

# **Rolle der Nrf2-Aktivierung bei Aldosteron-induzierter Nierenschädigung**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Ronja Brinks**  
geb. Balhorn  
aus Remscheid

Düsseldorf, Januar 2023

aus dem Institut für Toxikologie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und des Universitätsklinikums Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. Nicole Schupp

2. Prof. Dr. Stephanie Lärer

Tag der mündlichen Prüfung: 23.05.2023

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Zusammenhang von Hypertonie und chronischer Niereninsuffizienz	1
1.2 Anatomie und Physiologie der Niere	2
1.3 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)	3
1.4 Das Steroidhormon Aldosteron	5
1.4.1 Klassische Aldosteron-induzierte Signalwege	5
1.4.2 Nicht-klassische Aldosteron-induzierte Signalwege	6
1.5 Pathophysiologie von Aldosteron	8
1.5.1 Aldosteron-induzierter oxidativer Stress	9
1.5.1.1 Die Entstehung von oxidativem Stress	9
1.5.2 Aldosteron-induzierte Inflammation und Fibrose	11
1.5.3 Aldosteron-induzierte glomeruläre Schädigung	12
1.6 Antioxidative Abwehrmechanismen	13
1.7 Der Transkriptionsfaktor Nrf2	14
1.7.1 Regulation von Nrf2	15
1.7.2 Nrf2-abhängige Transkription von antioxidativen Enzymen	17
1.7.3 Nrf2-Aktivatoren in der Therapie für chronische Niereninsuffizienz	18
<b>2. Zielsetzung</b>	<b>20</b>
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>22</b>
3.1 Material	22
3.1.1 Herstellernachweise	22
3.1.2 Versuchstiere	23
3.1.3 Geräte	24
3.1.4 Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	25
3.1.5 Lösungen und Puffer	25
3.1.6 Kits und Assays	26
3.1.7 Antikörper	27
3.1.7.1 Primärantikörper	27
3.1.7.2 Sekundärantikörper	28
3.1.8 Oligonukleotide	28
3.1.9 Software	29
3.2 Methoden	30
3.2.1 Dosisversuch zur Lokalisation der Nrf2-Aktivierung und Ald-induzierter Nierenschäden	30
3.2.2 Protektionsversuch zur Untersuchung der Relevanz der Nrf2-Aktivierung in der Protektion vor Aldosteron verursachten Nierenschäden	31

3.2.3	Semiquantitative Untersuchungen der Nierenmorphologie / Histopathologie...	33
3.2.3.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	33
3.2.3.2	Periodjodsäure-Schiff-Färbung.....	33
3.2.3.3	Sirius-Rot-Färbung.....	34
3.2.3.4	Tubulointerstitieller Schädigungsindex (TSI) .....	34
3.2.3.5	Glomeruloskleroseindex (GSI) und Mesangiolyseindex (MSI) .....	35
3.2.4	Immunhistochemie .....	36
3.2.4.1	Visualisierung mittels Avidin-Biotin-Komplex .....	36
3.2.4.2	Visualisierung mittels Tyramid-Signal-Amplifikation.....	37
3.2.4.3	Immunhistochemische Doppelfärbung .....	38
3.2.4.4	Detektion von 8-oxodG mittels TSA-Amplifizierung .....	39
3.2.4.5	Quantifizierung .....	40
3.2.5	Dihydroethidium-Färbung.....	40
3.2.6	TUNEL-Assay .....	40
3.2.7	Kolorimetrische Messung von Kreatinin.....	41
3.2.8	ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) .....	41
3.2.8.1	Sandwich-ELISA .....	42
3.2.8.1.1	Albumin-Bestimmung im Urin.....	42
3.2.8.1.2	NGAL-Bestimmung im Urin .....	43
3.2.8.1.3	KIM-1-Bestimmung im Urin .....	43
3.2.8.1.4	Bestimmung von $\alpha$ -Glutathion-S-Transferase in der Niere .....	43
3.2.8.1.5	Bestimmung von Glutathion-S-Transferase Pi in der Niere .....	44
3.2.8.2	Kompetitiver ELISA.....	44
3.2.8.2.1	Bestimmung von Aldosteron im Serum .....	45
3.2.8.2.2	Bestimmung von 8-OHdG im Urin.....	45
3.2.8.2.3	Bestimmung von 15-Isoprostan F <sub>2t</sub> im Urin.....	45
3.2.9	Molekularbiologische Methoden .....	46
3.2.9.1	RNA-Extraktion .....	46
3.2.9.2	cDNA-Synthese.....	46
3.2.9.3	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion.....	47
3.2.9.4	Genotypisierung der transgenen Mäuse.....	48
3.2.10	Proteinbiochemische Methoden .....	51
3.2.10.1	Proteinisolierung .....	51
3.2.10.2	Präparation von Kern/Cytosol-Proteinextrakten.....	52
3.2.10.3	Gelelektrophorese zur Auftrennung von Proteinen - SDS-PAGE.....	53
3.2.10.4	Western Blot .....	53
3.2.11	Phospho-Kinase Array .....	53
3.2.12	Messung inflammatorischer Zytokine mittels LEGENDplex™.....	55
3.2.13	Statistik .....	56

<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>57</b>
<b>4.1 Dosisfindung und Lokalisation der Nrf2-Aktivierung und Aldosteron-induzierter Nierenschäden .....</b>	<b>57</b>
4.1.1 Blutdruckverlauf während der Aldosteron-Behandlung .....	57
4.1.2 Gewichtsparameter nach Aldosteron-Behandlung.....	58
4.1.3 Nierenfunktionsparameter nach Aldosteron-Behandlung.....	58
4.1.4 Veränderung der Nierenmorphologie nach Aldosteron-Behandlung .....	59
4.1.4.1 TSI .....	59
4.1.4.2 GSI/MSI .....	61
4.1.5 Untersuchung inflammatorischer Zytokine nach Aldosteron-Behandlung .....	62
4.1.6 Einfluss auf die Expression von ENaC, einem klassisch Aldosteron-regulierten Gen	64
4.1.7 Effekt einer Aldosteron-Behandlung auf die Produktion von oxidativem Stress	64
4.1.8 Induktion von DNA-Schäden nach Aldosteron-Behandlung.....	68
4.1.9 Lokalisation der Aldosteron-induzierten DNA-Schäden in der Niere .....	72
4.1.10 Einfluss einer Aldosteron-Behandlung auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 .....	74
4.1.10.1 Nrf2-Expression in der Niere .....	74
4.1.10.2 Translokation des phosphorylierten und somit aktivierten Nrf2.....	75
4.1.10.3 Lokalisation der Nrf2-Aktivierung.....	77
4.1.11 Effekt der Aldosteron-Behandlungen auf die Expression von Nrf2-regulierten Zielgenen und -proteinen.....	79
4.1.12 Effekt einer Aldosteron-Behandlung auf die Keap1 unabhängige Regulation von Nrf2	81
<b>4.2 Protektionsversuch zur Untersuchung der Relevanz der Nrf2-Aktivierung in der Protektion von Aldosteron-induzierten Nierenschäden .....</b>	<b>86</b>
4.2.1 Einfluss von Nrf2 und Aldosteron auf den Blutdruck .....	86
4.2.2 Einfluss der Nrf2-Aktivität und Aldosteron auf Gewichtsparameter .....	88
4.2.3 Einfluss von Nrf2-Aktivität und Aldosteron auf Nierenfunktionsparameter .....	89
4.2.4 Einfluss der Nrf2-Aktivität und Aldosteron auf die Nierenmorphologie .....	91
4.2.4.1 TSI .....	91
4.2.4.2 GSI/MSI .....	93
4.2.5 Untersuchung von klassisch Ald-regulierten Genen und Proteinen .....	94
4.2.6 Einfluss von Nrf2-Aktivierung und Aldosteron auf die Produktion von oxidativem Stress	96
4.2.7 Einfluss von Nrf2-Aktivierung und Aldosteron auf die Induktion von DNA-Schäden	98
4.2.8 Untersuchungen zur Keap1-abhängigen Nrf2-Regulation und Aktivierung von Nrf2	99
4.2.8.1 Expression von Keap1 .....	100

4.2.8.2	Expression und Anwesenheit von Nrf2.....	101
4.2.8.3	Phosphorylierung und Translokation von Nrf2.....	102
4.2.9	Lokalisation der Ald-induzierten Schädigung und Nrf2-Akkumulierung.....	105
4.2.10	Untersuchungen zur Expression von Nrf2-regulierten Zielgenen und -proteinen	108
4.2.11	Untersuchungen zur Keap1-unabhängigen Nrf2-Regulation.....	112
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>117</b>
<b>5.1</b>	<b>Erhöhte Ald-Konzentrationen führen zu moderaten Nierenschäden.....</b>	<b>117</b>
5.1.1	Erhöhte Ald-Konzentrationen induzieren keine konstante Hypertonie in Wildtyp-Mäusen	117
5.1.2	Eine Ald-Infusion führt zu einer moderaten Schädigung der Nierenfunktion und pathologischen Veränderungen in der Niere.....	119
5.1.3	Ald verursacht systemischen oxidativen Stress und lokale oxidative Schäden in der Niere .....	120
5.1.4	Erhöhte Ald-Konzentrationen führen nicht zu einer vollständigen Aktivierung des Nrf2-Signalwegs .....	122
5.1.5	Ald-induzierte DNA-Schäden und die Aktivierung von Nrf2 sind primär im distalen Tubulus und Sammelrohr lokalisiert .....	125
<b>5.2</b>	<b>Relevanz einer Nrf2-Aktivierung in der Protektion vor Ald-induzierten Nierenschäden .....</b>	<b>127</b>
5.2.1	Eine geringere Keap1-Expression führt zu einer Aktivierung des Nrf2-Signalweges.....	128
5.2.2	Eine konstitutive Nrf2-Aktivierung verhindert Ald-induzierte Änderungen des Blutdrucks .....	136
5.2.3	Eine konstitutive Nrf2-Aktivierung schützt vor Ald-induzierten Schäden nur in den Nierentubuli .....	138
5.2.4	Ald-induzierter oxidativer Stress kann über eine konstitutive Nrf2-Aktivierung nicht verhindert werden .....	142
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>145</b>
<b>7.</b>	<b>Summary .....</b>	<b>147</b>
<b>8.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>149</b>
<b>9.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>152</b>
<b>10.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>162</b>
<b>10.1</b>	<b>Weiterführende Daten zum Dosisversuch zur Lokalisation der Nrf2-Aktivierung und Ald-induzierter Nierenschäden .....</b>	<b>162</b>
10.1.1	Weiterführende Untersuchungen zur DNA-Reparatur.....	162
10.1.2	Weiterführende Daten zur Identifizierung Aldosteron-induzierter Signalwege	163
<b>10.2</b>	<b>Weitere Daten zum Protektionsversuch zur Untersuchung der Relevanz der Nrf2-Aktivierung in der Protektion von Aldosteron-induzierten Nierenschäden.....</b>	<b>165</b>
10.2.1	Ergebnisse zur Untersuchung des Einflusses von Salz-haltigem Trinkwasser in den Nrf2 <sup>↑</sup> -Mäusen.....	165

