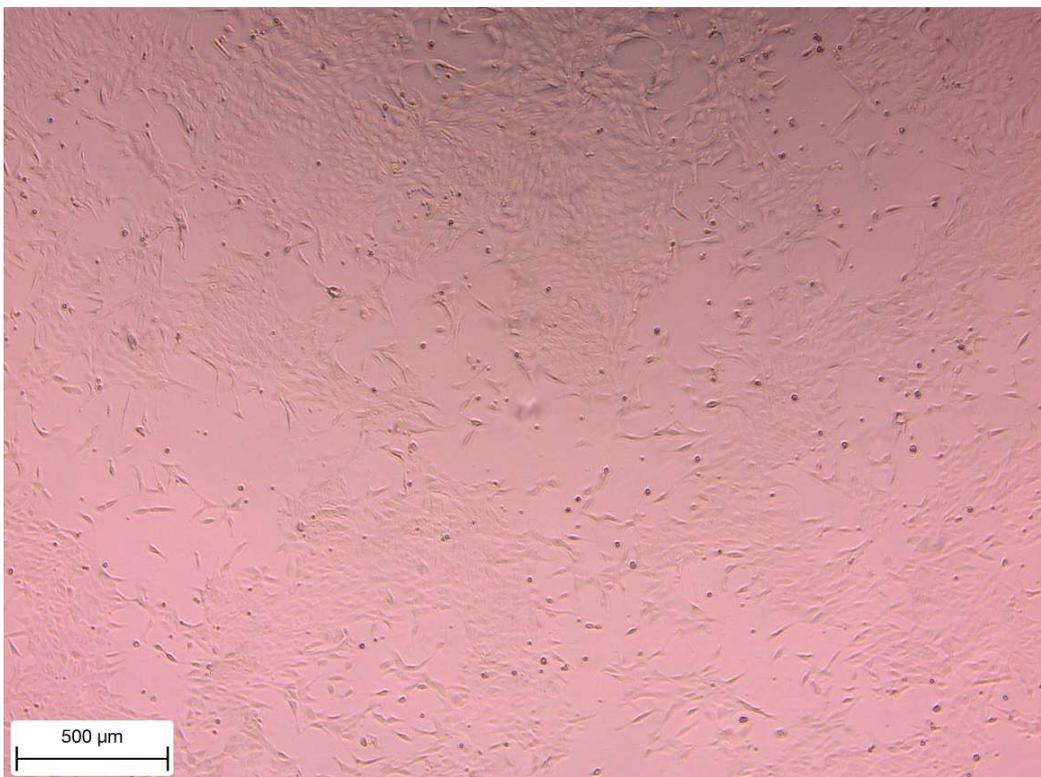


Abbildung 3.3: MDCK-C7-Zellpopulation nach Stimulation mit TGF β – Sichtbare Veränderung der Zellform (eigene Aufnahme)

Die ebenfalls gemessene Erhöhung des Quotienten aus Protein/DNA unter TGF β -Behandlung im Sinne einer Hypertrophie war aber in Relation zur Negativkontrolle mit Hungermedium statistisch knapp nicht signifikant ($p=0,06$). Bei den Absolutwerten der Vergleichsgruppe Hungermedium/TGF β war der gemessene Unterschied etwas deutlicher, aber ebenfalls statistisch knapp nicht signifikant ($p=0,051$) (siehe Abbildungen 3.4a und 3.4b).

Statisch signifikante Unterschiede präsentierten sich allerdings in den der Berechnung der Protein-DNA-Ratio zugrundeliegenden Messungen der Protein- und DNA-Konzentration. In Relation zu den MDCK-C7-Zellen unter Hungermedium nahm sowohl die Protein- als auch die DNA-Konzentration unter Behandlung mit TGF β signifikant ab ($p=0,01$ bzw. $p=0,005$). Ohne Normierung zeigte sich in den Absolutwerten zwischen Hungermedium und TGF β jedoch kein Unterschied (siehe Abbildungen 3.4a und 3.4b).

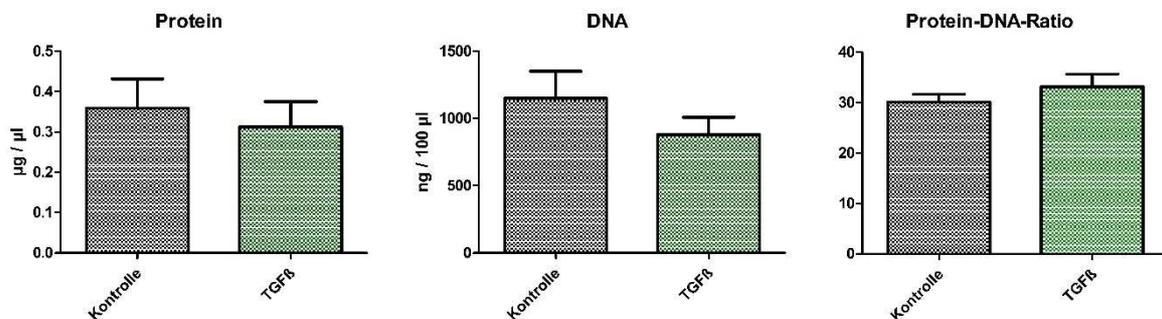


Abbildung 3.4a Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein-DNA-Ratio bei MDCK-C7-Zellen nach Stimulation mit Hungermedium und TGF β - Absolutwerte

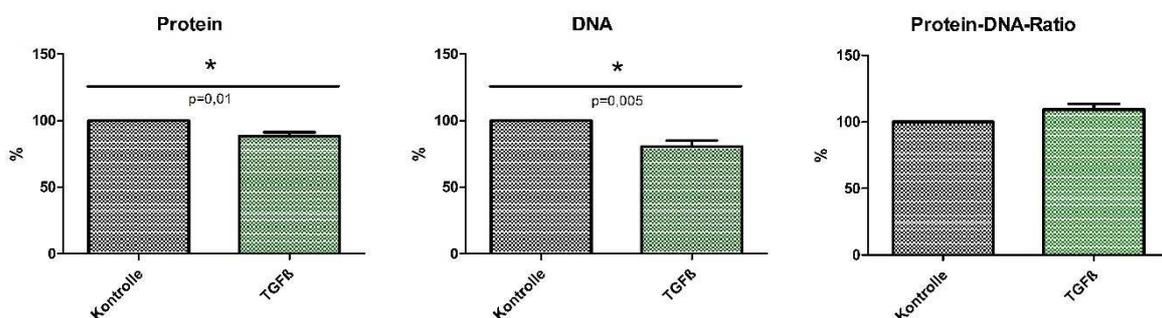


Abbildung 3.4b Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein-DNA-Ratio bei MDCK-C7-Zellen nach Stimulation mit Hungermedium und TGF β - Relativwerte

1.2 LLC-PK1-Zelllinie

Proximale Tubuluszellen porcinen Ursprungs zeigten unter Empagliflozin-Behandlung eine Tendenz zur Hypotrophie, welche allerdings gegenüber der DMSO-Gruppe statistisch nicht signifikant war (Absolutwerte: $p=0,19$, Relativwerte: $p=0,13$). Sowohl bei den Absolut- als auch Relativwerten zeigte sich unter Einfluss von Empagliflozin eine Abnahme der Protein- und DNA-Konzentration, jedoch nicht in einer statistisch signifikanten Größenordnung (siehe Abbildungen 3.5a und 3.5b).

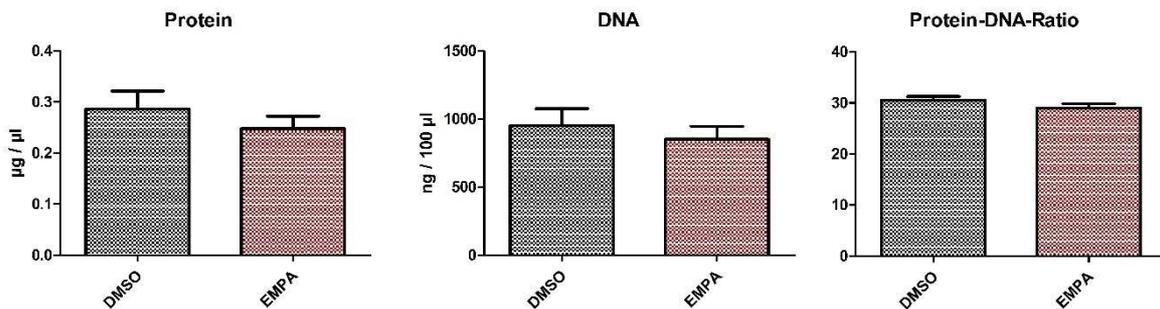


Abbildung 3.5a Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein-DNA-Ratio bei LLC-PK1-Zellen nach Stimulation mit Dimethylsulfoxid (DMSO) und Empagliflozin (EMPA) - Absolutwerte

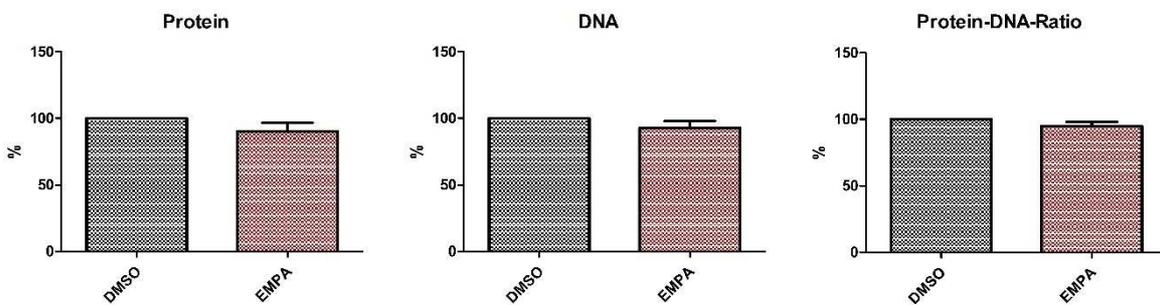


Abbildung 3.5b Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein-DNA-Ratio bei LLC-PK1-Zellen nach Stimulation mit Dimethylsulfoxid (DMSO) und Empagliflozin (EMPA) - Relativwerte

Da die LLC-PK1-Zellen bei einem Wechsel auf Hungermedium mit Ablösung reagierten, diente hier Kulturmedium als Negativkontrolle gegenüber der TGF β -Positivkontrolle. Letzteres bewirkte auch in doppelt so hoch eingesetzten Dosen von 1 nM keine signifikante Hypertrophie (Absolutwerte: $p=0,42$, Relativwerte: $p=0,28$) (siehe Abbildungen 3.6a und 3.6b).

Unter Behandlung mit TGF β war lediglich eine in Relation zu den LLC-PK1-Zellen unter Kulturmedium statistisch signifikante Abnahme der DNA-Konzentration zu messen ($p=0,01$). Die in diesem Zusammenhang ermittelten Proteinkonzentrationen in dieser Vergleichsgruppe differierten allerdings nicht ausreichend voneinander ($p=0,10$). Bei den Absolutwerten der Gruppe Kulturmedium/TGF β zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (siehe Abbildungen 3.6a und 3.6b).

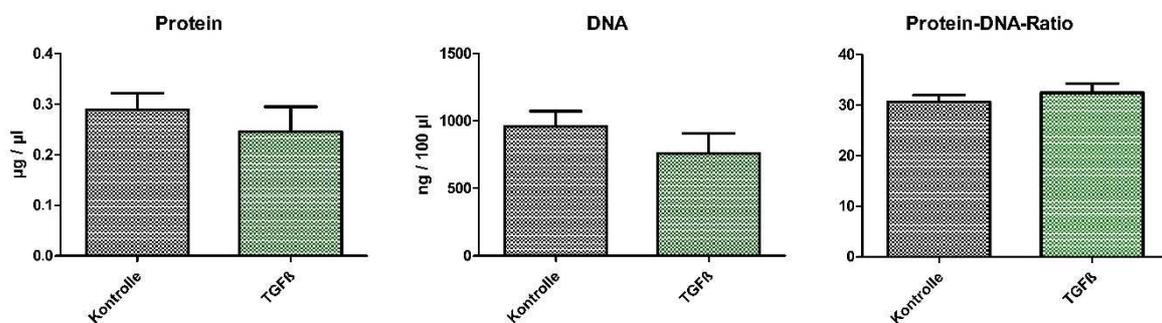


Abbildung 3.6a Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein-DNA-Ratio bei LLC-PK1-Zellen nach Stimulation mit Kulturmedium und TGF β - Absolutwerte

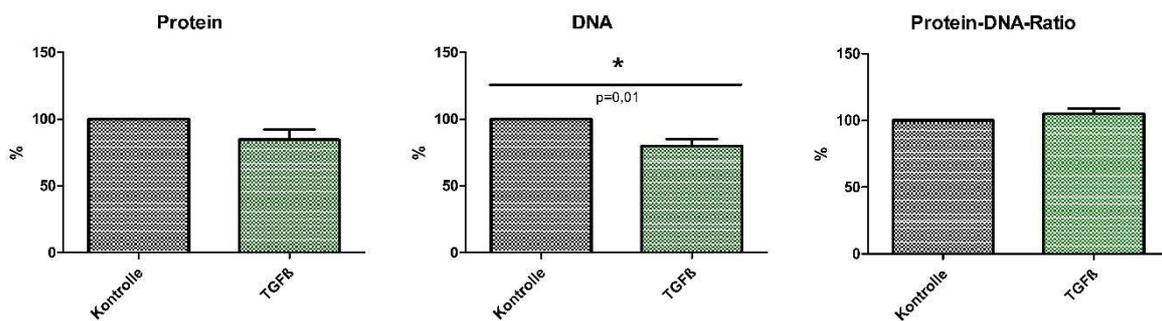


Abbildung 3.6b Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein-DNA-Ratio bei LLC-PK1-Zellen nach Stimulation mit Kulturmedium und TGF β - Relativwerte

1.3 M-1-Zelllinie

In den vorausgegangenen Tierexperimenten der Arbeitsgruppe Schweda konnte die zu beobachtende renale Hypertrophie unter Empagliflozin-Behandlung auf eine mikroskopisch messbare Zunahme des Zellvolumens im Sammelrohr zurückgeführt werden. Im Zellkultorexperiment mit Sammelrohrzellen murinen Ursprungs konnte kein direkter Effekt auf das Zellvolumen gezeigt werden.

Die M-1-Zellen präsentierten sich unter dem Mikroskop in ihrer Zellgröße optisch deutlich kleiner als die vorangegangenen beiden Zelllinien. So wirkte vor allem der Zellkern im Vergleich zum Zytoplasma besonders prominent. Um möglichst ähnlich hohe Proteinkonzentrationen wie bei den MDCK-C7- und LLC-PK1-Zellen zu messen, wurden aufgrund der geringeren Zellgröße und der daraus resultierenden geringeren Proteinmenge pro Einzelzelle mehr Zellen eingesetzt. Demzufolge wurden Protein- und DNA-Konzentration sowohl bei 75.000 Zellen pro Well (24 Well-Platte) als auch bei 150.000 Zellen pro Well (12 Well-Platte) bestimmt. Die Berechnung der Protein-DNA-Ratio ergab bei beiden Zellzahlen Werte in ähnlicher Größenordnung, sodass ein entsprechender Vergleich bezüglich statistischer Signifikanz möglich war. Protein- und DNA-Konzentration bei den unterschiedlichen Zellzahlen müssen allerdings gesondert betrachtet werden.

Letztendlich ließ sich zusammenfassend zwischen der EMPA- und DMSO-Gruppe kein signifikanter Unterschied in der gemessenen Protein-DNA-Ratio feststellen. Absolut- sowie Relativwerte lagen auf einem annähernd gleichen Niveau (siehe Abbildungen 3.7a, 3.7b, 3.8a und 3.8b).

Bei einer Zellzahl von 75.000 Zellen pro Well waren sowohl Absolut- als auch Relativwerte der Protein- und DNA-Konzentrationen der Gruppe DMSO/EMPA ähnlich hoch (siehe Abbildungen 3.7a und 3.7b).