10.2.2	Weiterführende Daten zur Nierenmorphologie.....	169
10.2.3	Weiterführende Daten zum Nachweis von DNA-Schäden .....	170
10.2.3.1	Weiterführende Abbildungen zur Expression von Nrf2 .....	170
10.2.4	Weiterführende Abbildungen zur Phosphorylierung und Translokation von Nrf2 171	
10.2.5	Weiterführende Abbildungen zur Lokalisierung der Nrf2-Aktivierung .....	172
10.2.6	Weiterführende Abbildungen zur Expression von Nrf2-regulierten Zielgenen und -proteinen .....	173
<b>10.3</b>	<b>Publikationen und Kongressbeiträge .....</b>	<b>174</b>
10.3.1	Liste der Publikationen von Erst-Autorenschaften .....	174
10.3.2	Liste der Publikationen weiterer Autorenschaften.....	175
10.3.3	Liste der Kongressteilnahmen .....	175
10.3.3.1	Vorträge .....	175
10.3.3.2	Posterpräsentationen .....	176
<b>11.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>177</b>
<b>12.</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>179</b>

## 1. Einleitung

### 1.1 Zusammenhang von Hypertonie und chronischer Niereninsuffizienz

Von 1980 bis 2008 ist die Anzahl an hypertensiven Patienten von 600 Millionen auf 1 Milliarde weltweit angestiegen [1]. Laut einer in 2015 durchgeführten Studie leidet in Deutschland fast jeder dritte Erwachsene an Hypertonie (Bluthochdruck), wobei die Prävalenz mit steigendem Alter zunimmt [2]. Hypertonie wird definiert durch einen systolischen Blutdruck von über 140 mmHg und einen diastolischen Blutdruck von 90 mmHg [1]. Zu den Risikofaktoren, Bluthochdruck zu entwickeln, gehören neben verhaltensbedingten Faktoren wie Rauchen, Alkohol, ungesunder Ernährung und Inaktivität auch metabolische Risikofaktoren wie Übergewicht, Diabetes und hohe Cholesterinwerte. Hierbei ist nicht auszuschließen, dass metabolische Faktoren auch aus den verhaltensbedingten resultieren können [1, 3]. Erhöhter Blutdruck kann außerdem zu Herz-Kreislaufkrankungen und Niereninsuffizienz führen. 70 % der an moderater chronischer Niereninsuffizienz (*Chronic Kidney Disease*, CKD) erkrankten Patienten in Deutschland leiden auch an Bluthochdruck. Die Prävalenz hierfür steigt mit dem Voranschreiten der Erkrankung [4].

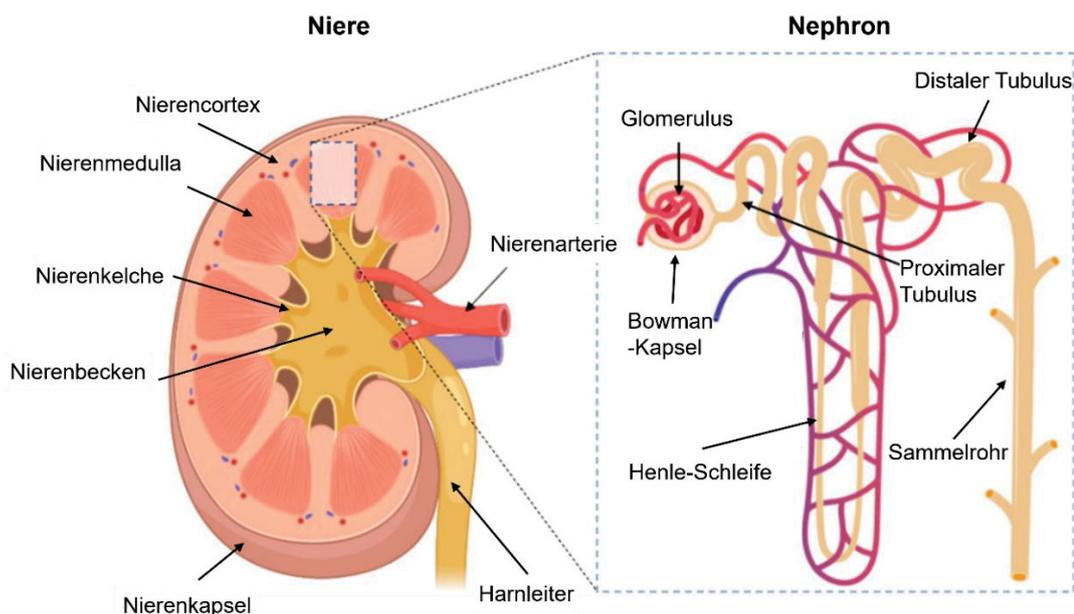
Hypertonie und Diabetes gelten als Hauptrisikofaktoren für die Entstehung von CKD. Als CKD wird ein kontinuierlicher voranschreitender Verlust der Nierenfunktion bezeichnet, der mindestens über drei Monate andauert. Hierbei wird die Nierenfunktion über die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) oder über den Nachweis von Markern für Nierenschäden im Urin, wie z.B. Albumin, bestimmt. Es gibt nicht viele therapeutische Optionen, um das Voranschreiten der CKD zu verlangsamen. Nach den Therapieleitlinien des *Kidney Disease: Improving Global Outcomes* (KDIGO)-Netzwerkes ist das erste Therapieziel bei hypertensiven CKD-Patienten das Erreichen von systolischen Blutdruckwerten unter 120 mmHg [5]. Standardtherapie ist hierbei die Anwendung von Inhibitoren des Blutdruckregulierenden Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) [5, 6]. Inhibitoren des Angiotensin-Konversions-Enzyms (ACE) oder Angiotensin II-Rezeptor-Blocker (ARB) tragen nicht nur zu einer Reduzierung des Blutdrucks bei, sondern wirken auch entzündungshemmend und antifibrotisch. Diese Effekte können über die Reduzierung der Effektor-Hormone des RAAS, Angiotensin II (Ang II) und Aldosteron (Ald), erklärt werden. Der Einfluss von Ald auf das Voranschreiten einer CKD konnte nach einem Einsatz von Ald-Rezeptor-Inhibitoren bereits gezeigt werden. So kam es nach Anwendung dieser zu einer Verringerung der nachgewiesenen Proteinurie und die Progression der Insuffizienz konnte verlangsamt werden [7, 8]. Jedoch erreichen nur etwa 50 % der behandelten hypertensiven CKD-Patienten einen systolischen Blutdruck von unter 140 mmHg [4]. Dies

unterstreicht die Notwendigkeit der Forschung an neuen therapeutischen Optionen bei Ald-induzierter Nierenschädigung.

## 1.2 Anatomie und Physiologie der Niere

Die Niere ist ein bohnenförmiges Organ, welches paarweise beiderseits der Wirbelsäule zwischen den zwölften Brust- und dritten Lendenwirbeln angelegt ist. Eine der wichtigsten Aufgaben der Nieren ist die Regulierung des Flüssigkeits- und Elektrolythaushaltes sowie die Aufrechterhaltung des Säure-Base-Haushaltes. Diese Funktionen der Nieren werden durch den Ionen- und Wassertransport, die Exkretion von Endprodukten des Stoffwechsels aus dem Blut in den Urin und der Rückresorption von Nährstoffen gewährleistet. Die Niere ist von einer fasrigen Kapsel umhüllt und kann makroskopisch in zwei Bereiche eingeteilt werden: den äußeren Nierencortex (Nierenrinde) und die innere pyramidenförmig angelegte Nierenmedulla (Nierenmark). Die Nierenpyramiden der Medulla münden in die Nierenkelche, welche sich im Verlauf zum Nierenbecken zusammenschließen (Abbildung 1.1) [9].

Die funktionelle Einheit der Niere ist das Nephron, von dem in einer Niere über eine Million vorzufinden sind. Das Nephron übernimmt die Produktion des Urins und besteht aus der Bowman-Kapsel, welche den Glomerulus umschließt, und dem anschließenden Tubulussystem. Das Tubulussystem beginnt mit dem proximalen Tubulus, dieser geht über in die Henle-Schleife, den distalen Tubulus und schließt mit dem Sammelrohr ab (Abbildung 1.1) [10].



**Abbildung 1.1: Anatomie der Niere und des Nephrons.** Die Niere wird von der Nierenkapsel umhüllt und kann makroskopisch in den äußeren Nierencortex und die pyramidenförmig angelegte Nierenmedulla eingeteilt werden. Die Nierenpyramiden münden in die Nierenkelche, welche sich als Nierenbecken zusammenschließen. Der Harnleiter verbindet die Nieren mit der Harnblase. Das Nephron ist die funktionelle Einheit der Niere und produziert den Urin. Die Bowman-Kapsel umschließt den Glomerulus. An die Bowman-Kapsel schließt das Tubulussystem an, welches mit dem proximalen Tubulus beginnt. Die Henle-Schleife folgt und geht in den distalen Tubulus über. Anschließend folgt als letzter Teil des Tubulussystems das Sammelrohr. Modifiziert nach Adhipandito *et al.* (2021) [11].

Die Bildung des Urins beginnt im Glomerulus. Bei der glomerulären Filtration des Blutes werden größere Moleküle, wie Eiweiße, zurückgehalten, während kleine Moleküle, wie Glukose, Aminosäuren und Elektrolyte, in den Innenraum der Bowman-Kapsel gepresst werden. Die Filtrationsbarriere besteht dabei aus dem fenestrierten Endothel der Kapillaren, der glomerulären Basalmembran und den Podozyten. Der entstandene Primärharn wird anschließend in das Tubulussystem weitergeleitet. Im Tubulussystem werden die gefilterten und wertvollen Substanzen sowohl aktiv als auch passiv zurückgewonnen. Dabei wird im proximalen Tubulus ein Großteil der filtrierten Substanzen und Wasser rückresorbiert, während metabolische Stoffwechselprodukte weiter im Tubuluslumen verbleiben. Das Filtrat wird in die Henle-Schleife, den distalen Tubulus und schließlich in das Sammelrohr geleitet und auf seinem Weg weiter konzentriert, sodass schließlich nur noch ein Prozent des Primärharns als Sekundärharn in die Harnblase fließt [9].

Die Rückresorption des Wassers im distalen Tubulus und Sammelrohr kann durch das antidiuretische Hormon (ADH) und Ald beeinflusst werden. Die Sekretion von ADH aus der Hypophyse wird dabei vom Hypothalamus gesteuert. Eine Sekretion von ADH führt zu einer erhöhten Rückresorption von Wasser im distalen Tubulus und Sammelrohr durch eine Erhöhung der Permeabilität [12]. Das Mineralkortikoid Ald spielt nicht nur eine wichtige Rolle in der Regulation des Wasser-, sondern auch des Elektrolythaushaltes. Erhöhte Konzentrationen führen zu einer erhöhten Rückresorption von Natrium und Wasser sowie einer Exkretion von Kalium. Ald fungiert als Effektor des RAAS, auf das im Folgenden noch näher eingegangen wird [13, 14]. Erhöhte Spiegel dieser Hormone können so zu einem erhöhten Blutdruck durch Anstieg des Blutvolumens beitragen.

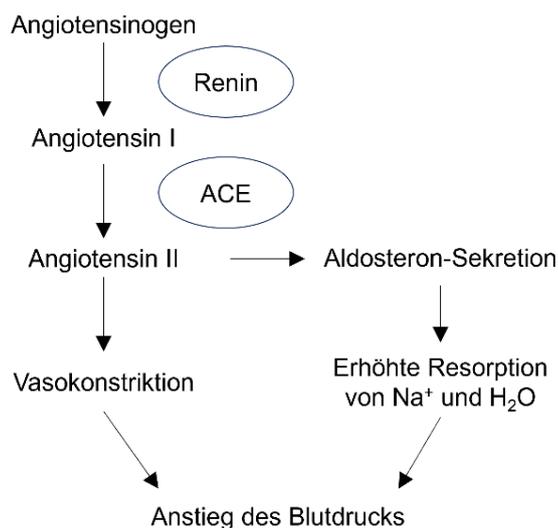
### **1.3 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)**

Das RAAS ist eine hormonelle Kaskade zur Regulation des Blutdrucks sowie des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes. Aktiviert wird das RAAS bei einer Verminderung des Blutdrucks und Blutvolumens, Veränderungen im Elektrolythaushalt oder einer Aktivierung des sympathischen Nervensystems [15].

Am Anfang des Signalweges steht die Freisetzung des Enzyms Renin. Dies ist auch der geschwindigkeitsbestimmende Schritt dieser Kaskade. Renin wird in den juxtaglomerulären Zellen der afferenten Arteriole der Niere zunächst als Prorenin synthetisiert und nach Abspaltung von zwei Peptiden in das Plasma sekretiert [16, 17]. Das freie aktive Renin spaltet das Vorläuferprotein Angiotensinogen zu Angiotensin I. Der primäre Syntheseort von Angiotensinogen ist die Leber, von der es konstitutiv in das Plasma sekretiert wird. Unter normalen physiologischen Bedingungen ist daher der Plasmaspiegel von Angiotensinogen konstant [18]. Das biologisch inaktive Angiotensin I wird von ACE in das aktive Ang II umgewandelt. Dabei werden über Hydrolyse zwei Aminosäuren am C-Terminus des Dekapeptids Angiotensin I abgespalten und es entsteht das Octapeptid

Ang II. ACE ist eine membrangebundene Exopeptidase und wird vermehrt in der Lunge gebildet. Ang II ist der Effektor dieser Kaskade und wirkt über die Bindung an die Rezeptoren Ang II-Rezeptor-Typ 1 (AT1R) und Ang II-Rezeptor-Typ 2 (AT2R). Die Vasokonstriktion, sowie weitere physiologische Effekte werden jedoch über AT1R vermittelt [18-20]. Ebenso führt die Rezeptorbindung zu einer erhöhten Synthese und Freisetzung von Ald aus der *Zona glomerulosa* der Nebennierenrinde [21, 22]. Diese erhöhte Ald-Sekretion führt zu einer Erhöhung der Natrium (Na<sup>+</sup>)- und Wasser-Resorption und einer Ausscheidung von Kalium im distalen Tubulus und Sammelrohr. Dies trägt zu einem Anstieg des Blutvolumens und des Blutdrucks bei (Abbildung 1.2) [13]. Über eine negative Rückkopplung wird eine Dauerstimulation des Systems verhindert.

Neben dem systemischen RAAS gibt es in vielen Organen, wie in der Niere, dem Herz und in Blutgefäßen, auch ein lokales RAAS. Voraussetzung hierfür ist, dass alle Komponenten in diesem Organ auch exprimiert werden [19].



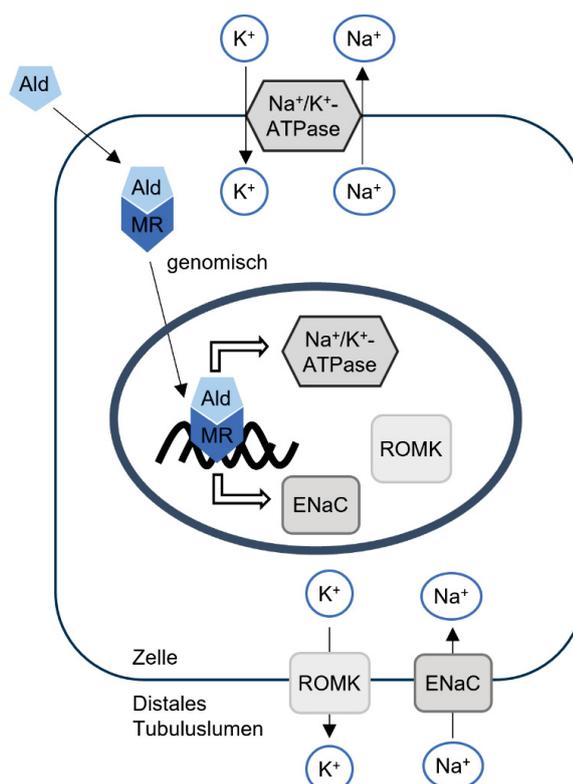
**Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems.** Renin wird aus der Niere in das Plasma sekretiert und gelangt somit in den Blutkreislauf. Angiotensinogen wird von Renin in das biologisch inaktive Angiotensin I umgewandelt, welches im weiteren Verlauf über ACE zu Angiotensin II (Ang II) gespalten wird. Die Bindung des aktiven Peptids Ang II an seinen Typ I-Rezeptor führt zu einer Vasokonstriktion und so zu einem Anstieg des Blutdrucks. Ang II bewirkt außerdem die Synthese und Freisetzung von Aldosteron. Die durch Aldosteron vermittelte Natrium- und Wasserresorption trägt zu einem Anstieg des Blutdrucks bei. Modifiziert nach Atlas (2007) [20].

## 1.4 Das Steroidhormon Aldosteron

Ald wird ausgehend von Cholesterin in der *Zona glomerulosa* in der Nebennierenrinde synthetisiert. Es ist ein endogenes Steroidhormon und zählt zu den Mineralkortikoiden, da es nicht nur an der Regulation des Wasser-, sondern auch des Elektrolythaushaltes beteiligt ist. Induziert wird die Freisetzung und Synthese von Ald – wie bereits in 1.3 beschrieben – durch Ang II. Jedoch wird die Freisetzung von Ald auch durch Hyponatriämie, Hyperkaliämie und das Adrenocorticotrope Hormon (ACTH) stimuliert [23-25]. Ald-induzierte Effekte werden über die Bindung an den cytosolischen Mineralkortikoidrezeptor (MR) vermittelt [25].

### 1.4.1 Klassische Aldosteron-induzierte Signalwege

Die klassischen physiologischen Effekte von Ald werden über die Bindung an den cytosolischen MR im distalen Nephron vermittelt [26]. Der MR ist ein Liganden-abhängiger und somit aktivierbarer Transkriptionsfaktor, der aus einer DNA-bindenden, Liganden-bindenden und N-terminalen Domäne besteht [27]. Im Cytosol ist der MR an Chaperone, wie das *Heat shock protein 90* (Hsp90), gebunden. Die Bindung des Liganden Ald führt zu einer Dimerisierung und Translokation des Komplexes in den Zellkern. Über die Bindung an hormonresponsive Elemente (HRE) in der Promotorregion von Zielgenen wird die Transkription dieser aktiviert [28]. Eine Ald-Bindung an den MR führt so zu einer erhöhten Expression des epithelialen Natriumkanals (*epithelial sodium channel*, ENaC), des ROMK (*renal outer medullary K<sup>+</sup> channel*) und der Natrium-Kalium-Adenosintriphosphatase (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase) in den epithelialen Zellen des distalen Tubulus (Abbildung 1.3). Die Regulation dieser Zielgene führt zu den klassischen und genomischen Effekten von Ald: der gesteigerten Resorption von Natrium und Wasser in die Kapillaren oder das Interstitium sowie der gesteigerten Exkretion von Kalium in das Tubuluslumen des distalen Nephrons [29-32]. So kommt es, wie in 1.3 beschrieben, zu einem Ald-induzierten Anstieg des Blutvolumens und Blutdrucks.



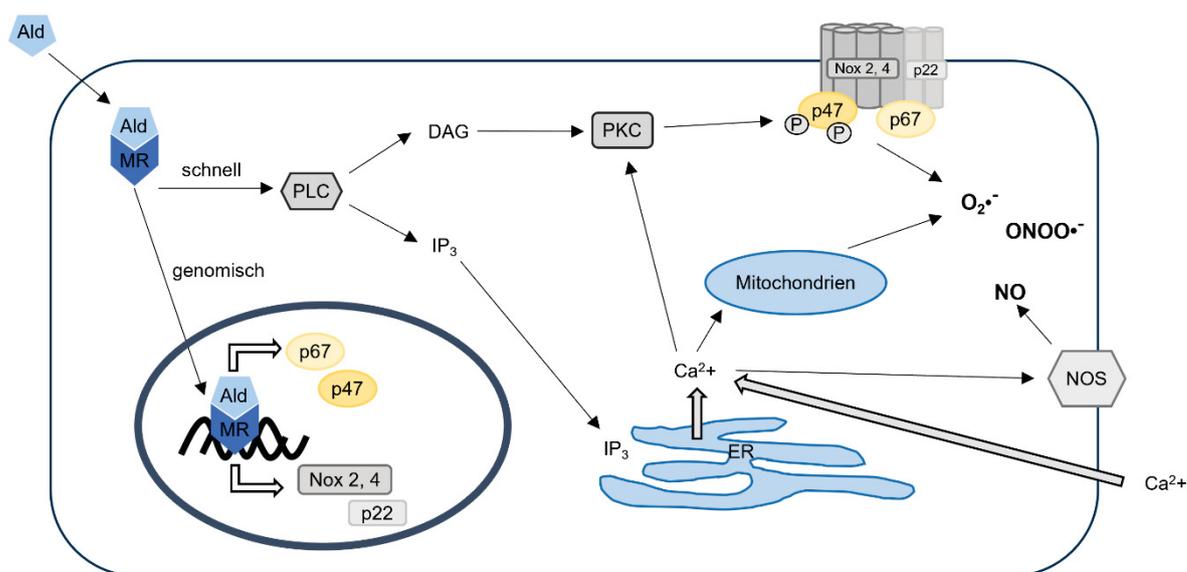
**Abbildung 1.3: Klassischer Signalweg von Aldosteron.** Nach der Bindung des Liganden Ald an den MR kommt es zu einer Translokation des Komplexes in den Nucleus. Die Bindung an die Promoterregion des ENaC, des ROMK und der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase führt zu einer gesteigerten Expression dieser Zielgene. Das resultiert in einer gesteigerten Resorption von Natrium aus dem distalen Tubuluslumen in die Kapillaren und einer gesteigerten Exkretion von Kalium in das distale Tubuluslumen. Ald: Aldosteron, ENaC: epithelialer Natriumkanal, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase: Natrium-Kalium-Adenosintriphosphatase, ROMK: *renal outer medullary K<sup>+</sup> channel*. Modifiziert nach Queisser und Schupp (2012) [33].