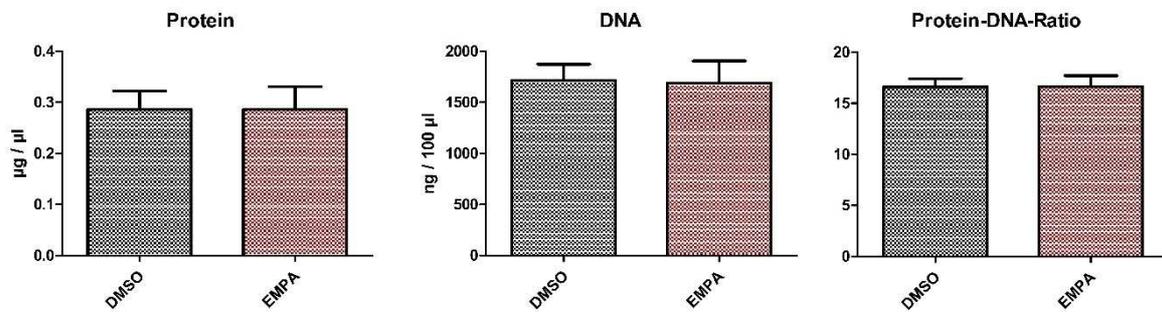


Abbildung 3.7a Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein-DNA-Ratio bei M-1-Zellen nach Stimulation mit Dimethylsulfoxid (DMSO) und Empagliflozin (EMPA) - Absolutwerte; 75.000 Zellen pro Well

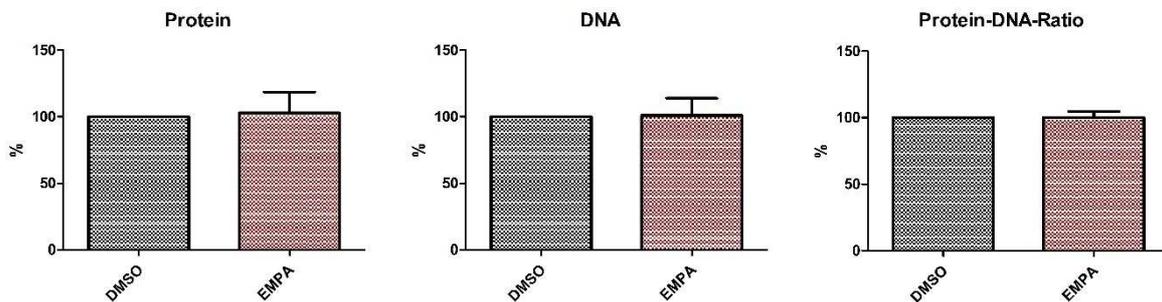


Abbildung 3.7b Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein-DNA-Ratio bei M-1-Zellen nach Stimulation mit Dimethylsulfoxid (DMSO) und Empagliflozin (EMPA) - Relativwerte; 75.000 Zellen pro Well

Bei einer Zellzahl von 150.000 Zellen pro Well waren die Unterschiede zwischen den Zellen unter Empagliflozin- beziehungsweise DMSO-Behandlung ebenfalls gering ausgeprägt, jedoch zeigte sich vor allem bei Betrachtung der Relativwerte zumindest eine gewisse Abnahme der Protein- und DNA-Konzentration auf statistisch nicht signifikantem Niveau (Protein-Konzentration: Absolutwerte: $p=0,67$, Relativwerte: $p=0,33$; DNA-Konzentration: Absolutwerte: $p=0,70$, Relativwerte: $p=0,24$) (siehe Abbildungen 3.8a und 3.8b).

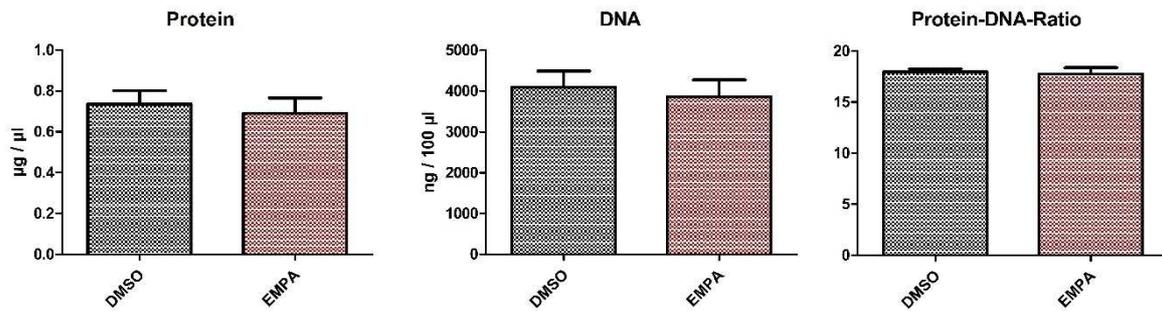


Abbildung 3.8a Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein-DNA-Ratio bei M-1-Zellen nach Stimulation mit Dimethylsulfoxid (DMSO) und Empagliflozin (EMPA) - Absolutwerte; 150.000 Zellen pro Well

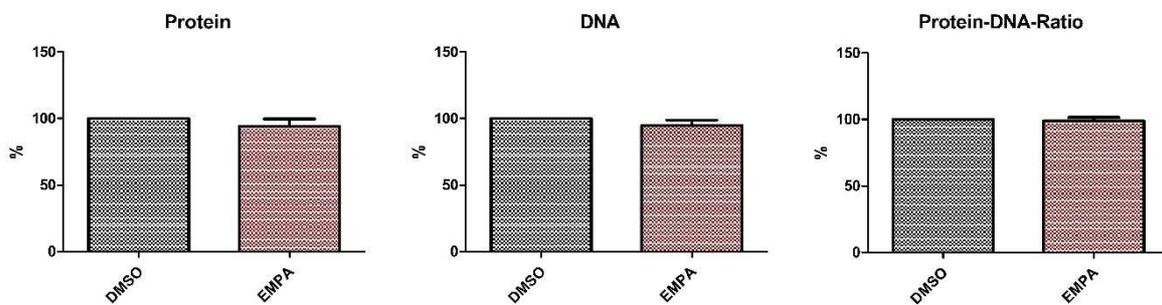


Abbildung 3.8b Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein-DNA-Ratio bei M-1-Zellen nach Stimulation mit Dimethylsulfoxid (DMSO) und Empagliflozin (EMPA) - Relativwerte; 150.000 Zellen pro Well

TGFβ konnte auch hier weder in der üblichen Dosis von 500 pM noch in der doppelt so hohen Konzentration von 1 nM eine signifikante Hypertrophie induzieren. Absolut- und Relativwerte der Protein-DNA-Ratio der Vergleichsgruppe Hungermedium/TGFβ differierten kaum (siehe Abbildungen 3.9a, 3.9b, 3.10a und 3.10b).

Bei einer Zellzahl von 75.000 Zellen pro Well konnte eine Abnahme der Proteinkonzentration beobachtet werden, welche jedoch statistisch nicht signifikant war ($p=0,08$ bzw. $p=0,08$). Ebenso nahm die DNA-Konzentration unter Behandlung mit TGFβ im Vergleich zu Kontrollzellen ab. Bei den Absolutwerten fiel der Unterschied zwischen beiden Gruppen geringer aus ($p=0,16$) als bei Betrachtung der Relativwerte, wo der Effekt von TGFβ knapp nicht signifikant war ($p=0,06$) (siehe Abbildungen 3.9a und 3.9b).

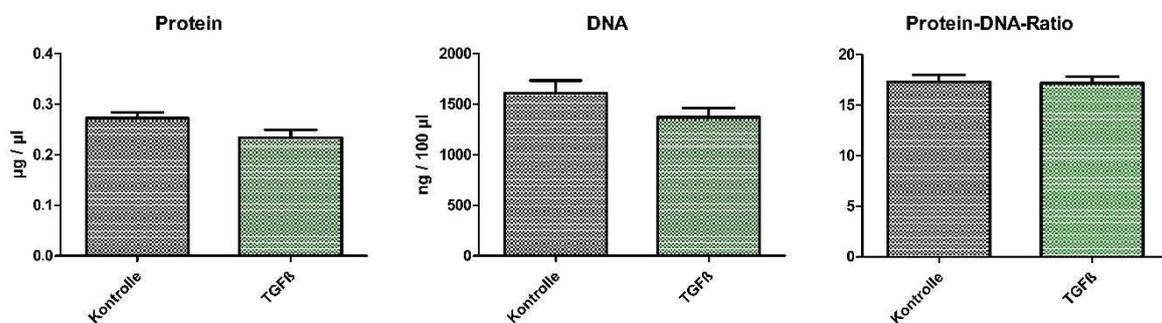


Abbildung 3.9a Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein-DNA-Ratio bei M-1-Zellen nach Stimulation mit Hungermedium und TGFβ - Absolutwerte; 75.000 Zellen pro Well

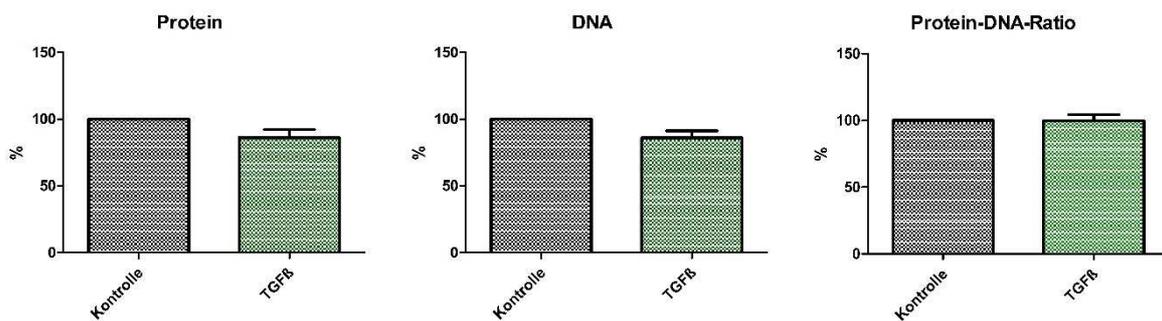


Abbildung 3.9b Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein-DNA-Ratio bei M-1-Zellen nach Stimulation mit Hungermedium und TGFβ - Relativwerte; 75.000 Zellen pro Well

Allerdings zeigten sich bei einer Zellzahl von 150.000 Zellen pro Well bei den Protein- und DNA-Konzentrationen im Hinblick auf die Relativwerte eindeutige Unterschiede zwischen Hungermedium und TGF β . Unter Behandlung mit TGF β nahm sowohl die Protein- als auch die DNA-Konzentration im Vergleich zu Kontrollzellen statistisch signifikant ab ($p=0,01$ bzw. $p=0,01$). Ohne entsprechende Normierung war bei den Absolutwerten der Unterschied zwischen Hungermedium und TGF β geringer ausgeprägt und infolgedessen statistisch nicht signifikant ($p=0,08$ bzw. $p=0,16$) (siehe Abbildungen 3.10a und 3.10b).

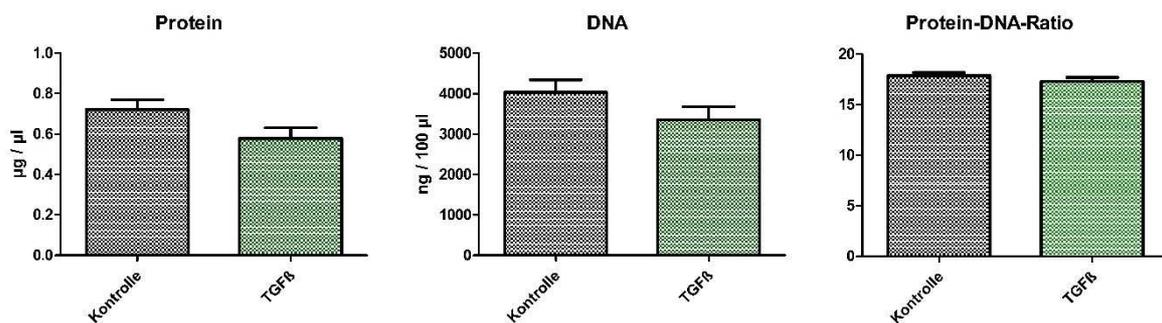


Abbildung 3.10a Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein-DNA-Ratio bei M-1-Zellen nach Stimulation mit Hungermedium und TGF β - Absolutwerte; 150.000 Zellen pro Well

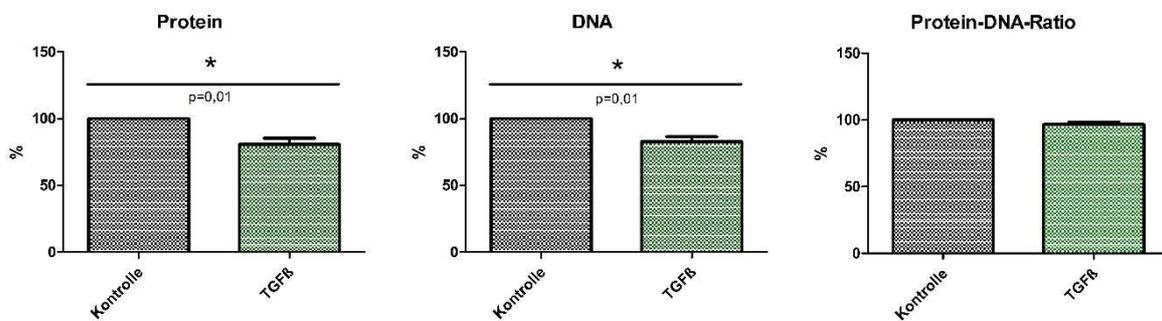


Abbildung 3.10b Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein-DNA-Ratio bei M-1-Zellen nach Stimulation mit Hungermedium und TGF β - Relativwerte; 150.000 Zellen pro Well

2. Superfusionsversuche mit LLC-PK1-Zellen

Um das vorliegende Modell zu verbessern und die in vitro-Bedingungen an die Gegebenheiten in vivo anzunähern, wurden die Stimulationsversuche unter Superfusion wiederholt. In vorherigen Experimenten der Arbeitsgruppe Schweda konnte mittels eines in vitro-Flusssystems bei LLC-PK1-Zellen eine signifikante Hypertrophie induziert werden [86]. Vor dem eigentlichen Versuch mit zusätzlicher Stimulation durch Empagliflozin wurde dieser Versuch unter möglichst gleichen Bedingungen reproduziert. Anders als in der Arbeit von Andrea Schreiber beschrieben [86] konnte lediglich unter einer Flussgeschwindigkeit von 1 mm/s eine signifikante Hypertrophie der Zellen induziert werden, weshalb die Superfusionsversuche nur mit dieser Flussgeschwindigkeit durchgeführt wurden. Eine Positivkontrolle mittels TGF β war bei diesem Versuchsaufbau nicht nötig, da allein durch die Superfusion eine Hypertrophie induziert wird und eine zusätzliche Stimulation durch TGF β nicht notwendig ist. Zusätzlich erfolgte auf derselben Well-Platte eine gleichzeitige Stimulation mittels Empagliflozin beziehungsweise Dimethylsulfoxid unter statischen Bedingungen.

Nachfolgend ergeben sich somit vier Vergleichsgruppen: LLC-PK1-Zellen, die superfundiert wurden und gleichzeitig mit Empagliflozin (EMPA_Flow) beziehungsweise Dimethylsulfoxid (DMSO_Flow) stimuliert wurden einerseits sowie andererseits LLC-PK1-Zellen, die ohne zusätzlichen Fluss unter Zusatz von Empagliflozin (EMPA_Kontrolle) beziehungsweise Dimethylsulfoxid (DMSO_Kontrolle) inkubiert wurden.

Zusammenfassend konnte bei Betrachtung der Protein-DNA-Ratio kein signifikanter Unterschied zwischen den vier oben genannten Vergleichsgruppen beobachtet werden. Auch die der Berechnung zugrundeliegenden Protein- sowie DNA-Konzentrationen zeigten sich auf ähnlichem Niveau ohne signifikante Unterschiede. Allerdings nahm bei LLC-PK1-Zellen, die mit Dimethylsulfoxid stimuliert und zusätzlich superfundiert wurden, die DNA-Konzentration signifikant ($p=0,03$) zu denjenigen Zellen, die lediglich unter statischen Bedingungen mit Dimethylsulfoxid stimuliert wurden, ab (siehe Abbildung 3.11).