#### 1.4.2 Nicht-klassische Aldosteron-induzierte Signalwege

Eine Erhöhung im Proteingehalt der in 1.4.1 beschriebenen Zielgene konnte erst 5-6 h nach einer Ald-Behandlung nachgewiesen werden [34, 35]. Nachgewiesene frühere Auswirkungen von Ald können über diesen klassischen Signalweg nicht erklärt werden [35, 36]. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Ald innerhalb kürzester Zeit auch nicht-genomische Signalwege induziert (Abbildung 1.4). Dabei spielen die sekundären Botenstoffe zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), Calcium (Ca<sup>2+</sup>), Diacylglycerin (DAG) und Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) eine zentrale Rolle [37-40].

Eine Bindung von Ald an den MR verursacht über unbekannte Mechanismen eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC) [41]. Die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat über die PLC führt so zu einer Bildung der sekundären Botenstoffe IP<sub>3</sub> und DAG [41, 42]. IP<sub>3</sub> führt zu einer Steigerung des Ca<sup>2+</sup>-Gehalts im Cytosol. Dabei kommt es zu einer Entlassung von Ca<sup>2+</sup> aus internen Speichern, wie dem Endoplasmatischen Retikulum (ER). Dies wiederum führt zu einer Öffnung der Ca<sup>2+</sup>-Kanäle und einem Einstrom aus dem extrazellulären Raum [43, 44]. Die gestiegene Ca<sup>2+</sup>-Konzentration stimuliert die Mitochondrien zu einer Produktion von Superoxid (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>). Sowohl DAG als auch Ca<sup>2+</sup> können

folgend die Proteinkinase C (PKC) aktivieren [45]. Die nun aktive PKC phosphoryliert die cytosolische Untereinheit der NADPH-Oxidase 2 (NOX2) p47phox [46, 47]. Dies aktiviert die NOX2 und ihre membrangebundene Untereinheit Nox2, was zu einer zusätzlichen Produktion von  $O_2^{\bullet-}$  führt [48]. Aufgrund dessen kommt es zu einer erhöhten Exposition von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Zusätzlich wird über  $Ca^{2+}$  die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) aktiviert, welche Stickstoffmonoxid (NO) produziert [44].  $O_2^{\bullet-}$  kann mit NO zu Peroxinitrit-Anionen ( $ONOO^-$ ) und weiteren reaktiven Stickstoffverbindungen (RNS) reagieren [49]. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnte in vorangegangenen Studien eine erhöhte Menge von ROS und RNS nach einer Ald-Behandlung nachgewiesen werden [50-55]. Neben der Aktivierung dieser nicht-klassischen Signalwege und Effekte induziert Ald über die Bindung an den MR die Transkription weiterer Gene (Abbildung 1.4). So konnte bereits gezeigt werden, dass eine Ald-Exposition die Expression verschiedener Untereinheiten der Nox 2 und 4 induziert. Welche Untereinheiten dabei exprimiert werden ist sowohl Gewebe-, als auch Zellspezifisch [44, 56-59].



**Abbildung 1.4: Nicht klassische Aldosteron-induzierte Signalwege.** Nach der Bindung des Liganden Ald an den MR aktiviert der Komplex schnell die PLC und es kommt über diese zu einer Produktion der sekundären Botenstoffe DAG und IP<sub>3</sub>. DAG stimuliert die PKC, welche wiederum die NOX-Untereinheit p47 phosphoryliert. Dies aktiviert die NOX mit ihren Untereinheiten Nox 2 oder 4, p22, p47 und p67. Die aktivierte NADPH-Oxidase produziert O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. IP<sub>3</sub> induziert den Ca<sup>2+</sup>-Ausstrom aus intrazellulären Speichern wie dem ER in den intrazellulären Raum. Dies führt zusätzlich zu einem Einstrom von Ca<sup>2+</sup> aus dem extrazellulären Raum. Ca<sup>2+</sup> aktiviert als sekundärer Botenstoff die PKC und stimuliert Mitochondrien zur O<sub>2</sub><sup>•-</sup>-Produktion. Die ebenfalls über Ca<sup>2+</sup> aktivierte NOS bildet vermehrt NO, welches mit O<sub>2</sub><sup>•-</sup> zu ONOO<sup>-</sup> reagieren kann. Als nicht-klassischer genomischer Effekt induziert der Ald-MR-Komplex die Expression der verschiedenen NADPH-Oxidase-Untereinheiten. Ald: Aldosteron, DAG: Diacylglycerin, ER: Endoplasmatisches Retikulum, IP<sub>3</sub>: Inositoltriphosphat, MR: Mineralcorticoidrezeptor, NO: Stickstoffmonoxid, NOS: Stickstoffmonoxid-Synthase, Nox: NADPH-Oxidase, O<sub>2</sub><sup>•-</sup>: Superoxid, ONOO<sup>-</sup>: Peroxinitrit-Anion, PKC: Proteinkinase C, PLC: Phospholipase C. Abbildung modifiziert nach Queisser und Schupp (2012) [33].

## 1.5 Pathophysiologie von Aldosteron

Ein erhöhter Ald-Spiegel spielt bei der Entwicklung von Bluthochdruck, kardiovaskulären und renalen Krankheiten eine wichtige Rolle [60-62]. Eine vermehrte Bildung von Ald wird als Hyperaldosteronismus bezeichnet. Dabei wird zwischen einem primären und sekundären Hyperaldosteronismus unterschieden. Beim primären Hyperaldosteronismus wird in der Nebennierenrinde zu viel Ald produziert, unabhängig von der Stimulation über das RAAS. In den meisten Fällen wird dies über eine idiopathische bilaterale Hyperplasie verursacht. In etwa einem Drittel der Fälle sind Ursachen wie Adenome, Karzinome oder genetische Defekte die Ursache der Überproduktion. Im sekundären Hyperaldosteronismus kommt es aufgrund einer Überstimulation des RAAS zu einem erhöhten Ald-Spiegel [63]. Erhöhte Ald-Konzentrationen im Plasma tragen nachweislich zu der Entwicklung von Bluthochdruck bei. In 8-13 % der Patienten mit arterieller Hypertonie ist Hyperaldosteronismus die Ursache des erhöhten Blutdrucks [64-66]. Außerdem konnte in etwa 20 % der Patienten mit essenzieller Hypertonie eine höhere Ald-Spiegel im Blut nachgewiesen werden [67]. In klinischen Studien mit Patienten, die an Herzinsuffizienz litten, konnte durch eine Behandlung mit MR-Inhibitoren die Mortalitätsrate um 15-30 % gesenkt werden [68-70]. Dies unterstreicht die tragende Rolle von Ald in kardiovaskulären Erkrankungen. Zusätzlich können erhöhte Ald-Spiegel zu einer Entwicklung und Progression von CKD führen. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass bei Patienten die an einem primären Hyperaldosteronismus, einer CKD oder einer diabetischen Nephropathie erkrankt sind, ein gesteigerter Ald-Spiegel mit einer gesteigerten Proteinexkretion im Urin und einer Senkung der GFR korrelieren [71-73]. In Studien mit Ratten führte eine chronische Ald-Behandlung in Kombination mit salzigem Trinkwasser zu einer Induktion von Proteinurie, glomerulären und tubulointerstitiellen Schäden [74-77]. In weiteren vorrangegangenen tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass erhöhte Ald-Konzentrationen über renale Inflammation, oxidativen Stress, Fibrose, mesangiale Zellproliferation und Podozytenschädigung, zu Nierenschädigungen führen (Abbildung 1.5) [58, 74, 76, 77]. Die Abhängigkeit dieser induzierten Schäden von der MR-Bindung konnte über die Verwendung von MR-Antagonisten bereits gezeigt werden [77, 78].



**Abbildung 1.5: Schematische Darstellung von Aldosteron-induzierten Effekten, die mit den pathologischen Veränderungen in der Niere assoziiert sind.** Erhöhte Ald-Spiegel in der Niere führen über eine erhöhte Expression verschiedener Natriumkanäle wie ENaC, ROMK und Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase zu einer erhöhten Resorption von Wasser und Natrium und letztendlich zu Bluthochdruck. Weiterhin kommt es zu einer erhöhten Aktivität der NADPH-Oxidasen und einer damit verbundenen erhöhten Produktion von ROS und RNS. Ein erhöhtes Ald-Level führt ebenso zu einer erhöhten Infiltration und Rekrutierung von Immunzellen und damit verbundener Ausschüttung von Zytokinen und fördert Entzündungsprozesse. Der oxidative Stress bedingt außerdem die Aktivierung proinflammatorischer Transkriptionsfaktoren NFκB und AP-1. Der chronische Entzündungsprozess kann über eine Ablagerung extrazellulärer Matrixproteine und erhöhter Expression des profibrotischen Faktor TGF-β zu einer Fibrose führen. Ebenso fördern mesangiale Zellproliferation und Podozytenschädigung die Dysfunktion des Glomerulus. Ald: Aldosteron, AP-1: Aktivator-Protein 1. ENaC: epithelialer Natriumkanal, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase: Natrium-Kalium-Adenosintriphosphatase, NF-κB: *Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*, RNS: Reaktive Stickstoffspezies, ROMK: *Renal outer medullary K<sup>+</sup> channel*, ROS: reaktive Sauerstoffspezies, TGF-β: *Transforming Growth Factor β* [33, 62, 79].

### 1.5.1 Aldosteron-induzierter oxidativer Stress

In der Ald-induzierten Nierenschädigung spielt die Induktion von oxidativem Stress eine wichtige Rolle. So konnte, wie bereits in 1.4.2 beschrieben, *in vitro* und *in vivo* eine erhöhte Anwesenheit von ROS und RNS nach einer Ald-Exposition in Nierenzellen nachgewiesen werden [44, 55, 77].

#### 1.5.1.1 Die Entstehung von oxidativem Stress

Als oxidativer Stress wird das Ungleichgewicht von Oxidantien zu Antioxidantien definiert, wobei die Produktion der ROS über das antioxidative Abwehrsystem nicht mehr aufgefangen werden kann [80, 81]. Jedoch sind reaktive Spezies unter normalen physiologischen Bedingungen nicht schädlich für die Zelle und erfüllen wichtige Funktionen. Sie fungieren in moderaten Konzentrationen als sekundäre Botenstoffe, regulieren intrazelluläre Signale und haben beispielsweise Einfluss auf die Immunantwort, Zellwachstum, Apoptose, Zell- und Flüssigkeitshomöostase [82, 83].

Ein Ungleichgewicht in der Redox-Homöostase führt jedoch zu Schäden an Proteinen, Lipiden und der DNA [80, 81]. Aufgrund dessen sind eine erhöhte Produktion von ROS und oxidativer Stress assoziiert mit der Pathogenese vieler Krankheiten, wie Alzheimer,

Parkinson und kardiovaskulären Krankheitsbildern [84-86]. Auch konnte bereits ein Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und der Progression von CKD nachgewiesen werden [87, 88].

Der initiale Schritt für die Produktion von ROS ist die Übertragung eines Elektrons auf molekularen Sauerstoff, was zu einer Bildung von  $O_2^{\bullet-}$  führt.  $O_2^{\bullet-}$  kann jedoch nur bedingt Zellmembranen durchdringen, hat eine geringe Halbwertszeit und verursacht daher eher lokale Effekte. Jedoch wird  $O_2^{\bullet-}$  über die Superoxiddismutase (SOD) in das längerlebige und membrangängige Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) umgewandelt.  $H_2O_2$  wiederum kann über die Fenton-Reaktion zum sehr reaktiven Hydroxylradikal ( $OH^{\bullet}$ ) umgesetzt werden. Wie bereits in 1.4.2 erwähnt, kann NO mit  $O_2^{\bullet-}$  reagieren und das hochreaktive ONNO<sup>-</sup> bilden. Des Weiteren katalysieren Peroxidasen die Entstehung von hypochloriger Säure (HOCl) und Singulett-Sauerstoff ( $^1O_2$ ) aus  $H_2O_2$  [49].

ROS können im Körper aufgrund endogener und exogener Quellen entstehen. Als exogene und somit umweltvermittelte Quellen können ionisierende Strahlung wie Röntgen- oder  $\gamma$ -Strahlung, UV-Licht oder oxidierende Chemikalien in Form von Arzneimitteln, industriellen Lösungsmitteln oder Schwermetallen dienen [88]. Endogen entstehen ROS in normalen biologischen Prozessen: in der Plasmamembran, im Cytoplasma, in Peroxisomen, in Lysosomen sowie an den Membranen von Mitochondrien und dem ER. Dabei stellen die Atmungskette der Mitochondrien, die NOX, Xanthin-Oxidase (XO), Myeloperoxidase (MPO) und endotheliale NOS (eNOS) die größten endogenen Quellen dar [81, 89].

Sowohl für das renale als auch das kardiovaskuläre System sind die NOX die wichtigste Quelle für die Generierung von ROS. In mit Ald-behandelten hypertensiven Ratten konnte gezeigt werden, dass die ROS-Produktion über die NOX vermittelt wird. Die NOX konnten so als verantwortliche Enzyme für den Ald-induzierten oxidativen Stress identifiziert werden [90]. Bisher sind sieben verschiedene Isoformen der NOX bekannt (NOX1-5, Duale Oxidase 1/2). Sie sind Multiprotein-Komplexe und besitzen membranständige und cytosolische Komponenten. Ebenso bestehen sie aus einer katalytischen und mehreren regulatorischen Untereinheiten. NOX reduzieren Sauerstoff mit Hilfe von NADPH/NADH zu  $O_2^{\bullet-}$ . Die zuerst entdeckte Isoform der NOX war gp91phox, welche auch NOX2 genannt wird. Die membranständigen Untereinheiten Nox2 und p22phox bilden zusammen das Flavoprotein Cytochrom b588. Die weiteren Untereinheiten p40phox, p47phox und p67phox liegen im inaktiven Zustand im Cytoplasma vor (Abbildung 1.4). Die Phosphorylierung von p47phox führt zu einer Bindung an Nox2 und zur Rekrutierung der beiden weiteren regulatorischen Untereinheiten [91]. Eine Erhöhung der mRNA- und Proteinexpression von NOX2-Untereinheiten konnte in Studien mit hypertensiven Ratten in der Niere nachgewiesen werden [59, 92]. Ebenso nahm der Gehalt an p47phox und somit

der aktivierten NOX2-Isoform nach einer Ald-Behandlung in kultivierten proximalen Tubuluszellen zu [44].

Des Weiteren wurde auch ein höherer Proteingehalt der Nox4, einer Hauptuntereinheit der Isoform NOX4, in den Nieren hypertensiver und mit Ald infundierten Ratten nachgewiesen [93]. NOX4 ist im Gegensatz zu den anderen Isoformen konstitutiv aktiv und benötigt als regulatorische Untereinheit nur p22phox. NOX4 produziert als einzige Isoform  $H_2O_2$ , wobei auch diskutiert wird, dass wohlmöglich  $O_2^{\bullet-}$  schnell in  $H_2O_2$  umgewandelt wird [49].

### 1.5.2 Aldosteron-induzierte Inflammation und Fibrose

Ald ist auch über die Stimulierung von Entzündungsprozessen an Schäden im renalen Gewebe und im kardiovaskulären System beteiligt. Der Zusammenhang von Hypertonie und inflammatorischen Prozessen ist unumstritten, jedoch ist noch nicht eindeutig geklärt, ob Inflammation eine Folge oder die Ursache von Hypertonie ist [94]. Auch in der Progression und Entwicklung von CKD spielen inflammatorische Prozesse eine bedeutende Rolle. So konnte in einer Kohortenstudie mit CKD-Patienten gezeigt werden, dass ein Ansteigen der Biomarker für Inflammation mit einer sinkenden Nierenfunktion und einer erhöhten Albuminurie korreliert [95]. Des Weiteren konnte eine Assoziation von Ald und Inflammation in Patienten mit essenzieller Hypertonie nachgewiesen werden. So korrelierten hohe Konzentrationen von Ald im Plasma mit einer erhöhten Anzahl an zirkulierendem C-reaktiven Protein (CRP) und Leukozyten [96]. CRP spielt eine Rolle in der angeborenen Immunantwort und stimuliert die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine wie Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und von Adhäsionsmolekülen [97]. Diese beschriebenen Effekte sind MR-abhängig und konnten auch bereits in Nieren Ald-infundierter Ratten nachgewiesen werden [98]. Weiterhin führt die Aktivierung angeborener Immunzellen, wie Neutrophile und Makrophagen, zu einer vermehrten Produktion von ROS für die Immunabwehr über ihre jeweiligen NOX und trägt somit zum Ald-induzierten oxidativen Stress bei [99]. Oxidativer Stress ist die Hauptursache für endotheliale Dysfunktion, da die verfügbare Menge an NO über die Reaktion mit  $O_2^{\bullet-}$  zu ONNO $^-$  reduziert wird [100]. Weiterhin werden über den oxidativen Stress Transkriptionsfaktoren aktiviert, die Entzündungsprozesse fördern. Dazu zählt insbesondere *Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- $\kappa$ B). Der Ald/MR-Komplex induziert zusätzlich die Phosphorylierung und somit Aktivierung der Serum-Glukokortikoid-regulierten Kinase 1 (Sgk1), welche wiederum NF- $\kappa$ B aktiviert [101]. Die anhaltende Inflammation und damit einhergehende Infiltration von Immunzellen und Freisetzung von Zytokinen können zu einer interstitiellen Fibrose, Tubulusathrophie und Glomerulosklerose führen. Die renale Fibrose ist ein gemeinsamer pathologischer Befund bei vielen chronischen Nierenkrankheiten [6]. Charakteristisch für Fibrose ist eine Störung des Gleichgewichtes zwischen Matrix-Degeneration und Matrix-Synthese zu Gunsten der

Matrix-Synthese. So kommt es zu einer erhöhten Ablagerung von extrazellulären Matrixproteinen, wie Fibronectin, Kollagen und Proteoglykanen, um geschädigtes Gewebe zu ersetzen. Bei einem Fortschreiten der Fibrose kommt es zu einer Einschränkung der Organfunktionen [102]. Die Fibrose-induzierende Wirkung von Ald konnte schon in hypertensiven Ratten demonstriert werden, wo die pro-inflammatorischen und -fibrotischen Effekte mit Hilfe des selektiven MR-Blockers Eplerenon stark abgeschwächt werden konnten [98]. Die Induktion von Fibrose über Ald kann teilweise über die erhöhte Expression von *Transforming Growth Factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) erklärt werden. Eine Aktivierung von TGF- $\beta$  konnte bereits in mehreren Studien in Ratten gezeigt werden [59, 103]. TGF- $\beta$  erhöht die Kollagensynthese, reduziert die Aktivität von Metalloproteasen und induziert die Fibroblasten-Proliferation [104].

### 1.5.3 Aldosteron-induzierte glomeruläre Schädigung

Die Bestimmung der GFR ist einer der wichtigsten Parameter für die Beurteilung der Nierenfunktion in der Klinik und Definition der CKD und unterstreicht, wie bedeutend die Aufrechterhaltung der glomerulären Filtrationsbarriere für die Funktion der Nieren ist [5, 6]. Jedoch nimmt die Messung der Proteine im Urin als zusätzlicher Marker ebenfalls einen wichtigen Platz ein und wurde sogar als zusätzliches Bestimmungsmaß in die Beurteilung für die Progression der CKD aufgenommen. Meist wird hierfür das Protein Albumin im Urin bestimmt. Da nur Plasmabestandteile kleiner als 50 kDa die glomeruläre Barriere passieren können, ist Albumin mit einer Größe von 66 kDa unter normalen physiologischen Bedingungen kaum im Urin nachzuweisen [105, 106].