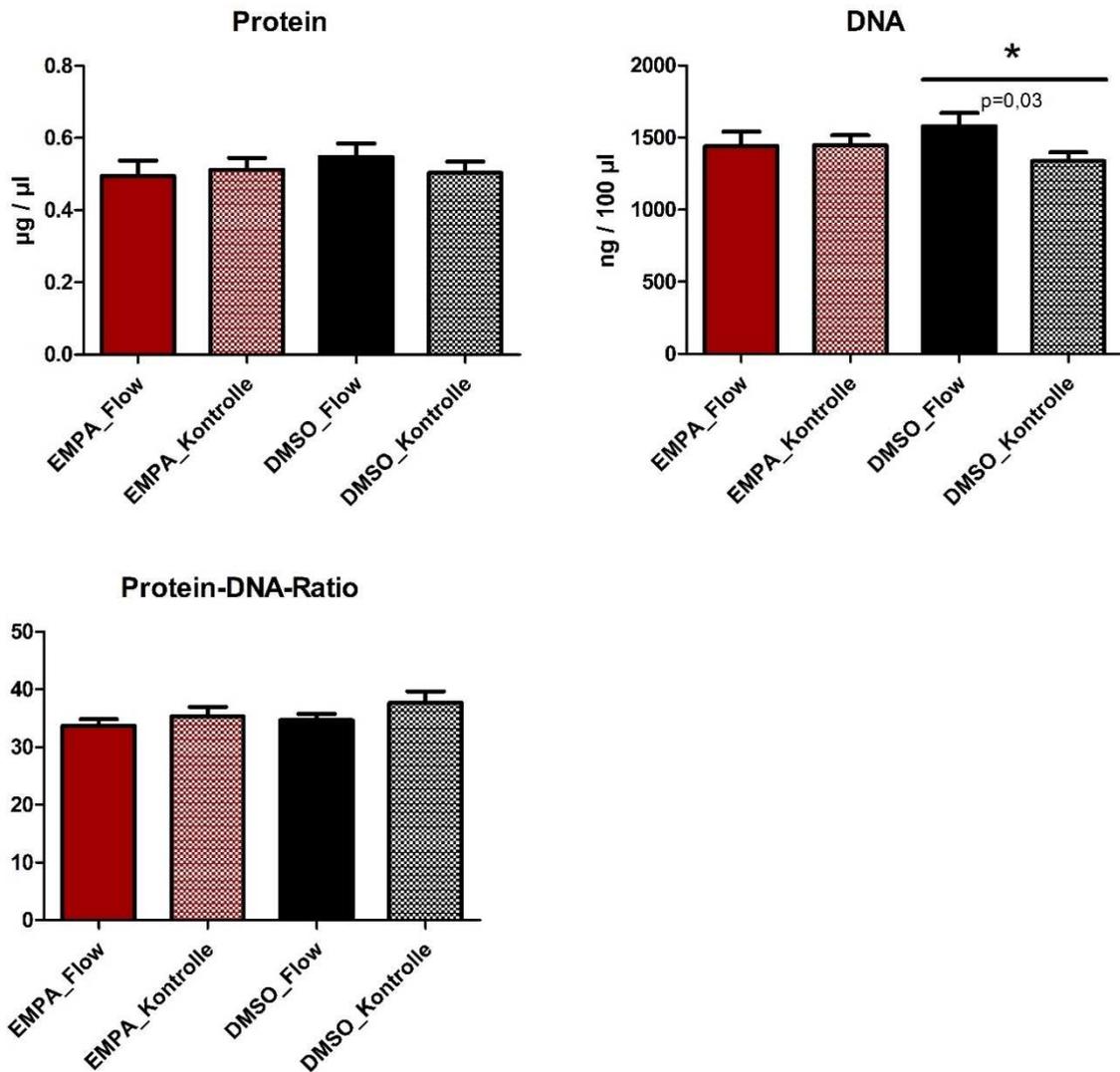


Abbildung 3.11: Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein-DNA-Ratio bei LLC-PK1-Zellen nach Stimulation mit Empagliflozin (EMPA) beziehungsweise (DMSO) sowie mit (Flow) beziehungsweise ohne (Kontrolle) Superfusion (1 mm/s)

Um die vier Versuchsgruppen besser vergleichen zu können, wurden sie auf zwei verschiedene Arten in Relation zueinander gesetzt, wobei jeweils Vergleichspaare gebildet wurden.

So wurden einerseits (siehe Abbildung 3.12) LLC-PK1-Zellen, die unter Einfluss von Empagliflozin standen, mit denjenigen unter Einfluss von Dimethylsulfoxid verglichen. Bei superfundierten Zellen zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Stimulationsmedia. Bei statisch inkubierten Zellen konnte unter Empagliflozin – im Vergleich zu Zellen, die nur

Dimethylsulfoxid erhalten hatten – eine statistisch knapp nicht signifikante ($p=0,06$) Hypotrophie beobachtet werden. Dieser Effekt konnte in ähnlicher Weise bereits bei den oben unter 1.2 aufgeführten Versuchen aufgezeigt werden, wobei dort lediglich eine Tendenz zur Hypotrophie zu beobachten war. Ebenso zeigte sich hier eine statistisch knapp nicht signifikante Zunahme der DNA-Konzentration unter Empagliflozin-Behandlung im Vergleich zur Behandlung mit Dimethylsulfoxid ($p=0,06$).

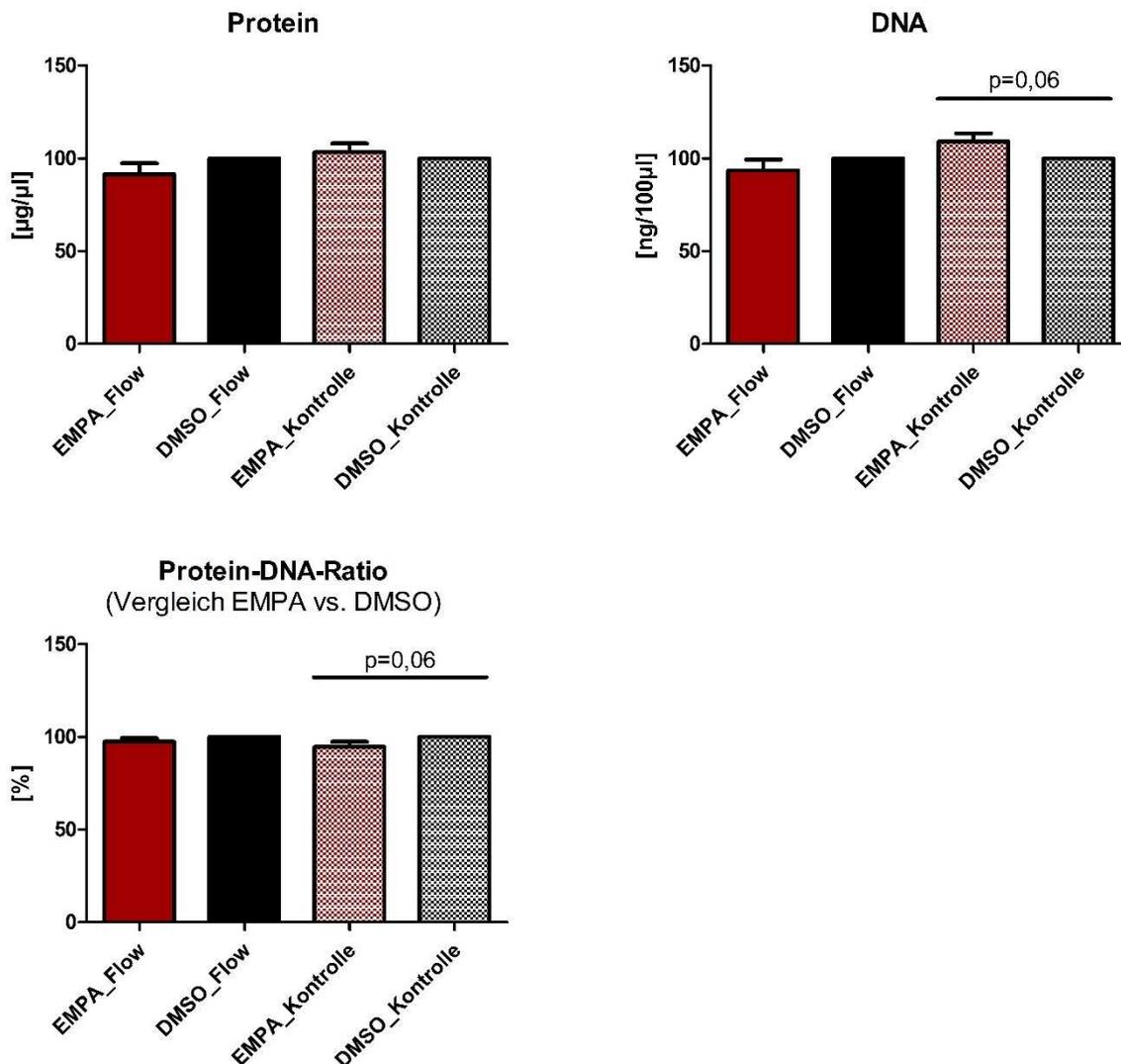


Abbildung 3.12: Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein-DNA-Ratio bei LLC-PK1-Zellen nach Stimulation mit Empagliflozin (EMPA) beziehungsweise (DMSO) sowie mit (Flow) beziehungsweise ohne (Kontrolle) Superfusion (1 mm/s) - Normierung EMPA_Flow auf DMSO_Flow sowie EMPA_Kontrolle auf DMSO_Kontrolle

Andererseits (siehe Abbildung 3.13) erfolgte ein Vergleich der stimulierten Zellen hinsichtlich statischer Inkubation und Inkubation unter Superfusion. Bei den Zellen, deren Medium zusätzlich Empagliflozin enthielt, zeigte sich kein Unterschied zwischen Inkubation mit oder ohne Fluss. Ebenso konnte auch bei Zellen, die mit Dimethylsulfoxid behandelt wurden, kein Unterschied zwischen statischen und Fluss-Bedingungen detektiert werden. Lediglich die DNA-Konzentration nahm unter Superfusion und gleichzeitiger Dimethylsulfoxid-Behandlung im Vergleich zu Kontrollzellen auf statistisch signifikantem Niveau zu ($p=0,02$).

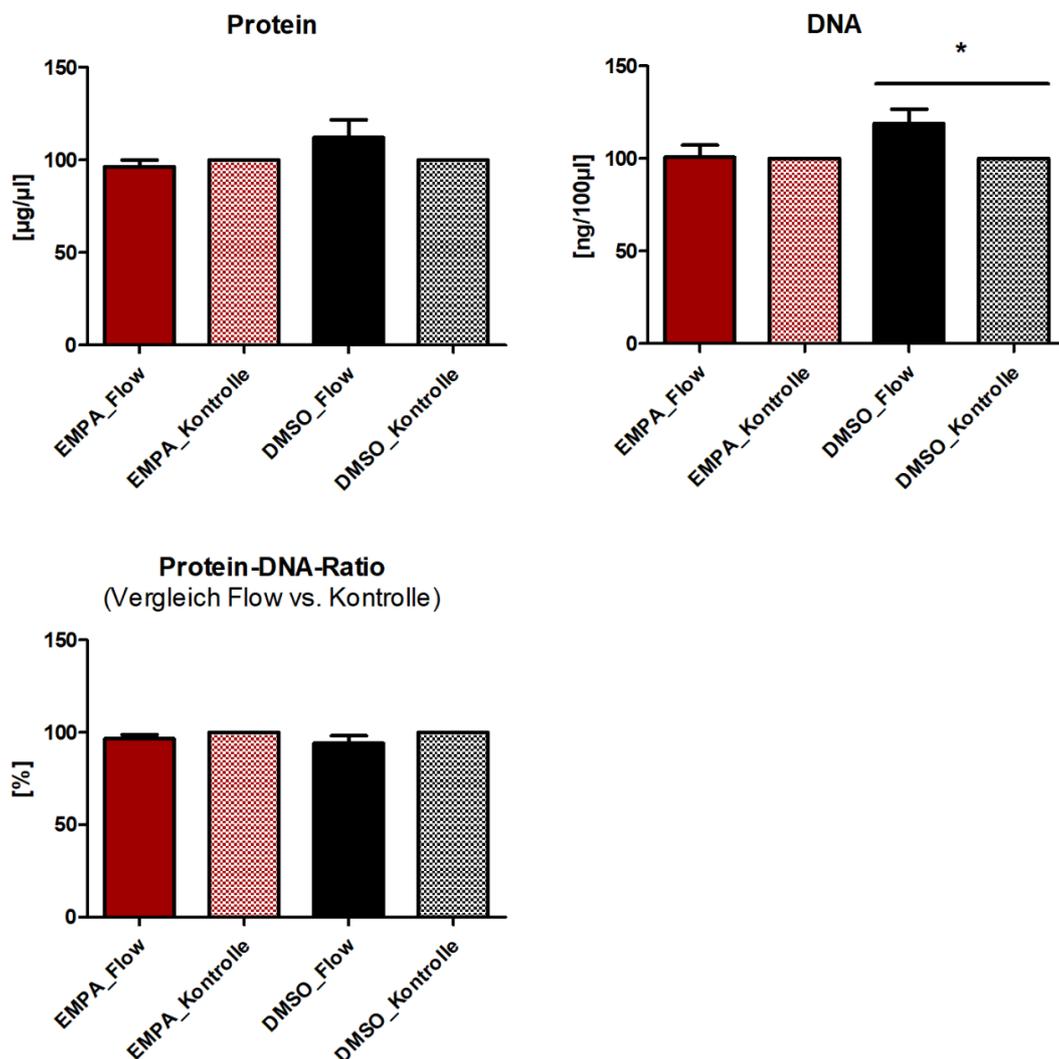


Abbildung 3.13: Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein-DNA-Ratio bei LLC-PK1-Zellen nach Stimulation mit Empagliflozin (EMPA) beziehungsweise (DMSO) sowie mit (Flow) beziehungsweise ohne (Kontrolle) Superfusion (1 mm/s) - Normierung EMPA_Flow auf EMPA_Kontrolle sowie DMSO_Flow auf DMSO_Kontrolle

3. Real Time Quantitative PCR

Da man in den oben beschriebenen Experimenten insgesamt nur sehr geringe Effekte von Empagliflozin und TGF β auf die Protein-DNA-Ratio beobachten konnte, sollte geklärt werden, inwieweit die einzelnen Zelllinien die Zielgene der einzelnen Substanzen exprimieren. Mittels Real Time Quantitativer PCR wurde deshalb die Expression der Gene RPL32, SGLT2, SGLT1, TGFBR1 sowie TGFBR2 in den drei verschiedenen Zelllinien MDCK-C7, LLC-PK1 und M-1 untersucht. Zusätzlich erfolgte eine Normierung der gemessenen Werte bezüglich der Expression des „Housekeeping Gens“ RPL32, das dabei als endogenes Referenzsystem fungierte [24].

RPL32 wurde am stärksten in der MDCK-C7-Zelllinie exprimiert, gefolgt von der M-1- und LLC-PK1-Zelllinie (siehe Abbildung 3.14). Sämtliche in den folgenden Diagrammen visualisierten Unterschiede in der Expression der einzelnen Gene sind auf diese RPL32-Werte normiert.

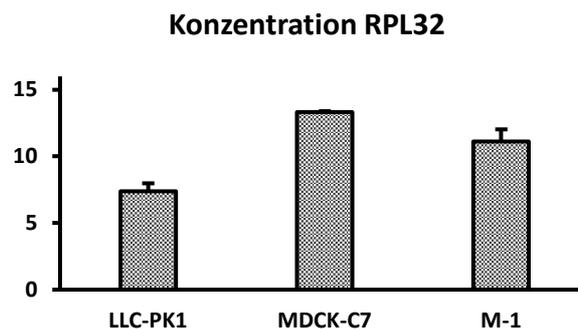


Abbildung 3.14: Expression des „Housekeeping Gens“ RPL 32 in den drei verwendeten Zelllinien

3.1 SGLT2- und SGLT1-Gen

Primärer Wirkort von Empagliflozin ist der SGLT2, weshalb die Expression des entsprechenden Gens von besonderem Interesse war. Hierbei zeigte sich, dass vor allem die LLC-PK1-Zelllinie, die den proximalen Tubulus repräsentiert, das SGLT2-Gen am stärksten exprimiert. Bei den MDCK-C7- und M-1-Zellen wurde SGLT2 jedoch kaum exprimiert (siehe Abbildung 3.15).

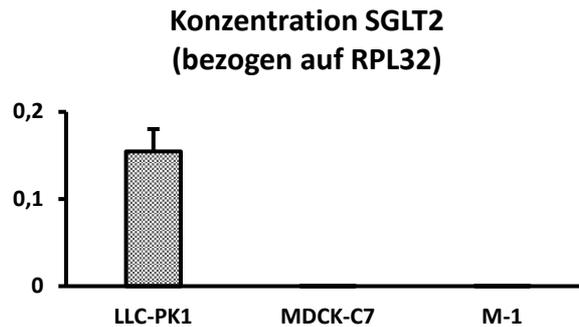


Abbildung 3.15: Expression des SGLT2-Gens (Normierung auf das „Housekeeping Gen“ RPL32) in den drei verwendeten Zelllinien

Da Empagliflozin unspezifisch auch am SGLT1-Rezeptor wirkt, wurde ebenfalls die Expression des SGLT1-Gens untersucht. Auch hier zeigte sich, dass vor allem LLC-PK1-Zellen diesen Transporter exprimieren, sogar rund dreifach stärker als das SGLT2-Gen. In geringem Ausmaß erfolgt eine entsprechende Expression von SGLT1 auch in MDCK-7-Zellen. M-1-Zellen hingegen exprimieren das SGLT1-Gen in vernachlässigbar kleiner Größenordnung (siehe Abbildung 3.16).

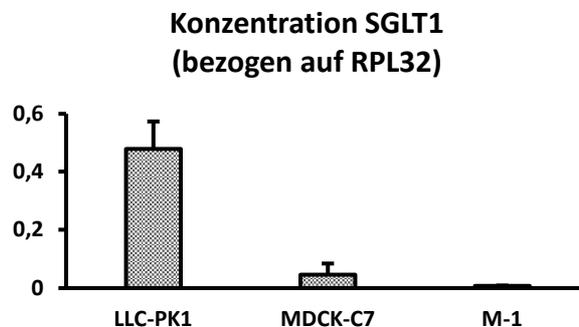


Abbildung 3.16: Expression des SGLT1-Gens (Normierung auf das „Housekeeping Gen“ RPL32) in den drei verwendeten Zelllinien

3.2 TGFBR1- und TGFBR2-Gen

Alle drei Zelllinien exprimieren das TGFBR1-Gen in vergleichsweise geringem Ausmaß – vor allem im Hinblick auf die Expression der anderen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Gene. Die stärkste Expression des TGFBR1-Gens findet sich bei den MDCK-C7-Zellen. Bei den M-1-Zellen ist die Genexpression um etwa 60 % geringer, bei den LLC-PK1-Zellen ist sie sogar um rund 70 % geringer (siehe Abbildung 3.17).

**Konzentration TGFBR1
(MDCK-C7-Standard; bezogen auf
RPL32)**

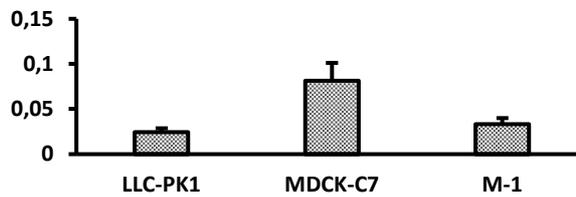


Abbildung 3.17: Expression des TGFBR1-Gens (Normierung auf das „Housekeeping Gen“ RPL32; Verwendung des MDCK-C7-Standards) in den drei verwendeten Zelllinien

Insgesamt ist die Expression des TGFBR2-Gens bei den drei Zelllinien deutlich stärker ausgeprägt und liegt im Vergleich mit der Expression von TGFBR1 in einer grob hundertfach höheren Größenordnung. Vor allem die MDCK-C7-Zellen exprimieren das Gen besonders stark, wobei sich – im Gegensatz zu TGFBR1 – auch bei den M-1-Zellen eine ähnliche hohe Genexpression feststellen lässt. Lediglich bei den im Experiment verwendeten LLC-PK1-Zellen zeigen sich deutliche Unterschiede zu den anderen beiden Zelllinien. Die Expression von TGFBR1 ist im Vergleich zu den MDCK-C7- und M-1-Zellen um jeweils über 80 % geringer (siehe Abbildung 3.18).

**Konzentration TGFBR2
(bezogen auf RPL32)**

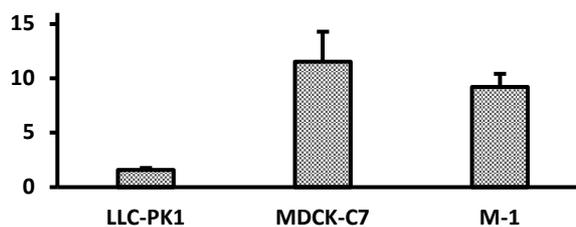


Abbildung 3.18: Expression des TGFBR2-Gens (Normierung auf das „Housekeeping Gen“ RPL32) in den drei verwendeten Zelllinien

IV. Diskussion

1. Anpassungsvorgänge des Nephrons infolge der SGLT2-Inhibition durch Empagliflozin - Vergleich Tierversuch vs. Zellkulturexperiment

Die Entdeckung der nephroprotektiven Wirkung der medikamentösen SGLT2-Hemmung - sowohl bei diabetischer [75, 101, 102] als auch bei nicht-diabetischer Nephropathie [37, 39] - hat in der internistischen Fachwelt für großes Aufsehen gesorgt, weil sie neue Wege in der Therapie und Progressionshemmung der chronischen Niereninsuffizienz aufzeigt. Verschiedene Arbeitsgruppen weltweit versuchen seitdem zu entschlüsseln, durch welche Signalwege diese Protektionsmechanismen in der Niere vermittelt werden. Daten aus Tierversuchen liefern jedoch widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich möglicher Nephroprotektion unter SGLT2-Inhibition bei nicht-diabetischer Nephropathie. So konnte zwar bei einigen Schädigungsmodellen eine Verbesserung verschiedener Nierenfunktionsparameter unter SGLT2-Inhibition demonstriert werden [1, 16–19, 48, 105], andererseits ließen aber vergleichbare Untersuchungen mit anderen Schädigungsmodellen keinen nephroprotektiven Vorteil einer Gliflozinthherapie erkennen [46, 59, 81, 106, 108]. Die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Frank Schweda konnte bei Wildtyp-Mäusen ohne renale Schädigung, die über acht Wochen mit Empagliflozin behandelt worden waren, eine Erhöhung des Nierengewichts feststellen, welche primär nicht als Wassereinlagerungen, sondern als Zellwachstum interpretiert wurde. Mikroskopisch konnte nämlich eine Zunahme der Zellfläche in kortikalen und medullären Abschnitten des Sammelrohrs sowie im S3-Segment des proximalen Tubulus nachgewiesen werden (Vorarbeiten Frederick Sinha, AG Schweda). Auch im Rahmen anderer Tierstudien konnte eine signifikante Zunahme des Nierengewichts unter SGLT2-Inhibition beobachtet werden [17, 18, 46, 81, 105]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun mittels Zellkulturexperiment geklärt werden, ob diese Hypertrophie durch eine direkte oder indirekte Wirkung der SGLT2-Inhibition induziert wird.

Zusammenfassend konnte die im Tierexperiment registrierte Hypertrophie von Nierenzellen unter Behandlung mit Empagliflozin in vitro weder unter statischen noch unter Flussbedingungen reproduziert werden. Es konnte vielmehr gezeigt werden, dass Empagliflozin in SGLT2-negativen Zellen keine Off-Target-Wirkung hinsichtlich Induktion einer Zellhypertrophie hat. Dies bestätigt die der Arbeit zugrundeliegende Hypothese, dass die von unserer Arbeitsgruppe beobachtete renale Hypertrophie bei Wildtyp-Mäusen ohne renale Schädigung wahrscheinlich durch eine indirekte Wirkung des Empagliflozins hervorgerufen wird.

Im Folgenden sollen die beobachteten Veränderungen der Protein-DNA-Ratio im Zellkultorexperiment unter der Behandlung mit Empagliflozin in Zusammenhang mit der Expression der für die Medikamentenwirkung erforderlichen Rezeptoren gesetzt werden.

1.1 Distaler Tubulus (MDCK-C7) und Sammelrohr (M-1)

Sowohl bei MDCK-C7-Zellen, distalen Tubuluszellen caninen Ursprungs, als auch bei M-1-Zellen, Sammelrohrzellen murinen Ursprungs, führte Empagliflozin zu keiner relevanten Änderung der Protein-DNA-Ratio im Sinne einer Hypertrophie. Im Vergleich zu mit Dimethylsulfoxid behandelten Kontrollzellen zeigten sich kaum Unterschiede bei den gemessenen Werten (siehe Abbildungen 3.1a/b, 3.7a/b, 3.8a/b). SGLT2-Inhibitoren haben im distalen Tubulus und Sammelrohr kein direktes Angriffsziel [43, 45], was eine direkte Medikamentenwirkung unwahrscheinlich macht. Weder die verwendete MDCK-C7- noch die M-1-Zelllinie exprimierte in relevanter Größenordnung das erforderliche Zielgen SGLT2 (siehe Abbildung 3.15). Ebenso war die Expression von SGLT1 bei beiden Zelllinien unzureichend. Dabei sei bereits an dieser Stelle angemerkt, dass Empagliflozin sehr spezifisch und mit hoher Affinität an sein Target bindet und eine Hemmung des SGLT1 nur durch sehr hohe Dosen (IC_{50} 8.300 nM) erzielt werden kann [34], die allerdings im vorliegenden Versuchsaufbau nicht erreicht wurden. Die Ergebnisse stehen damit im Gegensatz zu der beobachteten Hypertrophie von Sammelrohrzellen im Tiermodell (Vorarbeiten Frederick Sinha, AG Schweda). Möglicherweise lassen sich diese Veränderungen an den Tubuluszellen auf kompensatorische Anpassungsprozesse und damit sekundäre Effekte der SGLT2-Inhibition zurückführen. Infolge der Blockade des SGLT2 im proximalen Tubulus kommt es zu einer Erhöhung der Glukose- und Natriumchloridkonzentration und einer Hyperresorption dieser Moleküle in weiter distal gelegenen Nephronabschnitten. Um dort dem erhöhten Stoffangebot gerecht zu werden, finden vermutlich Anpassungsvorgänge, unter anderem in Form einer kompensatorischen Hypertrophie, statt. Die Syntheseleistung der betroffenen Zellen erhöht sich und es werden vermehrt entsprechende Transporter in die apikale Membran eingebaut, was die Aufnahmeleistung im dazugehörigen Segment steigert. Gleichzeitig ist möglicherweise eine Erhöhung des ATP-abhängigen Na^+ -Exports auf der basolateralen Seite von Nöten. Passend zu dieser Hypothese zeigte sich bei den Versuchstieren, die unter Empagliflozin-Behandlung ein erhöhtes Nierengewicht entwickelten, ebenfalls eine gesteigerte mRNA-Expression des $Na^+,K^+,2Cl^-$ -Kotransporters 2 (NKCC2) sowie des epithelialen Natriumkanals ENaC (Vorarbeiten Frederick Sinha, AG Schweda). Dagegen konnte im Rahmen einer Arbeit an diabetischen Mäusen, die neben einer hochkalorischen Diät zusätzlich Dapagliflozin erhielten,

keine Mehrexpression Na^+ -transportierender Kanäle im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife, im distalen Konvolut und Sammelrohr nachgewiesen werden. Im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife beziehungsweise im distalen Konvolut zeigte sich zwar eine nicht signifikante Steigerung der mRNA-Expression des $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -Kotransporters 2 (NKCC2) beziehungsweise des NaCl -Kotransporters (NCC), allerdings ohne Auswirkungen auf eine vermehrte Proteinexpression von NKCC2 sowie NCC. Die mRNA-Expression des Natrium-Calcium-Antiporters NCX1 war sogar signifikant vermindert. Im Sammelrohr wurde die mRNA-Expression der drei Untereinheiten (α , β , γ) des epithelialen Natriumkanals ENaC untersucht. Unter Dapagliflozin-Behandlung wurde zwar ENaC α vermehrt, gleichzeitig aber ENaC β und ENaC γ vermindert exprimiert [58].

Durch die osmotische Wirkung von Na^+ und Glukose wird zusätzlich Wasser im Lumen gebunden. Dadurch steigen das tubuläre Volumen und folglich der Volumenstrom ($Q = \Delta V / \Delta t$). Die veränderten Flussbedingungen im Sinne einer Flusssteigerung beeinflussen parakrine Prozesse. Gemäß der „Workload“-Hypothese induziert die Kombination aus höherem Fluss und tubulärer Mehrbelastung eine entsprechende kompensatorische Hypertrophie [42, 86]. Auch Kim et al. postulieren, dass durch Hemmung des SGLT2 im kortikalen proximalen Tubulus möglicherweise der tubuläre Workload im medullären dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife steigt [48].

Im Sammelrohr kann Wasser unter anderem über Aquaporin-2-Kanäle aufgenommen werden [57, 87]. Die zusätzliche Hyperresorption von Wasser erklärt möglicherweise das im Tierexperiment beobachtete Zellwachstum im Sammelrohr sowie die Zunahme der Anzahl an AQP-2 positiven Tubuli in Cortex und Medulla bei Wildtyp-Tieren nach achtwöchiger Empagliflozin-Behandlung (Vorarbeiten Frederick Sinha, AG Schweda). Diese Anpassungsvorgänge führen möglicherweise auch zur Zellschwellung. Unter diabetischen Bedingungen konnte diese Regulation allerdings nicht beobachtet werden. So konnte im Rahmen einer Studie an Ratten mit Streptozocin-induziertem Diabetes mellitus zwar eine gesteigerte Expression von AQP-2, NKCC2 und UT-A1 (Ureatransporter-A1) im Vergleich zu Kontrolltieren gezeigt werden, eine zusätzliche Behandlung mit Dapagliflozin führte anschließend aber nur zu einer weiteren Steigerung der UT-A1-Expression, nicht jedoch der Expression von AQP-2 und NKCC2 [20]. Auch unter Empagliflozin-Therapie verminderte sich bei diabetischen Ratten die mRNA- und Proteinexpression von AQP-2 im Vergleich zu Kontrolltieren. Dieser Trend einer niedrigeren Expression unter Empagliflozin wurde ebenso bei den Transportern NKCC2 und ENaC beobachtet, gleichzeitig wurde die Expression von

Aquaporin-7 hochreguliert, die Isoformen Aquaporin-1 und -3 blieben davon jedoch unbeeinflusst [21].

In der Zusammenschau ist die erhöhte luminal Konzentration an Na^+ -Ionen sowie Glukose infolge der proximalen SGLT2-Blockade wohl der entscheidende Faktor, um die beobachtete Hypertrophie von Sammelrohrzellen zu erklären. Daraus ergibt sich auch eine notwendige Anpassung des Versuchsaufbaus. Anstelle der Verwendung von Standardmedium sollte bei einer Wiederholung der Inkubationsexperimente Kulturmedium mit erhöhter Konzentration an Na^+ sowie Glukose eingesetzt werden, um besser die realen Bedingungen unter SGLT2-Inhibition zu imitieren.