Eine Überaktivierung des RAAS und daraus resultierende höhere Ang II- und Ald-Spiegel können zu glomerulären Schäden führen. In klinischen Studien mit Patienten mit diabetischer und nicht-diabetischer Nephropathie führte eine Verwendung von ACE-Inhibitoren und ARB zu einer Verminderung der Proteinurie [107]. In Studien mit Ald-infundierten Ratten konnte nicht nur eine Proteinurie nachgewiesen werden, sondern auch Glomerulosklerose und Mesangiolyse [76, 98]. Mit einer Blockierung des MR über Eplerenon konnten diese untersuchten Parameter vermindert werden und unterstreichen die Rolle von Ald in der Entwicklung von glomerulären Schäden [98].

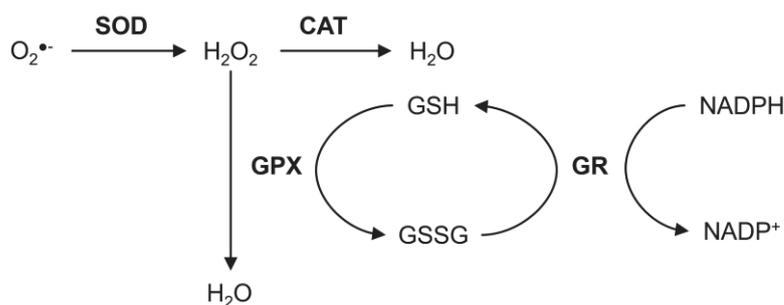
Weitere Studien konnten zeigen, dass Podozyten und Mesangiumzellen ein direktes Ziel von Ald sein können, da diese lokal den MR exprimieren. So ging eine chronische Infusion von Ald nicht nur mit einer Proteinurie, sondern auch mit einer Reduktion der Podozyten-Marker Podocin und Nephrin einher [108]. In dieser Studie konnten außerdem oxidativer Stress und die Aktivierung von Sgk1 als mögliche Ursachen für die Podozytenschädigung identifiziert werden.

In kultivierten Mesangiumzellen stimuliert Ald die Proliferation und Deformation der dieser über MR und *Extracellular-signal Regulated Kinase 1/2* (ERK1/2)-abhängige Signalwege.

Weiterhin konnte eine Rolle des *Epidermal Growth Factor* (EGF)-Rezeptors identifiziert werden. So führt Ald zu einer vermehrten Phosphorylierung des Rezeptors und trägt über den MAP (*mitogen-activated protein*)-Kinase Weg zur ERK induzierten Proliferation bei [105].

## 1.6 Antioxidative Abwehrmechanismen

Um die Redox-Homöostase aufrecht zu erhalten, verfügen Zellen über verschiedene Abwehrmechanismen [81]. Zu den Abwehrmechanismen gegen durch ROS verursachten oxidativen Stress gehören Präventivmechanismen, Reperaturmechanismen, physikalische Schutzmechanismen und antioxidative Abwehrmechanismen [109]. Das antioxidative Abwehrsystem kann in zwei Kategorien eingeteilt werden: nicht-enzymatische Antioxidantien und enzymatische Antioxidantien. Zu den nicht-enzymatischen Antioxidantien zählen Ascorbinsäure (Vitamin C),  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E), Glutathion (GSH), Thioredoxin (TRX), Karotinoide und Flavonoide [81]. Zu den enzymatischen Antioxidantien zählen SOD, Katalase (CAT), NAD(P)H-(Chinone) Dehydrogenase 1 (NQO1), Hämoxxygenase (HO), Glutathionperoxidase (GPX), Glutathionreduktase (GR), Glutamat-Cysteinligase (GCL) und Thioredoxinreduktase (TRXR), sowie Enzyme des Phase II-Metabolismus [81, 110]. In Säugetierzellen sind die zwei endogenen Thiol-abhängigen Abwehrsysteme, das TRX- und GSH-System, sehr bedeutend für die Aufrechterhaltung der Redox-Homöostase [109]. GSH ist ein Tripeptid aus den Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin. Die Verknüpfung der Peptide erfolgt über die GCL und Glutathionsynthase. Dabei ist die Aktivität und die Expression von GCL der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der GSH-Synthese [111]. Im Folgenden wird der Zyklus dieses endogenen, GSH-abhängigen antioxidativen Abwehrsystems näher dargestellt: Wie bereits in 1.5.1.1 beschrieben wird  $O_2^{\bullet-}$  von der SOD in  $H_2O_2$  umgewandelt [49].  $H_2O_2$  kann über die CAT zu Wasser gespalten werden. Weiterhin wird  $H_2O_2$  über die GR zu Wasser reduziert, während die freie Thiolgruppe des reduzierten GSH oxidiert wird. Zwei oxidierte GSH-Moleküle bilden daraufhin unter Ausbildung einer Disulfidbrücke mit der analogen Thiolgruppe ein Glutathion-Disulfid (GSSG). Zur Regeneration katalysiert die GPX mit Hilfe von NADPH die Reduktion der Disulfidbrücke und stellt somit GSH der Zelle wieder zur Verfügung (Abbildung 1.6) [81].



**Abbildung 1.6: Das Glutathion-System als antioxidativer Abwehrmechanismus.** Das über verschiedene zelluläre Prozesse produzierte  $O_2^{\bullet-}$  kann über die SOD zu  $H_2O_2$  umgesetzt werden.  $H_2O_2$  kann zum einen über die CAT zu  $H_2O$  detoxifiziert werden, zum anderen über das Glutathion-System. Hierbei wird  $H_2O_2$  über die GPX mit GSH als Ko-Faktor zu  $H_2O$  reduziert. Die dabei oxidierte Thiolgruppe bildet zu einem weiteren oxidierten GSH eine Disulfidbrücke aus und bildet ein Dimer (GSSG). Über die GR wird GSSG wieder zu zwei GSH reduziert und steht somit der Zelle wieder zur Verfügung. Diese Reaktion verbraucht NADPH als Reduktionsäquivalent. CAT: Katalase, GPX: Glutathionperoxidase, GR: Glutathionreduktase, GSH: Glutathion, GSSG: Gluthationdisulfid,  $O_2^{\bullet-}$ : Superoxid,  $H_2O_2$ : Wasserstoffperoxid,  $H_2O$ : Wasser, NADPH: Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, SOD: Superoxiddismutase. [49, 81]

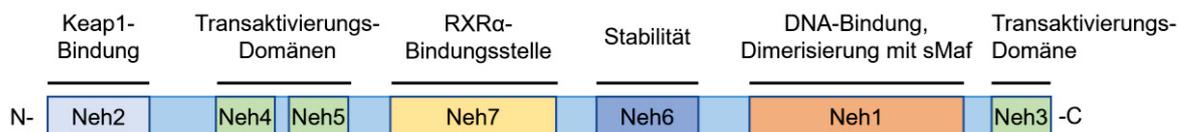
Die TRXR ist ein Flavoprotein, welches als Homodimer seine Funktion ausübt. Mit TRX als Ko-Faktor bildet es ein System, bei dem Disulfide oxidierter Proteine reduziert werden und auf die freien Thiolgruppen des TRX übertragen werden. Die Reduktion erfolgt ähnlich wie bei dem GSH-System mit Hilfe von NADPH [112].

Die Expression antioxidativer Enzyme und damit auch endogener Antioxidantien kann über oxidativen Stress induziert werden. Der Transkriptionsfaktor *Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2* (Nrf2) gilt als Masterregulator der antioxidativen Antwort und reguliert über die Bindung an das *Antioxidative Response Element* (ARE) die Genexpression antioxidativer Enzyme [113].

## 1.7 Der Transkriptionsfaktor Nrf2

Nrf2 wird ubiquitär im Gewebe und in den Zellen exprimiert und induziert bei Aktivierung die Transkription von antioxidativen Enzymen und Enzymen des Metabolismus als Antwort auf oxidativen Stress oder eine erhöhte Anwesenheit von Elektrophilen [113]. Jedoch spielt Nrf2 nicht nur eine Rolle bei induziertem Stress, sondern auch beim Aufrechterhalten der Redox-Homöostase unter physiologischen Bedingungen [114]. Nrf2 gehört zu der Familie der *basic Leucin-Zipper* (bZIP)-Transkriptionsfaktoren, die alle die *Cap ,n' Collar* (CNC)-Struktur gemeinsam haben. Das Nrf2-Protein besteht aus sieben konservierten Proteindomänen, den Nrf2-ECH-homologen Domänen (Neh1-7), welche alle spezifische Funktionen besitzen (Abbildung 1.7) [115-117]. Die Domäne Neh1 beinhaltet die CNC-bZIP-Struktur, welche für die Bindung an das ARE auf der DNA und die Dimerisierung mit anderen bZIP-Proteinen, wie den *small Musculoaponeurotic fibrosarcoma* (sMaf) Proteinen, zuständig ist [118]. Die Neh2-Domäne enthält zwei konservierte Aminosäure-Abschnitte, an die der negative Regulator von Nrf2, Kelch-ähnliches ECH-assoziiertes

Protein 1 (Keap1) bindet, [119]. Für eine Stabilität von Nrf2 unabhängig von Keap1 ist die Serin-reiche Neh6-Domäne verantwortlich [120].