1.2 Proximaler Tubulus (LLC-PK1)

LLC-PK1-Zellen, proximale Tubuluszellen porcinen Ursprungs, zeigten - im Gegensatz zu den beiden anderen untersuchten Zelllinien - unter Empagliflozin-Behandlung bei statischen Inkubationsbedingungen eine Tendenz zur Hypotrophie, welche allerdings gegenüber der DMSO-Gruppe statistisch nicht signifikant war ($p=0,19$ bzw. $p=0,13$) (siehe Abbildung 3.5a/b). Dieser Trend ließ sich auch bei den statischen Kontrollzellen der Superfusionsversuche erkennen, wo sich dieser Effekt der Empagliflozin-Behandlung noch deutlicher abzeichnete. Allerdings war auch hier die Abnahme der Protein-DNA-Ratio statisch nicht signifikant, wenn auch nur knapp ($p=0,06$) (siehe Abbildung 3.12). Diese Ergebnisse lassen sich auch in Zusammenhang mit der bisher bekannten spezifischen Wirkung des Medikaments am proximalen Tubulus in Einklang bringen. Empagliflozin hemmt dort den SGLT2 - bei sehr hohen Wirkstoffkonzentrationen unselektiv zusätzlich den SGLT1 - und verringert dadurch die Aufnahme von Natrium und Glukose in die Zellen [33, 34]. Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) von Empagliflozin bezüglich Hemmung des SGLT2 liegt bei 3,1 nM, während sie für den SGLT1 bei 8.300 nM (entsprechend 8,3 μM) beträgt [34]. Sämtliche Stimulationsversuche wurden mit einer Empagliflozin-Konzentration von 1 μM durchgeführt. Somit wurde sichergestellt, dass Empagliflozin einerseits den SGLT2 durch ausreichend hohe Wirkspiegel definitiv hemmt, andererseits aber auch spezifisch nur am SGLT2 angreift. Für eine pharmakologische Blockade des SGLT1 wären achtfach höhere Empagliflozin-Konzentrationen notwendig, die im Rahmen dieses Versuchsaufbaus nicht erreicht wurden.

Infolge der SGLT2-Inhibition muss aufgrund der reduzierten luminalen Na^+ -Aufnahme basolateral auch weniger Na^+ ausgeschleust werden. Insbesondere der basolaterale aktive Na^+ -Transport via Na^+/K^+ -ATPase ist mit Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP) verbunden

[30]. So bedingt die SGLT2-Blockade möglicherweise eine Reduktion der energieaufwendigen Transportprozesse innerhalb der Zelle, was sich letztendlich als zu beobachtende Hypotrophie äußert. Die Abnahme der Protein-DNA-Ratio lässt sich wohl auch wiederum mit Hilfe der „Workload“-Hypothese erklären. Eine Steigerung der tubulären Transportaktivität gilt als entscheidender Trigger für ein kompensatorisches Nierenwachstum. Durch medikamentöse SGLT2-Blockade sinkt jedoch die Transportaktivität im proximalen Tubulus unter das physiologische Maß, worauf die betroffenen Zellen hypotrophieren [42].

Die verwendeten LLC-PK1-Zellen exprimieren sowohl das SGLT2- als auch das SGLT1-Gen. Dabei ist die Expression des SGLT1-Gens allerdings dreimal stärker als die Expression des SGLT2-Gens, dem eigentlichen medikamentösen Target von Empagliflozin (siehe Abbildungen 3.15 und 3.16). Auch in vivo zeigt sich im proximalen Tubulus eine unterschiedliche Verteilung von SGLT1 und SGLT2. So findet sich frühproximal in den S1- und S2-Segmenten vor allem der SGLT2, spätproximal dagegen überwiegt der SGLT1 im S3-Segment [45, 104, 107]. Demzufolge weist die verwendete LLC-PK1-Linie vor allem Merkmale des S3-Segments auf. Im Tierexperiment der Arbeitsgruppe Schweda konnte bei Tubuluszellen des S3-Segments eine Hypertrophie im Sinne einer Zunahme der Zellfläche gemessen werden, was im Gegensatz zur im Zellkulturexperiment beobachteten Hypotrophie steht. Diese Unterschiede lassen sich möglicherweise dadurch erklären, dass in der Zellkultur primäre Effekte der SGLT2-Inhibition zu tragen kommen, während in vivo sekundäre Effekte entscheidend sind. Die Hemmung des SGLT2 in den S1- und S2-Segmenten und die damit verbundene verminderte Resorption von Na^+ und Glukose führt unter physiologischen Gegebenheiten zu einer kompensatorischen Hyperresorption dieser Moleküle im S3-Segment via SGLT1, wodurch im Urin trotz unterbundener Glukoseresorption via SGLT2 nur zwischen 50 und 60 % der filtrierte Glukose erscheinen [84]. Dieser Kompensationsmechanismus könnte möglicherweise die gemessene zelluläre Hypertrophie der S3-Segmente im Tiermodell erklären (Vorarbeiten Frederick Sinha, AG Schweda). Eine Arbeit, bei der diabetische Mäuse unter hochkalorischer Diät zusätzlich mit Dapagliflozin behandelt wurden, konnte eine vermehrte Expression von Na^+ -Transportern (NHE3 und NaPi-2a) im proximalen Tubulus nachweisen, was als Kompensationsmechanismus im Rahmen des Na^+ -Verlusts durch die SGLT2-Inhibition gewertet werden kann [58]. Bei einer anderen Studie an diabetischen Ratten zeigte sich unter Empagliflozin-Behandlung allerdings ein gegenteiliger Effekt mit einem tendenziellen Rückgang der NHE3-Expression [21]. Verschiedene Untersuchungen legen nahe, dass sich die Transportaktivitäten von SGLT2 und von NHE3 möglicherweise auch gegenseitig

beeinflussen [25]. Dies untermauert die Beobachtungen im Tierexperiment, steht aber gleichzeitig im Gegensatz zu den Ergebnissen der in vitro-Untersuchungen. Dabei sei aber angemerkt, dass im Rahmen dieser Arbeit keine Untersuchung der Proteinexpression stimulierter LLC-PK1-Zellen erfolgte.

Insgesamt spiegelt das verwendete Zellkulturmodell aber wohl nur unzureichend das komplexe Gesamtsystem „Nephron“ wider. Neben der Verwendung von Zelllinien dreier verschiedener Tierspezies (Hund, Schwein, Maus) anstelle einer humanen Zellpopulation stellen auch die überwiegend statischen Inkubationsbedingungen eine gewisse Limitation dar. Um die physiologischen Gegebenheiten auch in vitro in gewisser Weise zu imitieren, erfolgte deshalb - wie oben beschrieben - mit LLC-PK1-Zellen eine Wiederholung der Stimulationsexperimente unter Superfusion. Allerdings konnte hierbei im Gegensatz zu früheren Arbeiten [86] eine flussinduzierte Hypertrophie von proximalen Tubuluszellen nicht reproduziert werden (siehe Abbildung 3.13). Deshalb konnte auch nicht untersucht werden, ob eine flussinduzierte Hypertrophie durch Verwendung eines SGLT2-Inhibitors unterbunden werden kann. Möglicherweise verhinderte auch die Zugabe des Dimethylsulfoxids eine superfusionsbedingte Hypertrophie. Empagliflozin konnte aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften nur in Dimethylsulfoxid gelöst werden, wobei Dimethylsulfoxid ein weit verbreitetes Lösungsmittel ist [13], das erst ab Konzentrationen über 10 % zellschädigend wirkt [61]. Bei den Stimulationsversuchen betrug die Konzentration von Dimethylsulfoxid lediglich 0,1 %. Allerdings zeigte sich bei Studien, dass bereits diese geringe Konzentration durch Apoptoseinduktion [31] beziehungsweise Genomveränderungen [100] toxisch wirkt. Um einen möglichen direkten Effekt des Empagliflozins zu detektieren, ist der Versuchsaufbau jedoch gut geeignet, ermöglicht er doch die spezifische Untersuchung einzelner Nephronabschnitte, was in vivo nur schwierig zu realisieren wäre.

In Zusammenschau der Ergebnisse ist damit eine direkt durch die SGLT2-Inhibition vermittelte Nephroprotektion unwahrscheinlich, was auch verschiedene, in der Literatur diskutierte Schutzmechanismen widerspiegeln.

2. Nephroprotektive Mechanismen unter SGLT2-Inhibition

2.1 Reaktivierung des tubuloglomerulären Feedback-Mechanismus

Der wohl größte nephroprotektive Faktor einer Therapie mit SGLT2-Inhibitoren scheint eine Senkung der pathologischen glomerulären Hyperfiltration durch eine Reaktivierung des

tubuloglomerulären Feedback-Mechanismus zu sein. Durch die medikamentöse Hemmung der Natrium- und Glukoseresorption im proximalen Tubulus steigt die Konzentration dieser Moleküle sowie - infolge osmotischer Prozesse - auch das Flüssigkeitsvolumen im Tubulussystem an. Die Zellen der Makula densa registrieren eine erhöhte Natriumchloridkonzentration, wodurch der tubuloglomeruläre Feedback-Mechanismus aktiviert wird. Über eine präglomeruläre Vasokonstriktion sowie eine postglomeruläre Vasorelaxation, welche beide parakrin vermittelt werden, sinkt der glomeruläre Kapillardruck und infolgedessen die glomeruläre Filtrationsrate [98]. Diese Hypothese konnte schließlich unter hyperglykämischen Bedingungen sowohl im Tiermodell [96] als auch bei einer humanen Studienpopulation [99] bestätigt werden. Auch bei nicht-diabetischen Mäusen, bei denen durch unilaterale Nephrektomie eine Hyperfiltration induziert wurde, konnte durch eine Behandlung mit Empagliflozin die pathologische Hyperfiltration signifikant reduziert werden und damit gezeigt werden, dass dieser protektive Effekt einer medikamentösen SGLT2-Inhibition möglicherweise auch unter normoglykämischen Bedingungen zu tragen kommt [95].

2.2 Verringerte Aktivität des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems

Ein weiterer Mechanismus, über den die SGLT2-Blockade der glomerulären Hyperfiltration entgegenwirkt, liegt mutmaßlich in einer verringerten Aktivität des intrarenalen Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) [82]. Vermittelt wird dieser Effekt unter anderem über verminderte Angiotensinogen- und Angiotensin II-Spiegel im Urin sowie eine verminderte Expression des Angiotensin-II-Rezeptors Typ 1 (AT1R) in der Nierenrinde [91] beziehungsweise über eine verminderte mRNA- und Proteinexpression des Angiotensinogens [103], allerdings wurden diese Beobachtungen bei beiden Modellen unter diabetischer Stoffwechsellage gemacht. Unter Normoglykämie blieb das intrarenale Renin-Angiotensin-Aldosteron-System durch die SGLT2-Inhibition jedoch unbeeinflusst, was die Ergebnisse einer Studie an Ratten, die zur künstlichen Induktion einer nicht-diabetischen Nierenerkrankung subtotal nephrektomiert wurden, veranschaulichen [54]. In diesem Zusammenhang sei zu hervorzuheben, dass viele der Patienten, die in die DAPA-CKD-Studie eingeschlossen wurden, zusätzlich unter Therapie mit RAAS-Inhibitoren standen, was mögliche synergetische Effekte einer Kombinationstherapie von RAAS- und SGLT2-Inhibitoren vermuten lässt [37].

2.3 Steigerung der Ketogenese

Zusätzlich steigt - ebenfalls bei diabetischer Stoffwechsellage - unter dem Einfluss von SGLT2-Inhibitoren die Ketogenese, wobei die Ketonkörper als alternative Energiequelle für die ATP-

Synthese in den Mitochondrien fungieren, was indirekt infrarenale inflammatorische Prozesse hemmt [27, 49, 63, 64].

2.4 Schutz vor Hypoxie, oxidativem Stress und Fibrose - Rolle des Transkriptionsfaktors HIF-1 α

Schließlich konnten verschiedene Studien darlegen, dass eine Behandlung mit SGLT2-Inhibitoren die Niere vor Hypoxie, oxidativem Stress und Fibrose schützt. In Zellkulturexperimenten konnte nachgewiesen werden, dass Nierenzellen des proximalen Tubulus (HK-2 und RPTEC/TERT1), die mit Canagliflozin beziehungsweise Empagliflozin behandelt worden waren, unter Normoglykämie eine signifikante Verminderung der basalen sowie TGF- β 1-induzierten Expression von Schlüsselmediatoren (THBS1, TNC und PDGF-B), die sowohl mit der Entstehung einer Nierenfibrose als auch mit dem Fortschreiten einer Nierenerkrankung verknüpft sind, zeigen [76]. Dapagliflozin konnte in therapeutischen Dosen von 500 nM bei humanen Zellen des proximalen Tubulus den durch hyperglykämische Inkubationsbedingungen ausgelösten oxidativen Stress signifikant reduzieren, während Empagliflozin (Dosis 500 nM) dazu nicht in der Lage war [4]. Allerdings führte Empagliflozin (Dosis 100 nM beziehungsweise 500 nM) bei humanen proximalen Tubulusepithelzellen zu einem signifikanten Rückgang inflammatorischer und fibrotischer Biomarker (TLR4, IL-6, CIV), die unter Hyperglykämie vermehrt nachweisbar waren, und verminderte die DNA-Bindungsaktivität der Transkriptionsfaktoren NF- κ B and AP-1 [74]. Auch bei HK-2-Zellen (Human-Kidney-2-Zellen), die unter Normoxie mit hyperglykämischem Kulturmedium inkubiert worden waren, zeigte sich eine Abnahme von Fibrosemarkern, zusätzlich stieg die Expression von HIF-1 α (Hypoxie-induzierbarer Faktor 1-alpha) sowie GLUT-1, der durch HIF-1 α reguliert wird [66]. Ebenso war bei unilateral nephrektomierten Ratten, bei denen durch eine diätische Nahrung mit 8 % Natriumchlorid eine Hypertonie induziert wurde, eine erhöhte HIF-1 α -Expression im Nierenmark unter zusätzlicher Empagliflozin-Behandlung zu beobachten. Laut Autoren erklärt sich dieser Effekt dadurch, dass durch Hemmung des SGLT2 im kortikalen proximalen Tubulus möglicherweise der tubuläre Workload im medullären dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife steigt [48]. Die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Schweda konnte bei Wildtyp-Mäusen, welche mit Empagliflozin behandelt wurden, ebenfalls erhöhte HIF-1 α -Spiegel messen. Diese lassen sich wahrscheinlich auf eine Hyperresorption von Na⁺ und Cl⁻ in den minderdurchbluteten medullären Bereichen zurückführen (nicht publizierte Daten AG Schweda). Auch im Rahmen anderer Arbeiten konnte bei diabetischen Versuchstieren unter SGLT2-Inhibition ein Anstieg des medullären Sauerstoffverbrauchs - bei

Reduktion des kortikalen Sauerstoffbedarfs - [51] beziehungsweise eine medulläre Hypoxie - bei gleichzeitiger Induktion einer kortikalen Normoxie - [73] detektiert werden. An dieser Stelle sei angemerkt, dass wohl eine adäquate kortikale Oxygenierung essentiell ist, um den Progress einer chronischen Nierenerkrankung zu verlangsamen [80].

Die Rolle des HIF-1 α im Rahmen der SGLT2-vermittelten Nephroprotektion ist in der Literatur umstritten und wird kontrovers diskutiert. Der Transkriptionsfaktor HIF-1 α ist nicht nur an der Registrierung einer lokalen Hypoxie, sondern auch an der Regulation entsprechend erforderlicher Anpassungsvorgänge beteiligt [60]. Bis zu einem gewissen Maß schützt HIF-1 α wohl die Nierenfunktion, indem es beispielweise über verschiedene Signalkaskaden die Genexpression antihypertensiver Mediatoren steigert [55]. Außerdem wirkt sich die Aktivierung des HIF-Systems vermutlich positiv auf den oxidativen Stress, die Proteinurie sowie die tubulointerstitielle Schädigung bei diabetischer Nephropathie aus [68]. Zusätzlich wäre denkbar, dass getriggert durch die Hypoxie die Erythropoese steigt und sich dadurch die Nierendurchblutung in den minderperfundierten Nierenregionen verbessert [88–90]. Mehrere Studien an Patienten mit Diabetes mellitus Typ II konnten demonstrieren, dass unter SGLT2-Inhibition sowohl Hämatokrit- als auch Hämoglobinspiegel signifikant ansteigen [97].

Gleichzeitig sind mehrere Arbeitsgruppen aber im Konsens darüber, dass die nephroprotektiven Effekte wohl unter anderem infolge verminderter HIF-1 α -Spiegel unter SGLT2-Inhibition vermittelt werden. Eine chronische renale Hypoxie stellt wohl den entscheidenden Faktor an der Pathogenese der diabetischen Nephropathie sowie anderer chronischer Nierenerkrankungen mit dem Endpunkt einer renalen Fibrose dar, was in der Vergangenheit als „Hypothese der chronischen Hypoxie“ postuliert wurde [28, 29]. Eine chronische HIF-Aktivierung beschleunigt so den Progress einer diabetischen Nephropathie [41, 65]. Bei diabetischer Stoffwechsellage steigt insbesondere in den Zellen des proximalen Tubulus infolge der Hyperresorption von Glukose via SGLT2 der Sauerstoffbedarf [82]. Als Indikator für eine tubuläre Hypoxie wird vermehrt HIF-1 α exprimiert [9], worauf die Zellen sensibel reagieren und ihre Energiegewinnung von aerober Lipidoxidation auf anaerobe Glykolyse umstellen [15]. Unter SGLT2-Inhibition sinkt womöglich der Sauerstoffbedarf im proximalen Tubulus [82]. So konnte Luseogliflozin nicht nur in vitro die HIF-1 α -Expression in humanen proximalen Tubulusepithelzellen hemmen, sondern auch in vivo bei diabetischen Versuchstieren die tubuläre Schädigung und kortikale tubuläre HIF-1 α -Expression vermindern [9]. Sowohl Dapagliflozin [15] als auch Empagliflozin [53] sind in der Lage die glykolytische Energiegewinnung zu unterbinden. Schließlich hemmen SGLT2-Inhibitoren die HIF-1 α -

vermittelte Expression profibrotischer Mediatoren, was den epithelialen Umbau zu mesenchyalem Gewebe und folglich die Entstehung einer Nierenfibrose verhindert [9, 53].

Schlussendlich ist die Rolle des Transkriptionsfaktors HIF-1 α wohl als ambivalent zu werten und sowohl die richtige Dosis als auch insbesondere der Wirkort entscheidend. Während eine zellverträgliche Hypoxie mit folgender HIF-Aktivierung womöglich nephroprotektiv ist, induziert eine chronische Hypoxie zellschädigende Signalkaskaden und wirkt dadurch nephrotoxisch. Insbesondere im Kortex trägt eine Normoxie wohl erheblich zur Erhaltung der Nierenfunktion bei vorliegender renaler Schädigung bei.

3. Induktion einer Hypertrophie durch TGF β

TGF β wurde bei allen drei Zelllinien als Positivkontrolle zur Induktion einer Zellhypertrophie verwendet. TGF β hemmt die Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins - einem Tumorsuppressorgen - und stabilisiert so die aktive Form des Proteins, womit der Eintritt der Zelle in die S-Phase und die anschließende DNA-Synthese unterbunden wird. Dieser Mechanismus führt schließlich zu einer Hypertrophie der Zelle [56].

In vorherigen Experimenten der Arbeitsgruppe Schweda konnte durch den Einsatz von TGF β bei LLC-PK1-Zellen eine signifikante Hypertrophie induziert werden [86]. Da TGF β bei zwei der drei Zelllinien keine signifikante Hypertrophie induzieren konnte, wurde mittels Real Time Quantitativer PCR die entsprechende Expression der für den entsprechenden Signalweg erforderlichen Rezeptoren TGFBR1 sowie TGFBR2 untersucht (siehe Abbildungen 3.17 und 3.18). Sowohl die verwendeten LLC-PK1- als auch M-1-Zellen exprimierten die beiden Gene unzureichend, was die fehlende Hypertrophie erklären könnte. Es muss davon ausgegangen werden, dass das erforderliche Target in ähnlichen Experimenten [86] deutlich stärker exprimiert wurde. Im Vergleich dazu zeigten MDCK-C7-Zellen die stärkste Expression von TGFBR1 und TGFBR2, was die lichtmikroskopischen Veränderungen und die knapp nicht signifikante Hypertrophie erklären könnte (siehe Abbildungen 3.3 und 3.4a/b). Eventuell liegt die fehlende Hypertrophie durch TGF β auch in einer falschen Wahl des Kulturmediums begründet, obwohl die vorliegenden Kulturbedingungen analog zu denen vergleichbarer Experimente [86] gewählt wurden.

V. Zusammenfassung und Ausblick

Verschiedene klinische Studien konnten einen nephroprotektiven Zusatznutzen einer Therapie mit SGLT2-Inhibitoren demonstrieren, welcher sich unabhängig von einer diabetischen Grunderkrankung zeigte. Die molekularen Mechanismen, die diese protektiven Effekte vermitteln, sind bisher aber noch weitgehend ungeklärt. Bei Wildtyp-Mäusen, die acht Wochen mit Empagliflozin behandelt worden waren, konnte eine Zunahme des Nierengewichts beobachtet werden. Unklar blieb jedoch, wodurch sich diese Anpassungsvorgänge erklären lassen. Erste Befunde zeigten schließlich eine vergrößerte Zellfläche in einzelnen Tubulussegmenten, wobei nicht differenziert werden konnte, ob es sich um eine Hypertrophie oder um eine Zellschwellung handelt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob eine mögliche Nierenhypertrophie indirekt - infolge der SGLT2-Inhibition im proximalen Tubulus - oder direkt - im Sinne einer unspezifischen Medikamentenwirkung in weiter distalen Tubulussegmenten - vermittelt wird. Um in vitro ein vereinfachtes Modell des Nephrons zu imitieren, wurden drei verschiedene Zelllinien kultiviert, die die Abschnitte proximaler und distaler Tubulus sowie Sammelrohr repräsentierten. Ziel des Versuchsaufbaus war es, eine segmentspezifische, direkte Wirkung einer SGLT2-Blockade durch Empagliflozin zu detektieren. Als Nachweis einer möglichen Hypertrophie wurde die Zunahme der Protein-DNA-Ratio, welche mittels Messung der DNA- beziehungsweise Proteinkonzentration berechnet wurde, im Vergleich zu Kontrollzellen definiert. Um die realen physiologischen Bedingungen in der Niere besser zu simulieren, erfolgte die Inkubation der Zellen nicht nur unter statischen Bedingungen, sondern teilweise auch unter Superfusionsbedingungen.

Dabei konnte bei Zellen des proximalen Tubulus (LLC-PK1) unter medikamentöser SGLT2-Inhibition eine Tendenz zur Hypotrophie im Sinne einer Abnahme der Protein-DNA-Ratio beobachtet werden, welche allerdings statistisch nicht signifikant war. Bei den verwendeten LLC-PK1-Zellen konnte - im Gegensatz zu Voruntersuchungen - durch Superfusion keine Hypertrophie induziert werden, jedoch zeichnete sich auch hier bei statisch inkubierten Kontrollzellen eine Tendenz zur Hypotrophie unter Empagliflozin-Behandlung ab. Diese Beobachtungen lassen sich möglicherweise durch die populäre „Workload“-Hypothese erklären.

Bei Zellen des distalen Tubulus (MDCK-C7) und Sammelrohres (M-1) zeigte sich kein Effekt einer Empagliflozin-Behandlung, die gemessene Protein-DNA-Ratio blieb unbeeinflusst. Die in vivo beobachtete renale Hypertrophie konnte in vitro nicht reproduziert werden. Somit muss davon ausgegangen werden, dass es sich dabei am ehesten um einen indirekt vermittelten

Empagliflozin-Effekt handelt, vermutlich im Sinne einer kompensatorischen Hyperresorption in weiter distal gelegenen Nephronabschnitten.

Die Frage, durch welche Signalwege SGLT2-Inhibitoren auch bei Nierenerkrankungen nicht-diabetischer Genese nephroprotektiv wirken, konnte bis zum heutigen Tage nicht vollständig geklärt werden. Entscheidender Faktor scheint wohl eine Reduktion der pathologischen Hyperfiltration durch Reaktivierung des tubuloglomerulären Feedback-Mechanismus zu sein. Die vorliegende Arbeit konnte einen kleinen Beitrag zur Lösung dieser großen Fragestellung leisten, indem sie im Spiegel der aktuellen Literatur nahelegt, dass die Nephroprotektion unter SGLT2-Therapie am ehesten indirekt und nicht direkt vermittelt wird und sich mutmaßlich durch systemische Effekte im Gesamtsystem Niere auszeichnet.

VI. Anhang

Primer:

SGLT2	sense	5' GGCATGATCAGCCGCATTCT 3'
	anti-sense	5' ATGAGTCCGCGCAGACCATT 3'
TGFBR1	sense	5' GACATCTATGCAATGGGCTT 3'
	anti-sense	5' GATGGATCAGAAGGTACAAG 3'
TGFBR2	sense	5' GTCATCAGCTGGGAGGACCT 3'
	anti-sense	5' GAGCTCTTGAGGTCCCTGTG 3'
RPL32	sense	5' AACTGGCGGAAACCCAGAGG 3'
	anti-sense	5' CTGGGCAGCATGTGCTT 3'

Software:

- Microsoft Office 365
- GraphPad Prism (Version 5.00)

Abbildungen:

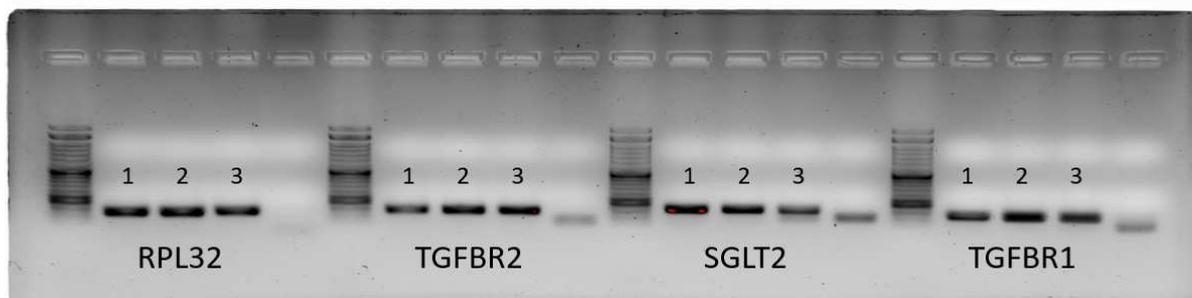
Kapitel I	
Abbildung 1.1	Schematische Darstellung des Nephrons mit histologischem Aufbau und Zell-Zell-Kontakten der Epithelzellen der einzelnen Tubulusabschnitte; (1-3) Segmente des proximalen Tubulus, (4-5) Crus descendens (4) und ascendens (5) des Intermediärtubulus, (6) Pars recta des distalen Tubulus, (7) Makula densa, (8) distales Konvolut, (9) kortikaler Teil des Sammelrohres mit Schaltzelle und Hauptzelle
Abbildung 1.2	Glukoseresorption im proximalen Tubulus
Abbildung 1.3	Prinzip des tubuloglomerulären Feedbacks
Abbildung 1.4	Kidney-Disease-Improving-Global-Outcomes (KDIGO)-Klassifikation der chronischen Nierenerkrankung (CKD)
Abbildung 1.5	Wirkmechanismus der RAAS-Blockade bei diabetischer Nephropathie

Abbildung 1.6	Auswirkungen von RAAS- und SGLT2-Inhibition auf den intraglomerulären Druck
Abbildung 1.7	Körper- und Nierengewicht von C57BL/6JR Wildtyp Mäusen nach einer achtwöchigen Behandlung mit dem SGLT2-Inhibitor Empagliflozin (EMPA)
Kapitel II	
Abbildung 2	Darstellung des in vitro-Flusssystems
Kapitel III	
Abbildung 3.1a	Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein-DNA-Ratio bei MDCK-C7-Zellen nach Stimulation mit Dimethylsulfoxid (DMSO) und Empagliflozin (EMPA) - Absolutwerte
Abbildung 3.1b	Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein-DNA-Ratio bei MDCK-C7-Zellen nach Stimulation mit Dimethylsulfoxid (DMSO) und Empagliflozin (EMPA) - Relativwerte
Abbildung 3.2	MDCK-C7-Zellpopulation vor Stimulation mit TGFβ
Abbildung 3.3	MDCK-C7-Zellpopulation nach Stimulation mit TGFβ – Sichtbare Veränderung der Zellform
Abbildung 3.4a	Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein-DNA-Ratio bei MDCK-C7-Zellen nach Stimulation mit Hungermedium und TGFβ - Absolutwerte
Abbildung 3.4b	Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein-DNA-Ratio bei MDCK-C7-Zellen nach Stimulation mit Hungermedium und TGFβ - Relativwerte
Abbildung 3.5a	Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein-DNA-Ratio bei LLC-PK1-Zellen nach Stimulation mit Dimethylsulfoxid (DMSO) und Empagliflozin (EMPA) - Absolutwerte
Abbildung 3.5b	Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein-DNA-Ratio bei LLC-PK1-Zellen nach Stimulation mit Dimethylsulfoxid (DMSO) und Empagliflozin (EMPA) - Relativwerte
Abbildung 3.6a	Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein-DNA-Ratio bei LLC-PK1-Zellen nach Stimulation mit Kulturmedium und TGFβ - Absolutwerte

Abbildung 3.6b	Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein-DNA-Ratio bei LLC-PK1-Zellen nach Stimulation mit Kulturmedium und TGFβ - Relativwerte
Abbildung 3.7a	Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein-DNA-Ratio bei M-1-Zellen nach Stimulation mit Dimethylsulfoxid (DMSO) und Empagliflozin (EMPA) - Absolutwerte; 75.000 Zellen pro Well
Abbildung 3.7b	Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein-DNA-Ratio bei M-1-Zellen nach Stimulation mit Dimethylsulfoxid (DMSO) und Empagliflozin (EMPA) - Relativwerte; 75.000 Zellen pro Well
Abbildung 3.8a	Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein-DNA-Ratio bei M-1-Zellen nach Stimulation mit Dimethylsulfoxid (DMSO) und Empagliflozin (EMPA) - Absolutwerte; 150.000 Zellen pro Well
Abbildung 3.8b	Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein-DNA-Ratio bei M-1-Zellen nach Stimulation mit Dimethylsulfoxid (DMSO) und Empagliflozin (EMPA) - Relativwerte; 150.000 Zellen pro Well
Abbildung 3.9a	Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein-DNA-Ratio bei M-1-Zellen nach Stimulation mit Hungermedium und TGFβ - Absolutwerte; 75.000 Zellen pro Well
Abbildung 3.9b	Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein-DNA-Ratio bei M-1-Zellen nach Stimulation mit Hungermedium und TGFβ - Relativwerte; 75.000 Zellen pro Well
Abbildung 3.10a	Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein-DNA-Ratio bei M-1-Zellen nach Stimulation mit Hungermedium und TGFβ - Absolutwerte; 150.000 Zellen pro Well
Abbildung 3.10b	Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein-DNA-Ratio bei M-1-Zellen nach Stimulation mit Hungermedium und TGFβ - Relativwerte; 150.000 Zellen pro Well
Abbildung 3.11	Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein-DNA-Ratio bei LLC-PK1-Zellen nach Stimulation mit Empagliflozin (EMPA) beziehungsweise (DMSO) sowie mit (Flow) beziehungsweise ohne (Kontrolle) Superfusion (1 mm/s)
Abbildung 3.12	Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein-DNA-Ratio bei LLC-PK1-Zellen nach Stimulation mit Empagliflozin (EMPA)

	beziehungsweise (DMSO) sowie mit (Flow) beziehungsweise ohne (Kontrolle) Superfusion (1 mm/s) - <i>Normierung EMPA_Flow auf DMSO_Flow sowie EMPA_Kontrolle auf DMSO_Kontrolle</i>
Abbildung 3.13	Protein- und DNA-Konzentration sowie Protein-DNA-Ratio bei LLC-PK1-Zellen nach Stimulation mit Empagliflozin (EMPA) beziehungsweise (DMSO) sowie mit (Flow) beziehungsweise ohne (Kontrolle) Superfusion (1 mm/s) - <i>Normierung EMPA_Flow auf EMPA_Kontrolle sowie DMSO_Flow auf DMSO_Kontrolle</i>
Abbildung 3.14	Expression des „Housekeeping Gens“ RPL 32 in den drei verwendeten Zelllinien
Abbildung 3.15	Expression des SGLT2-Gens (Normierung auf das „Housekeeping Gen“ RPL32) in den drei verwendeten Zelllinien
Abbildung 3.16	Expression des SGLT1-Gens (Normierung auf das „Housekeeping Gen“ RPL32) in den drei verwendeten Zelllinien
Abbildung 3.17	Expression des TGFBR1-Gens (Normierung auf das „Housekeeping Gen“ RPL32; Verwendung des MDCK-C7-Standards) in den drei verwendeten Zelllinien
Abbildung 3.18	Expression des TGFBR2-Gens (Normierung auf das „Housekeeping Gen“ RPL32) in den drei verwendeten Zelllinien