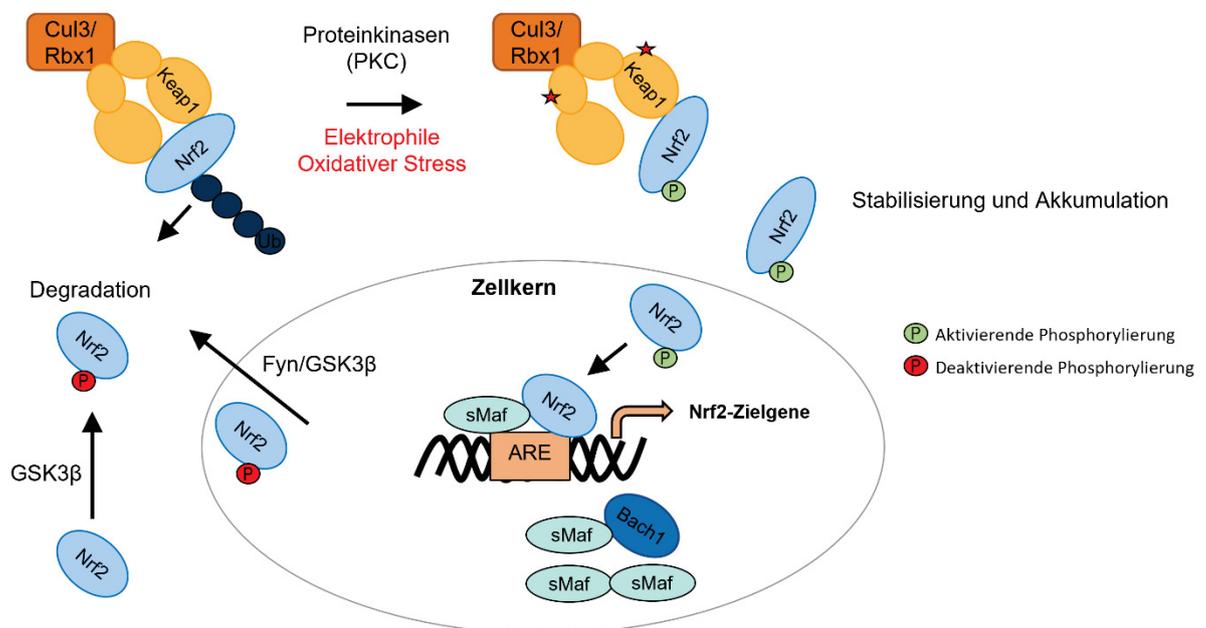


**Abbildung 1.7: Struktureller Aufbau von Nrf2.** Nrf2 enthält die sechs konservierten Domänen Neh1-7. Die Domäne Neh1 beinhaltet Sequenzen, die für die DNA-Bindung und die Dimerisierung mit sMaf-Proteinen verantwortlich sind. In der am N-Terminus vorzufindenden Domäne Neh2 liegen die Bindungsstellen für den Repressor Keap1. Neh3-5 dienen als Transaktivator-Domänen. Neh3 spielt zusätzlich noch eine Rolle bei der Bindung von Nrf2 an die DNA. Die Serin-Reste innerhalb der Neh6-Domäne regulieren die Keap1-unabhängige Stabilität von Nrf2. Die Neh7-dient als Bindungsstelle für RXR $\alpha$ . Eine Bindung dieses Rezeptors wirkt sich negativ auf die Nrf2-Aktivität aus. DNA: Desoxyribonukleinsäure, Keap1: Kelch-ähnliches ECH-assoziiertes Protein 1, sMaf: *small Musculoaponeurotic fibrosarcoma*, Neh: Nrf2-ECH-homologe Domäne, Nrf2: *Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2*, RXR $\alpha$ : Retinoid-X-Rezeptor  $\alpha$ . Modifiziert nach Tonelli et al. (2018) [115].

### 1.7.1 Regulation von Nrf2

Die Aktivität und Anwesenheit von Nrf2 wird transkriptionell, posttranskriptionell und posttranslationell reguliert (Abbildung 1.8) [121]. Unter normalen physiologischen Bedingungen ist Nrf2 im Cytoplasma lokalisiert und über die Neh2-Domäne an seinen Repressor Keap1 gebunden [113]. Keap1 liegt als Homodimer vor und besteht neben der N- und C-terminalen Domäne aus drei weiteren funktionellen Domänen: Der Bric-a-brac (BNB)-Domäne als Bildungsstelle des Homodimers, der *Intervening Linker Region* (IVR)-Domäne mit vielen reaktiven Cystein-Resten, und der Kelch-Domäne, die als Nrf2-Bindungsstelle dient [121]. Die Bindung von Keap1 and Nrf2 induziert gleichzeitig den Abbau von Nrf2 über den Ubiquitin-Ligase-Komplex (Cul3/Rbx1) [119]. Keap1 legt hierbei die Lysin-reichen Region von Nrf2 in der Neh2-Domäne frei, welche dem Ubiquitin-Ligase-Komplex als Angriffspunkt für die Ubiquitinierung dienen. Dies führt schließlich zum Abbau von Nrf2 im Proteasom [119, 122]. Steht jedoch die Zelle unter oxidativem Stress oder sind höhere Konzentrationen von Elektrophilen vorhanden, werden die Thiolgruppen der Cystein-Reste von Keap1 modifiziert. Diese Modifikation resultiert in einer Konformationsänderung von Keap1. Die Lysin-reichen Regionen von Nrf2 werden nun nicht mehr exponiert, wodurch kein Ubiquitin-Transfer mehr stattfindet. Eine Keap1-Inaktivierung führt so zu einer Stabilisierung, Akkumulation und Translokation von Nrf2 in den Zellkern [115, 123, 124]. Des Weiteren kann auch eine Phosphorylierung von Nrf2 über diverse Kinasen die Bindung an Keap1 beeinflussen. So konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Nrf2 an Serin 40 (pNrf2) in der Neh2-Domäne über die durch oxidativen Stress aktivierte PKC zu einer Stabilisierung von Nrf2 und einer anschließenden Translokation in den Zellkern führt [125]. Im Zellkern bildet Nrf2 ein Heterodimer mit sMaf-Proteinen (MafF, MafG und MafK) [126]. Die Bildung des Dimeres ist notwendig für die Bindung an das ARE und die Induktion der Transkription von Nrf2-Zielgenen [127]. Jedoch

gibt es weitere Keap1-unabhängige Mechanismen, die die Aktivität von Nrf2 beeinflussen können. So konnte gezeigt werden das die Kinase Fyn, welche über die Kinase Glykogensynthase-Kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) aktiviert wird, Nrf2 im Kern phosphoryliert, was wiederum zu einem Export von Nrf2 aus dem Kern führt und zu seiner Degradation [128, 129]. GSK3 $\beta$  kann auch Nrf2 direkt in der Neh6-Domäne phosphorylieren, was zum Abbau von Nrf2 führt [130]. So kommt es nach der Phosphorylierung von GSK3 $\beta$  zu einer Ubiquitinierung über  $\beta$ -Transducin repeat-Containing Protein ( $\beta$ -TrCP) und Degradation im Proteasom [128]. Weiterhin konkurriert das Nrf2-Heterodimer im Kern um die Bindung am ARE mit sMaf-Hetero- oder Homodimeren und dem Bach1/sMaf-Heterodimer. Dabei wirkt eine Bindung des Bach1/sMaf-Dimeres repressiv gegenüber der Transkription einiger Nrf2-regulierten Gene aus [131].

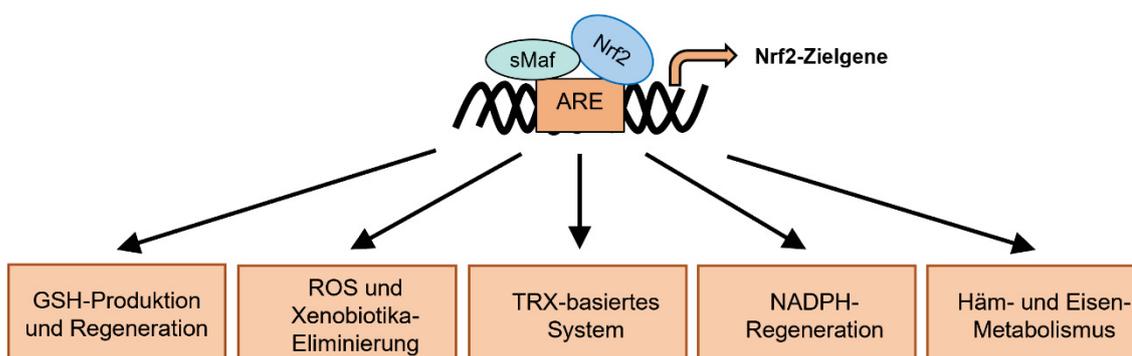


**Abbildung 1.8: Schematische Darstellung der Regulation von Nrf2.** Unter normalen physiologischen Bedingungen wird Nrf2 von seinem Inhibitor Keap1 im Cytoplasma gehalten. Die Bindung an Keap1 induziert die Rekrutierung des Ubiquitin-Ligase-Komplexes (Cul3/Rbx1), was zu einer Ubiquitinierung und Degradierung von Nrf2 führt. Erfährt die Zelle jedoch oxidativen Stress oder wird gegenüber Elektrophilen exponiert, interagieren diese mit den Cystein-Resten von Keap1 und es kommt zu einer Konformationsänderung. Des Weiteren kann Nrf2 über Protein-Kinasen phosphoryliert werden. Diese Faktoren führen zu einer Stabilisierung und Akkumulation von Nrf2, welches daraufhin in den Kern transloziert. Im Kern bildet Nrf2 ein Heterodimer mit sMaf-Proteinen und kann an das ARE binden, um die Transkription antioxidativer Gene zu induzieren. Jedoch gibt es auch Keap1-unabhängige Regulations-Mechanismen. Nrf2-sMaf konkurrieren um die ARE-Bindungsstelle mit sMaf-Homodimeren und sMaf/Bach1-Heterodimeren. Des Weiteren führt die Phosphorylierung über Fyn zu dem Export von Nrf2 aus dem Kern. Die Kinase GSK3 $\beta$  aktiviert Fyn und kann auch selbst über die Phosphorylierung von Nrf2 dessen Degradierung induzieren. ARE: Antioxidatives Response-Element, Bach1: *basic leucine zipper transcription factor 1*, Cul3/Rbx1: Ubiquitin-Ligase-Komplex, GSK3 $\beta$ : Glykogensynthase-Kinase 3 $\beta$ , Keap1: Kelch-ähnliches ECH-assoziiertes Protein 1, Nrf2: *Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2*, PKC: Proteinkinase C, sMaf: *small Musculoaponeurotic fibrosarcoma*. Adaptiert nach Tonelli *et al.* [115] und Kaspar *et al* [113].

### 1.7.2 Nrf2-abhängige Transkription von antioxidativen Enzymen

Die nach der Bindung von Nrf2 an ARE exprimierte Proteine unterscheiden sich in ihrem Beitrag und Funktion zur Neutralisierung der ROS (Abbildung 1.9). So induziert Nrf2 nicht nur die Expression der GSH-synthetisierenden GCL-Untereinheiten GCLC (katalytische Untereinheit) und GCLM (regulatorische Untereinheit), sondern auch die Enzyme für die GSH-Regeneration, GPX und GR [132, 133]. Des Weiteren kontrolliert Nrf2 auch das TRX-System und reguliert nicht nur die Expression von TRX, sondern auch von TRXR und Sulfiredoxin (SRXN) [115, 134]. Somit nimmt Nrf2 Einfluss auf die Aktivität der beiden für die antioxidative Abwehr sehr bedeutenden Thiol-abhängigen Systeme. NADPH ist als Ko-Faktor für viele metabolisch aktiven und antioxidativen Enzyme, wie der GR und NQO1, von essenzieller Bedeutung [115]. Nrf2 nimmt auch Einfluss auf die Expression von Enzymen der NADPH-Regeneration, wie Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD) oder Isocitrat-Dehydrogenase (IDH) [135]. Eine weitere wichtige Gruppe der Nrf2-regulierten Proteine sind die des Häm- und Eisen-Metabolismus. Dazu zählt die Hämoxxygenase 1 (HO-1), welche Häm zu Eisen, Biliverdin und Kohlenstoffmonoxid (CO) abbaut [136]. Daraufhin folgt eine Reduktion von Biliverdin zu Bilirubin. Biliverdin und Bilirubin wirken wiederum antioxidativ [137]. Zusätzlich exprimiert Nrf2 noch weitere Enzyme für die ROS-Eliminierung, wie beispielsweise die SOD oder NQO1, und nimmt über die Induktion der Expression von Enzymen des Phase I- und Phase II-Metabolismus auch Einfluss auf die zelluläre Eliminierung von Xenobiotika [138].