DNA-Agarosegelelektrophorese:



- (1) LLC-PK1-Zelllinie
- (2) MDCK-C7-Zelllinie
- (3) M-1-Zelllinie

VII. Literaturverzeichnis

1. Abbas N A T, El Salem A, Awad M M (2018) Empagliflozin, SGLT2 inhibitor, attenuates renal fibrosis in rats exposed to unilateral ureteric obstruction: potential role of klotho expression. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 391: 1347–1360.
2. Anders H-J, Davis J M, Thurau K (2016) Nephron Protection in Diabetic Kidney Disease. *The New England journal of medicine* 375: 2096–2098.
3. Anker S D, Butler J (2018) Empagliflozin, calcium, and SGLT1/2 receptor affinity: another piece of the puzzle. *ESC heart failure* 5: 549–551.
4. Baer P C, Koch B, Freitag J, Schubert R, Geiger H (2020) No Cytotoxic and Inflammatory Effects of Empagliflozin and Dapagliflozin on Primary Renal Proximal Tubular Epithelial Cells under Diabetic Conditions In Vitro. *International journal of molecular sciences* 21.
5. Bargman J M, Skorecki K, Gabriëls G (2020) Chronische Niereninsuffizienz. In: *Harrisons Innere Medizin, 20. Auflage, deutsche Ausgabe*. McGraw-Hill Education; ABW-Wissenschaftsverlag; Thieme, New York, Berlin, Leiben, Stuttgart, S. 2627–2639.
6. Bell P D, Komlosi P, Zhang Z-R (2009) ATP as a mediator of macula densa cell signalling. *Purinergic signalling* 5: 461–471.
7. Bell P D, Lapointe J Y, Cardinal J (1989) Direct measurement of basolateral membrane potentials from cells of the macula densa. *The American journal of physiology* 257: F463-8.
8. Bell P D, Lapointe J Y, Peti-Peterdi J (2003) Macula densa cell signaling. *Annual review of physiology* 65: 481–500.
9. Bessho R, Takiyama Y, Takiyama T, Kitsunai H, Takeda Y, Sakagami H, Ota T (2019) Hypoxia-inducible factor-1 α is the therapeutic target of the SGLT2 inhibitor for diabetic nephropathy. *Scientific reports* 9: 14754.
10. Bleich M, Lang F (2019) Aufbau der Niere und glomeruläre Filtration. In: Brandes R, Lang F, Schmidt R F (Hrsg.) *Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie*, 32. Auflage. Springer, Berlin, S. 395–405.

11. Bleich M, Lang F (2019) Integrative renale Funktion und Regulation. In: Brandes R, Lang F, Schmidt R F (Hrsg.) Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie, 32. Auflage. Springer, Berlin, S. 420–430.
12. Bleich M, Lang F (2019) Tubulärer Transport. In: Brandes R, Lang F, Schmidt R F (Hrsg.) Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie, 32. Auflage. Springer, Berlin, S. 406–419.
13. Brayton C F (1986) Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. *The Cornell veterinarian* 76: 61–90.
14. Brüne M, Linnenkamp U, Icks A (2021) Gesundheitsökonomische Aspekte des Diabetes mellitus. In: Deutsche Diabetes Gesellschaft (DDG) und (Hrsg.) Deutscher Gesundheitsbericht - Diabetes 2022. Die Bestandsaufnahme, S. 232–240.
15. Cai T, Ke Q, Fang Y, Wen P, Chen H, Yuan Q, Luo J, Zhang Y, Sun Q, Lv Y, Zen K, Jiang L, Zhou Y, Yang J (2020) Sodium-glucose cotransporter 2 inhibition suppresses HIF-1 α -mediated metabolic switch from lipid oxidation to glycolysis in kidney tubule cells of diabetic mice. *Cell death & disease* 11: 390.
16. Cassis P, Locatelli M, Cerullo D, Corna D, Buelli S, Zanchi C, Villa S, Morigi M, Remuzzi G, Benigni A, Zoja C (2018) SGLT2 inhibitor dapagliflozin limits podocyte damage in proteinuric nondiabetic nephropathy. *JCI insight* 3.
17. Castoldi G, Carletti R, Ippolito S, Colzani M, Barzagli F, Stella A, Zerbini G, Perseghin G, Di Gioia C R T (2020) Renal Anti-Fibrotic Effect of Sodium Glucose Cotransporter 2 Inhibition in Angiotensin II-Dependent Hypertension. *American journal of nephrology* 51: 119–129.
18. Castoldi G, Carletti R, Ippolito S, Colzani M, Barzagli F, Stella A, Zerbini G, Perseghin G, Zatti G, Di Gioia C R T (2021) Sodium-glucose cotransporter 2 inhibition prevents renal fibrosis in cyclosporine nephropathy. *Acta diabetologica* 58: 1059–1070.
19. Chang Y-K, Choi H, Jeong J Y, Na K-R, Lee K W, Lim B J, Choi D E (2016) Dapagliflozin, SGLT2 Inhibitor, Attenuates Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *PloS one* 11: e0158810.
20. Chen L, LaRocque L, Efe O, Wang J, Sands J M, Klein J D (2016) Effect of Dapagliflozin Treatment on Fluid and Electrolyte Balance in Diabetic Rats. *The American journal of the medical sciences* 352: 517–523.

21. Chung S, Kim S, Son M, Kim M, Koh E S, Shin S J, Ko S-H, Kim H-S (2019) Empagliflozin Contributes to Polyuria via Regulation of Sodium Transporters and Water Channels in Diabetic Rat Kidneys. *Frontiers in physiology* 10: 271.
22. Cosentino F, Grant P J, Aboyans V, Bailey C J, Ceriello A, Delgado V, Federici M, Filippatos G, Grobbee D E, Hansen T B, Huikuri H V, Johansson I, Jüni P, Lettino M, Marx N, Mellbin L G, Östgren C J, Rocca B, Roffi M, Sattar N, Seferović P M, Sousa-Uva M, Valensi P, Wheeler D C (2020) 2019 ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD. *European Heart Journal* 41: 255–323.
23. Deutsche Gesellschaft für Nephrologie e.V. Weltdiabetestag 2019: Fast die Hälfte aller Dialysefälle geht auf das Konto von Diabetes!
<https://www.dgfn.eu/pressemeldung/weltdiabetestag-2019-fast-die-haelfte-aller-dialysefaelle-geht-auf-das-konto-von-diabetes.html> (17.08.2022).
24. Dheda K, Huggett J F, Bustin S A, Johnson M A, Rook G, Zumla A (2004) Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *BioTechniques* 37: 112-4, 116, 118-9.
25. Dominguez Rieg J A, Xue J, Rieg T (2020) Tubular effects of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors: intended and unintended consequences. *Current opinion in nephrology and hypertension* 29: 523–530.
26. Eaton, Pooler J (2018) *Vander's Renal Physiology, 9e*, 9th edition. McGraw-Hill Education LLC, New York, N.Y.
27. Ferrannini E, Baldi S, Frascerra S, Astiarraga B, Heise T, Bizzotto R, Mari A, Pieber T R, Muscelli E (2016) Shift to Fatty Substrate Utilization in Response to Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibition in Subjects Without Diabetes and Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes* 65: 1190–1195.
28. Fine L G, Norman J T (2008) Chronic hypoxia as a mechanism of progression of chronic kidney diseases: from hypothesis to novel therapeutics. *Kidney international* 74: 867–872.
29. Fine L G, Orphanides C, Norman J T (1998) Progressive renal disease: the chronic hypoxia hypothesis. *Kidney international. Supplement* 65: S74-8.

30. Fromm M (2019) Transport in Membranen und Epithelien. In: Brandes R, Lang F, Schmidt R F (Hrsg.) *Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie*, 32. Auflage. Springer, Berlin, S. 22–37.
31. Galvao J, Davis B, Tilley M, Normando E, Duchon M R, Cordeiro M F (2014) Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 28: 1317–1330.
32. Ghezzi C, Loo D D F, Wright E M (2018) Physiology of renal glucose handling via SGLT1, SGLT2 and GLUT2. *Diabetologia* 61: 2087–2097.
33. Ghosh R K, Ghosh S M, Chawla S, Jasdawala S A (2012) SGLT2 inhibitors: a new emerging therapeutic class in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Journal of clinical pharmacology* 52: 457–463.
34. Grempler R, Thomas L, Eckhardt M, Himmelsbach F, Sauer A, Sharp D E, Bakker R A, Mark M, Klein T, Eickelmann P (2012) Empagliflozin, a novel selective sodium glucose cotransporter-2 (SGLT-2) inhibitor: characterisation and comparison with other SGLT-2 inhibitors. *Diabetes, obesity & metabolism* 14: 83–90.
35. Halimi S, Vergès B (2014) Adverse effects and safety of SGLT-2 inhibitors. *Diabetes & metabolism* 40: S28-34.
36. Hammes H-P, Lemmen K D (2021) Diabetes und Augenerkrankungen. In: Deutsche Diabetes Gesellschaft (DDG) und (Hrsg.) *Deutscher Gesundheitsbericht - Diabetes 2022. Die Bestandsaufnahme*, S. 90–102.
37. Heerspink H J L, Stefánsson B V, Correa-Rotter R, Chertow G M, Greene T, Hou F-F, Mann J F E, McMurray J J V, Lindberg M, Rossing P, Sjöström C D, Toto R D, Langkilde A-M, Wheeler D C (2020) Dapagliflozin in Patients with Chronic Kidney Disease. *The New England journal of medicine* 383: 1436–1446.
38. Herrington W G, Preiss D, Haynes R, Eynatten M von, Staplin N, Hauske S J, George J T, Green J B, Landray M J, Baigent C, Wanner C (2018) The potential for improving cardio-renal outcomes by sodium-glucose co-transporter-2 inhibition in people with chronic kidney disease: a rationale for the EMPA-KIDNEY study. *Clinical kidney journal* 11: 749–761.

39. Herrington W G, Staplin N, Wanner C, Green J B, Hauske S J, Emberson J R, Preiss D, Judge P, Mayne K J, Ng S Y A, Sammons E, Zhu D, Hill M, Stevens W, Wallendszus K, Brenner S, Cheung A K, Liu Z-H, Li J, Hooi L S, Liu W, Kadowaki T, Nangaku M, Levin A, Cherney D, Maggioni A P, Pontremoli R, Deo R, Goto S, Rossello X, Tuttle K R, Steubl D, Petrini M, Massey D, Eilbracht J, Brueckmann M, Landray M J, Baigent C, Haynes R (2023) Empagliflozin in Patients with Chronic Kidney Disease. *The New England journal of medicine* 388: 117–127.
40. Hilal-Dandan R, Brunton L L, Goodman L S, Gilman A (2014) *Goodman and Gilman's manual of pharmacology and therapeutics*, Second edition. McGraw-Hill, New York.
41. Hirakawa Y, Tanaka T, Nangaku M (2017) Mechanisms of metabolic memory and renal hypoxia as a therapeutic target in diabetic kidney disease. *Journal of diabetes investigation* 8: 261–271.
42. Hostetter T H (1995) Progression of renal disease and renal hypertrophy. *Annual review of physiology* 57: 263–278.
43. Hummel C S, Lu C, Loo D D F, Hirayama B A, Voss A A, Wright E M (2011) Glucose transport by human renal Na⁺/D-glucose cotransporters SGLT1 and SGLT2. *American journal of physiology. Cell physiology* 300: C14-21.
44. (2021) *IDF Diabetes Atlas*, 10th edition, Brussels, Belgium.
45. Kanai Y, Lee W S, You G, Brown D, Hediger M A (1994) The human kidney low affinity Na⁺/glucose cotransporter SGLT2. Delineation of the major renal reabsorptive mechanism for D-glucose. *The Journal of clinical investigation* 93: 397–404.
46. Kapoor S, Rodriguez D, Riwanto M, Edenhofer I, Segerer S, Mitchell K, Wüthrich R P (2015) Effect of Sodium-Glucose Cotransport Inhibition on Polycystic Kidney Disease Progression in PCK Rats. *PloS one* 10: e0125603.
47. *Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) (Hrsg.) (2013) Summary of Recommendation Statements. Kidney international supplements* 3: 5–14.
48. Kim S, Jo C H, Kim G-H (2019) Effects of empagliflozin on nondiabetic salt-sensitive hypertension in uninephrectomized rats. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* 42: 1905–1915.
49. Kimura Y, Kuno A, Tanno M, Sato T, Ohno K, Shibata S, Nakata K, Sugawara H, Abe K, Igaki Y, Yano T, Miki T, Miura T (2019) Canagliflozin, a sodium-glucose cotransporter 2

- inhibitor, normalizes renal susceptibility to type 1 cardiorenal syndrome through reduction of renal oxidative stress in diabetic rats. *Journal of diabetes investigation* 10: 933–946.
50. Kon V, Fogo A, Ichikawa I (1993) Bradykinin causes selective efferent arteriolar dilation during angiotensin I converting enzyme inhibition. *Kidney international* 44: 545–550.
51. Layton A T, Vallon V, Edwards A (2016) Predicted consequences of diabetes and SGLT inhibition on transport and oxygen consumption along a rat nephron. *American journal of physiology. Renal physiology* 310: F1269-83.
52. Lewis J B, Neilson E G, Gabriëls G (2020) Glomeruläre Erkrankungen. In: *Harrisons Innere Medizin, 20. Auflage, deutsche Ausgabe*. McGraw-Hill Education; ABW-Wissenschaftsverlag; Thieme, New York, Berlin, Leiben, Stuttgart, S. 2657–2680.
53. Li J, Liu H, Takagi S, Nitta K, Kitada M, Srivastava S P, Takagaki Y, Kanasaki K, Koya D (2020) Renal protective effects of empagliflozin via inhibition of EMT and aberrant glycolysis in proximal tubules. *JCI insight* 5.
54. Li L, Konishi Y, Morikawa T, Zhang Y, Kitabayashi C, Kobara H, Masaki T, Nakano D, Hitomi H, Kobori H, Nishiyama A (2018) Effect of a SGLT2 inhibitor on the systemic and intrarenal renin-angiotensin system in subtotaly nephrectomized rats. *Journal of pharmacological sciences* 137: 220–223.
55. Li N (2012) Hypoxia inducible factor-1 α -mediated gene activation in the regulation of renal medullary function and salt sensitivity of blood pressure. *American Journal of Cardiovascular Disease* 2: 208–215.
56. Liu B, Preisig P (1999) TGF-beta1-mediated hypertrophy involves inhibiting pRB phosphorylation by blocking activation of cyclin E kinase. *The American journal of physiology* 277: F186-94.
57. Lüllmann-Rauch R, Asan E (2019) *Taschenlehrbuch Histologie, 6. vollständig überarbeitete Auflage*. Thieme, Stuttgart.
58. Ma C, Baaij J H de, Millar P J, Gault V A, Galan B E de, Bindels R J, Hoenderop J G (2019) Effect of Dapagliflozin Treatment on the Expression of Renal Sodium Transporters/Channels on High-Fat Diet Diabetic Mice. *Nephron. Clinical Practice* 142: 51–60.
59. Ma Q, Steiger S, Anders H-J (2017) Sodium glucose transporter-2 inhibition has no renoprotective effects on non-diabetic chronic kidney disease. *Physiological reports* 5.

60. Maxwell P (2003) HIF-1: an oxygen response system with special relevance to the kidney. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 14: 2712–2722.
61. Ménorval M-A de, Mir L M, Fernández M L, Reigada R (2012) Effects of dimethyl sulfoxide in cholesterol-containing lipid membranes: a comparative study of experiments in silico and with cells. *PloS one* 7: e41733.
62. Merker L, Bautsch B-W, Ebert T, Guthoff M, Isermann B (2021) Nephropathie bei Diabetes. *Diabetologie und Stoffwechsel* 16: S324-S328.
63. Min S H, Oh T J, Baek S-I, Lee D-H, Kim K M, Moon J H, Choi S H, Park K S, Jang H C, Lim S (2018) Degree of ketonaemia and its association with insulin resistance after dapagliflozin treatment in type 2 diabetes. *Diabetes & metabolism* 44: 73–76.
64. Mulder S, Heerspink H J L, Darshi M, Kim J J, Laverman G D, Sharma K, Pena M J (2019) Effects of dapagliflozin on urinary metabolites in people with type 2 diabetes. *Diabetes, obesity & metabolism* 21: 2422–2428.
65. Nangaku M (2006) Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: a final common pathway to end-stage renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 17: 17–25.
66. Ndibalema A R, Kabuye D, Wen S, Li L, Li X, Fan Q (2020) Empagliflozin Protects Against Proximal Renal Tubular Cell Injury Induced by High Glucose via Regulation of Hypoxia-Inducible Factor 1-Alpha. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy* 13: 1953–1967.
67. Neal B, Perkovic V, Mahaffey K W, Zeeuw D de, Fulcher G, Erondou N, Shaw W, Law G, Desai M, Matthews D R (2017) Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes. *The New England journal of medicine* 377: 644–657.
68. Nordquist L, Friederich-Persson M, Fasching A, Liss P, Shoji K, Nangaku M, Hansell P, Palm F (2014) Activation of Hypoxia-Inducible Factors Prevents Diabetic Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 26: 328–338.
69. Offermanns S (2016) Diuretika. In: Freissmuth M, Offermanns S, Böhm S (Hrsg.) *Pharmakologie und Toxikologie. Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie*, 2. aktualisierte und erweiterte Auflage. Springer, Berlin, Heidelberg, S. 391–406.

70. Offermanns S (2016) Inhibitoren des Renin-Angiotensin- Aldosteron-Systems. In: Freissmuth M, Offermanns S, Böhm S (Hrsg.) Pharmakologie und Toxikologie. Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie, 2. aktualisierte und erweiterte Auflage. Springer, Berlin, Heidelberg, S. 373–389.
71. Offermanns S (2020) Antidiabetika. In: Freissmuth M, Offermanns S, Böhm S (Hrsg.) Pharmakologie und Toxikologie. Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie, 3. Aufl. 2020. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S. 679–702.
72. Offermanns S (2020) Diuretika. In: Freissmuth M, Offermanns S, Böhm S (Hrsg.) Pharmakologie und Toxikologie. Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie, 3. Aufl. 2020. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S. 413–429.
73. O'Neill J, Fasching A, Pihl L, Patinha D, Franzén S, Palm F (2015) Acute SGLT inhibition normalizes O₂ tension in the renal cortex but causes hypoxia in the renal medulla in anaesthetized control and diabetic rats. *American journal of physiology. Renal physiology* 309: F227-34.
74. Panchapakesan U, Pegg K, Gross S, Komala M G, Mudaliar H, Forbes J, Pollock C, Mather A (2013) Effects of SGLT2 inhibition in human kidney proximal tubular cells--renoprotection in diabetic nephropathy? *PloS one* 8: e54442.
75. Perkovic V, Jardine M J, Neal B, Bompoint S, Heerspink H J L, Charytan D M, Edwards R, Agarwal R, Bakris G, Bull S, Cannon C P, Capuano G, Chu P-L, Zeeuw D de, Greene T, Levin A, Pollock C, Wheeler D C, Yavin Y, Zhang H, Zinman B, Meininger G, Brenner B M, Mahaffey K W (2019) Canagliflozin and Renal Outcomes in Type 2 Diabetes and Nephropathy. *The New England journal of medicine* 380: 2295–2306.
76. Pirklbauer M, Schupart R, Fuchs L, Staudinger P, Corazza U, Sallaberger S, Leierer J, Mayer G, Schramek H (2019) Unraveling reno-protective effects of SGLT2 inhibition in human proximal tubular cells. *American journal of physiology. Renal physiology* 316: F449-F462.
77. Powers A C, Niswender K D, Evans-Molina C, Wernicke C, Bobbert T (2020) Diabetes mellitus: Diagnostik, Klassifikation und Pathophysiologie. In: *Harrisons Innere Medizin*, 20. Auflage, deutsche Ausgabe. McGraw-Hill Education; ABW-Wissenschaftsverlag; Thieme, New York, Berlin, Leiben, Stuttgart, S. 3535–3545.

78. Powers A C, Niswender K D, Rickels M R, Wernicke C, Bobbert T (2020) Diabetes mellitus: Management und Behandlungsansätze. In: *Harrisons Innere Medizin*, 20. Auflage, deutsche Ausgabe. McGraw-Hill Education; ABW-Wissenschaftsverlag; Thieme, New York, Berlin, Leiben, Stuttgart, S. 3546–3566.
79. Powers A C, Stafford J M, Rickels M R, Bobbert T (2020) Diabetes mellitus: Komplikationen. In: *Harrisons Innere Medizin*, 20. Auflage, deutsche Ausgabe. McGraw-Hill Education; ABW-Wissenschaftsverlag; Thieme, New York, Berlin, Leiben, Stuttgart, S. 3567–3576.
80. Pruijm M, Milani B, Pivin E, Podhajska A, Vogt B, Stuber M, Burnier M (2018) Reduced cortical oxygenation predicts a progressive decline of renal function in patients with chronic kidney disease. *Kidney international* 93: 932–940.
81. Rajasekeran H, Reich H N, Hladunewich M A, Cattran D, Lovshin J A, Lytvyn Y, Bjornstad P, Lai V, Tse J, Cham L, Majumder S, Bowskill B B, Kabir M G, Advani S L, Gibson I W, Sood M M, Advani A, Cherney D Z I (2018) Dapagliflozin in focal segmental glomerulosclerosis: a combined human-rodent pilot study. *American journal of physiology. Renal physiology* 314: F412-F422.
82. Ravindran S, Munusamy S (2022) Renoprotective mechanisms of sodium-glucose co-transporter 2 (SGLT2) inhibitors against the progression of diabetic kidney disease. *Journal of cellular physiology* 237: 1182–1205.
83. Riede U-N, Rumpelt H-J, Sauter G, Schmid O, St. Störkel (2004) Uropoetisches System. In: Riede U-N (Hrsg.) *Allgemeine und spezielle Pathologie*. 168 Tabellen, 5. komplett überarb. Aufl. Thieme, Stuttgart, S. 809–860.
84. Rieg T, Masuda T, Gerasimova M, Mayoux E, Platt K, Powell D R, Thomson S C, Koepsell H, Vallon V (2013) Increase in SGLT1-mediated transport explains renal glucose reabsorption during genetic and pharmacological SGLT2 inhibition in euglycemia. *American journal of physiology. Renal physiology* 306: F188-93.
85. Ryu H, Layton A T (2014) Tubular fluid flow and distal NaCl delivery mediated by tubuloglomerular feedback in the rat kidney. *Journal of mathematical biology* 68: 1023–1049.
86. Schreiber A (2012) *Die Mechanismen der kompensatorischen renalen Hypertrophie*. Universität Regensburg, Dissertation.

87. Schwab A, Oberleithner H (2019) Salz- und Wasserhaushalt. In: Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S (Hrsg.) Physiologie, 9. vollständig überarbeitete Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, S. 442–475.
88. Semenza G L (1998) Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Current opinion in genetics & development* 8: 588–594.
89. Semenza G L (1999) Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annual review of cell and developmental biology* 15: 551–578.
90. Semenza G L (2000) HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. : 1985) 88: 1474–1480.
91. Shin S J, Chung S, Kim S J, Lee E-M, Yoo Y-H, Kim J-W, Ahn Y-B, Kim E-S, Moon S-D, Kim M-J, Ko S-H (2016) Effect of Sodium-Glucose Co-Transporter 2 Inhibitor, Dapagliflozin, on Renal Renin-Angiotensin System in an Animal Model of Type 2 Diabetes. *PloS one* 11: e0165703.
92. Silbernagl S (2019) Die Funktion der Nieren. In: Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S (Hrsg.) Physiologie, 9. vollständig überarbeitete Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, S. 383–438.
93. Stallmach T, Klöppel G, Roth J, Spinass A (2008) Stoffwechselerkrankungen. In: Böcker W (Hrsg.) Pathologie. Mit über 200 Tabellen ; [mit dem Plus im Web ; Zugangscode im Buch; www.studentconsult.de, 4. vollständig überarb. Aufl. Elsevier Urban & Fischer, München, Jena, S. 1133–1138.
94. Tauber P (2020) Beeinflussung der glomerulären Filtrationsrate durch SGLT2-Inhibitoren. *Nephrologe* 15: 114–118.
95. Tauber P, Sinha F, Berger R S, Gronwald W, Dettmer K, Kuhn M, Trum M, Maier L S, Wagner S, Schweda F (2021) Empagliflozin Reduces Renal Hyperfiltration in Response to Uninephrectomy, but Is Not Nephroprotective in UNx/DOCA/Salt Mouse Models. *Frontiers in pharmacology* 12: 761855.
96. Thomson S C, Vallon V (2021) Effects of SGLT2 inhibitor and dietary NaCl on glomerular hemodynamics assessed by micropuncture in diabetic rats. *American journal of physiology. Renal physiology* 320: F761-F771.

97. Tian Q, Guo K, Deng J, Zhong Y, Yang L (2022) Effects of SGLT2 inhibitors on haematocrit and haemoglobin levels and the associated cardiorenal benefits in T2DM patients: A meta-analysis. *Journal of cellular and molecular medicine* 26: 540–547.
98. Vallon V, Thomson S C (2020) The tubular hypothesis of nephron filtration and diabetic kidney disease. *Nature reviews. Nephrology* 16: 317–336.
99. van Bommel E J M, Muskiet M H A, van Baar M J B, Tonneijck L, Smits M M, Emanuel A L, Bozovic A, Danser A H J, Geurts F, Hoorn E J, Touw D J, Larsen E L, Poulsen H E, Kramer M H H, Nieuwdorp M, Joles J A, van Raalte D H (2020) The renal hemodynamic effects of the SGLT2 inhibitor dapagliflozin are caused by post-glomerular vasodilatation rather than pre-glomerular vasoconstriction in metformin-treated patients with type 2 diabetes in the randomized, double-blind RED trial. *Kidney international* 97: 202–212.
100. Verheijen M, Lienhard M, Schrooders Y, Clayton O, Nudischer R, Boerno S, Timmermann B, Selevsek N, Schlapbach R, Gmuender H, Gotta S, Geraedts J, Herwig R, Kleinjans J, Caiment F (2019) DMSO induces drastic changes in human cellular processes and epigenetic landscape in vitro. *Scientific reports* 9: 4641.
101. Wanner C, Inzucchi S E, Lachin J M, Fitchett D, Eynatten M von, Mattheus M, Johansen O E, Woerle H J, Broedl U C, Zinman B (2016) Empagliflozin and Progression of Kidney Disease in Type 2 Diabetes. *The New England journal of medicine* 375: 323–334.
102. Wiviott S D, Raz I, Bonaca M P, Mosenzon O, Kato E T, Cahn A, Silverman M G, Zelniker T A, Kuder J F, Murphy S A, Bhatt D L, Leiter L A, McGuire D K, Wilding J P H, Ruff C T, Gause-Nilsson I A M, Fredriksson M, Johansson P A, Langkilde A-M, Sabatine M S (2019) Dapagliflozin and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *The New England journal of medicine* 380: 347–357.
103. Woods T C, Satou R, Miyata K, Katsurada A, Dugas C M, Klingenberg N C, Fonseca V A, Navar L G (2019) Canagliflozin Prevents Intrarenal Angiotensinogen Augmentation and Mitigates Kidney Injury and Hypertension in Mouse Model of Type 2 Diabetes Mellitus. *American journal of nephrology* 49: 331–342.
104. Wright E M (2001) Renal Na(+)-glucose cotransporters. *American journal of physiology. Renal physiology* 280: F10-8.

105. Yamato M, Kato N, Kakino A, Yamada K-I, Inoguchi T (2020) Low dose of sodium-glucose transporter 2 inhibitor ipragliflozin attenuated renal dysfunction and interstitial fibrosis in adenine-induced chronic kidney disease in mice without diabetes. *Metabolism open* 7: 100049.
106. Yamazaki D, Konishi Y, Morikawa T, Kobara H, Masaki T, Hitomi H, Osafune K, Nakano D, Kittikulsuth W, Nishiyama A (2020) Failure to confirm a sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor-induced hematopoietic effect in non-diabetic rats with renal anemia. *Journal of diabetes investigation* 11: 834–843.
107. You G, Lee W S, Barros E J, Kanai Y, Huo T L, Khawaja S, Wells R G, Nigam S K, Hediger M A (1995) Molecular characteristics of Na(+)-coupled glucose transporters in adult and embryonic rat kidney. *The Journal of biological chemistry* 270: 29365–29371.
108. Zhang Y, Thai K, Kepecs D M, Gilbert R E (2016) Sodium-Glucose Linked Cotransporter-2 Inhibition Does Not Attenuate Disease Progression in the Rat Remnant Kidney Model of Chronic Kidney Disease. *PloS one* 11: e0144640.
109. Zinman B, Wanner C, Lachin J M, Fitchett D, Bluhmki E, Hantel S, Mattheus M, Devins T, Johansen O E, Woerle H J, Broedl U C, Inzucchi S E (2015) Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *The New England journal of medicine* 373: 2117–2128.

VIII. Danksagung

Am Ende dieser Arbeit möchte ich den Dank an all diejenigen richten, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen voran möchte ich meinem Doktorvater **Prof. Dr. Frank Schweda** danken, der mich in sein Team aufgenommen und mir ermöglicht hat, in äußerst kollegialer und wertschätzender Atmosphäre in die Welt der Grundlagenforschung einzutauchen. Die Tür zu seinem Büro stand im wahrsten Sinne des Wortes stets offen, was ich sehr zu schätzen weiß.

Ein riesiges Dankeschön möchte ich meinem Betreuer **Dr. rer. nat. Philipp Tauber** aussprechen. Er hat mich nicht nur geduldig in sämtliche labortechnische Methoden eingearbeitet, sondern stand mir während meiner gesamten Zeit im Labor stets bedingungslos mit Rat und Tat zur Seite. Ich konnte stets auf seine Hilfe und Unterstützung zählen und hätte mir keinen besseren Betreuer wünschen können. Selbst als am Sonntagnachmittag die Sterilbank ihren Dienst versagte und meinen Zellen der vorzeitige Tod drohte oder mitten in der Nacht der Inkubationsschrank während des Flow-Versuchs ein Eigenleben entwickelte, hat er ohne zu zögern den Weg zur Universität auf sich genommen und mir in seiner eigentlich wohlverdienten Freizeit aus der Patsche geholfen.

Ebenso möchte ich mich natürlich bei der ganzen AG Schweda bedanken, namentlich **Dr. rer. nat. Anna Federlein, Claudia Lehrmann, Sabrina Habel, Katharina Krieger, Rosmarie Heydn** und **Robert Götz**. Ich hatte eine großartige Zeit bei euch im Labor, habe mich von Anfang an willkommen gefühlt und konnte mich bei labortechnischen Fragen stets vertrauensvoll an euch wenden.

Ein herzlicher Dank gilt auch der **Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Karl Kunzelmann**, deren Inkubationsschrank ich freundlicherweise mitbenutzen durfte, sowie dem **Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie** um Prof. Dr. Achim Göpferich, der mir das Fluorometer für meine DNA-Messungen zur Verfügung stellte. Ein Dankeschön gilt auch **Apotheker Felix Baumann** für die entsprechende technische Einweisung.

In besonderer Weise möchte ich vor allem meinen **Eltern** danken, die meinen großen Lebensraum, Ärztin zu werden, mitgetragen, mich bedingungslos finanziell unterstützt und emotional auf diesem Weg begleitet haben, obwohl ich es ihnen nicht immer leicht gemacht habe.

Mein abschließender Dank gilt der **Congregatio Jesu** in **Meran**, namentlich der Oberin **Sr. Cristina Irsara**, die mir durch Unterkunft und vorzügliche Verpflegung optimale Bedingungen für die Arbeit an meiner Promotion zur Verfügung gestellt hat.