Die Bedeutung des Nrf2-Systems in der Antwort auf oxidativen Stress wurde bereits in vielen Studien *in vitro* und *in vivo* gezeigt [113]. Außerdem konnte beobachtet werden, dass Nrf2 und der Nrf2-Signalweg in Antwort auf Ald-*verursachten* oxidativen Stress in Nierenzellen und in Nieren von Ratten aktiviert werden [76].



**Abbildung 1.9: Nrf2-regulierte Abwehrmechanismen.** Die Bindung von Nrf2 an das ARE führt zu einer Transkription der Nrf2-Zielgene, welche verschiedenen Abwehrmechanismen zugeordnet werden können. Nrf2 induziert nicht nur die Produktion von GSH, sondern auch die Expression der für die zwei Thiol-abhängigen, GSH und TRX-basierten, endogenen Systeme. Des Weiteren werden die NADPH-Regeneration sowie der Häm- und Eisen-Metabolismus stimuliert. Zusätzlich werden noch weitere Enzyme für die ROS und Xenobiotika-Eliminierung exprimiert. All diese Abwehrmechanismen tragen zur Neutralisierung der ROS bei. ARE: Antioxidatives Response-Element, GSH: Glutathion, NADPH: Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, Nrf2: Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2, ROS: reaktive Sauerstoffspezies, sMaf: small Musculoaponeurotic fibrosarcoma, TRX: Thioredoxin. Modifiziert nach Tonelli *et al.* (2018) [115].

### 1.7.3 Nrf2-Aktivatoren in der Therapie für chronische Niereninsuffizienz

In klinischen Studien konnte bereits über Marker für DNA, Protein- oder Lipidoxidation nachgewiesen werden, dass oxidativer Stress in Patienten mit CKD erhöht und die endogene antioxidative Abwehr reduziert ist [139-141]. Das eine reduzierte oder inhibierte Nrf2-Aktivität eine Rolle in der Progression von CKD haben könnte, konnte bereits in CKD-Patienten gezeigt werden [142]. In den CKD-Patienten war sowohl die Expression von Nrf2 selbst als auch die des Zielgens *Nqo1* gegenüber den gesunden Kontrollen reduziert, mit gleichzeitiger Induktion proinflammatorischer Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B. Eine geringere Nrf2-Expression und Aktivität des Nrf2-Signalweges konnte auch bereits in einem Rattenmodell für CKD nachgewiesen werden [143]. Zusätzlich konnte eine damit einhergehende höhere Expression der NOX-Untereinheiten und NF- $\kappa$ B in den Nieren der Ratten beobachtet werden. Weiterhin führt ein Verlust von Nrf2 in Mäusen zu pathologischen Veränderungen der Niere, einem Verlust der Nierenfunktion und erhöht die Empfindlichkeit gegenüber nephrotoxischen Substanzen [144, 145]. Auch scheint ein Polymorphismus in der Promotorregion von Nrf2 oder in seinen Zielgenen *Gstm1* und *Sod2*, welcher die Genaktivität negativ beeinflusst, eine Bedeutung in der Überlebensrate von CKD-Patienten zu spielen [146]. Daher erscheint die pharmakologische Beeinflussung der Nrf2-Aktivität und somit des endogenen antioxidativen Abwehrsystems ein vielversprechender Angriffspunkt für die Therapie von CKD.

In tierexperimentellen Studien zeigten Nrf2-Aktivatoren wie Bardoxolon-Methyl (CDDO-Me) oder Curcumin in Modellen für akute und chronische Niereninsuffizienz positive Effekte. So führte die Nrf2-Aktivierung nicht nur zu einer verbesserten Nierenmorphologie, sondern auch zu einer Steigerung der Nierenfunktion [147, 148]. Des Weiteren konnte eine Behandlung mit dem Aktivator Sulforaphan (Sulf) in Ratten vor einer Ald-induziertem Hypertonie und Schäden schützen [76]. In zwei klinischen Studien zeigte der Nrf2-Aktivator CDDO-Me vielversprechende Ergebnisse, da sich unter der Gabe des Aktivators die Nierenfunktion, ermittelt über die GFR, von diabetischen CKD-Patienten wieder verbesserte [149, 150]. Eine klinische Phase 3 Studie ebenfalls mit diabetischen CKD-Patienten zeigte zunächst auch eine Verbesserung der Nierenfunktion in Form einer gesteigerten GFR [151]. Jedoch führte die Behandlung auch zu einer erhöhten Albuminausscheidung und musste aufgrund von auftretenden Fällen von Herzinsuffizienz abgebrochen werden [151, 152]. In einer neueren Phase 2 Studie, in der Patienten mit höherem Risiko für Herzversagen ausgeschlossen wurde, konnte unter der Gabe von CDDO-Me erneut ein Anstieg der GFR und der Albuminausscheidung beobachtet werden. Jedoch kam es in dieser Studie nicht zu vermehrten kardiovaskulären Events über den Behandlungszeitraum von 16 Wochen [153]. Weitere Untersuchungen zum klinischen

Nutzen in Relation zur Sicherheit für die Behandlung von renalen Krankheiten mit CDDO-Me sind aktuell noch in der Evaluierung [154, 155].

Trotz den beschriebenen Rückschlägen in den klinischen Studien ist die Nrf2-Aktivierung immer noch ein vielversprechender therapeutischer Angriffspunkt für die Behandlung der CKD. Die Ergebnisse dieser Studien zeigen jedoch, dass weitere Forschung an der Nrf2-Aktivierung und dem Nrf2-Signalweg notwendig sind und auch andere Nrf2-aktivierende Substanzen in Betracht gezogen werden sollten, welche nicht zu den Nebenwirkungen von CDDO-Me führen.

## 2. Zielsetzung

Das RAAS reguliert über seine Effektor-Hormone Ang II und Ald den Blutdruck, sowie den Wasser- und Elektrolythaushalt. Erhöhte Spiegel des Mineralkortikoides Ald tragen nicht nur zur Bildung von Bluthochdruck bei, sondern auch zu einer Entwicklung und Progression von CKD [61, 72]. So gehen erhöhte Ald-Konzentrationen mit einer gesteigerten Produktion an ROS einher, welche zu einer Schädigung der Niere führen [55]. Zum Schutz gegen die induzierten Schäden kann der Transkriptionsfaktor Nrf2 aktiviert werden und die Genexpression antioxidativer Enzyme induzieren. In hypertensiven Ratten und in kultivierten Nierenzellen konnte unsere Arbeitsgruppe bereits zeigen, dass Ald-induzierte Schäden zu einer Aktivierung von Nrf2 beitragen [76]. Zielsetzung dieser Dissertation war es zunächst herauszufinden, ob erhöhte Ald-Konzentrationen zu moderaten Nierenschäden und einer daraus resultierenden Aktivierung des Nrf2-Signalweges in Mäusen führen. Zusätzlich sollten die Ald-induzierten Schäden und die potentielle Nrf2-Aktivierung im Tubulussystem lokalisiert werden. Hierzu wurden in einem Dosisversuch wildtypischen C57BL/6J-Mäusen osmotische Minipumpen implantiert, die über einen Zeitraum von 28 Tagen 75, 125 oder 250 µg Ald/kg x Tag abgaben. Zur Analyse der Ald-induzierten Schäden, Nrf2-Aktivierung und deren Lokalisation, wurden folgende Parameter untersucht:

- Blutdruck
- Nierenfunktionsparameter
- Histopathologische Veränderungen in der Niere
- Anwesenheit inflammatorischer Prozesse
- Marker für systemischen und lokalen oxidativen Stress und damit verbundene Schäden
- Aktivierung von Nrf2 (Expression, Phosphorylierung und Translokation)
- Expression von Nrf2-Zielgenen des antioxidativen Abwehrsystems
- Kolokalisation von Nrf2 und DNA-Schäden im Tubulussystem
- Expression der an der Nrf2-Regulation beteiligten Proteine

Im weiterführenden Teil dieser Dissertation wurde untersucht, ob eine zusätzliche genetische oder pharmakologische Nrf2-Aktivierung vor Ald-induzierten Nierenschäden schützen kann. Der Nrf2-Aktivatoren CDDO-Me führte in klinischen Studien mit diabetischen CKD-Patienten zu einer erhöhten GFR jedoch auch zu einer gesteigerten Proteinurie und Fällen von Herzinsuffizienz [151, 152]. In einem hypertensiven Ald-Rattenmodell führte eine zusätzliche Behandlung mit dem Nrf2-Aktivatoren Sulf, zu einer Verbesserung der Nierenfunktion und -pathologie und konnte den Blutdruck der Tiere senken [76]. Ziel des zweiten Teils dieser Dissertation war es zu untersuchen, ob eine Sulf-Behandlung und eine

konstitutive Nrf2-Aktivierung in Mäusen ähnliche protektive Eigenschaften in Bezug auf die Ald-induzierten Nierenschäden aufweisen. Hierfür wurden transgene Mäuse (B6.Cg-Keap1<sup>tm2Mym</sup>(Alb-cre)21Mgn/J) verwendet, die hypomorph für den Nrf2-Repressor Keap1 sind. Bei diesen Mäusen wird Keap1 basal geringer exprimiert und es kommt so zu einer konstitutiven Aktivierung von Nrf2 [156]. Diesen und wildtypischen Mäusen wurden ebenfalls osmotische Minipumpen implantiert, die für 28 Tage 125 µg Ald/kg x Tag abgaben. Zusätzlich wurden wildtypische Ald-infundierte Mäuse mit Sulf behandelt, um die Effekte beider Ansätze vergleichen zu können. Folgende Endpunkte wurden für die Analyse dieses Experimentes untersucht:

- Blutdruck
- Nierenfunktionsparameter
- Histopathologische Veränderungen in der Niere
- Expression Ald-regulierter Gene
- Marker für systemischen oxidativen Stress und damit verbundene Schäden
- Aktivierung von Nrf2 (Expression, Phosphorylierung und Translokation)
- Expression von Nrf2-Zielgenen des antioxidativen Abwehrsystems
- Kolokalisation von Nrf2 im Tubulussystem
- Expression der an der Nrf2-Regulation beteiligten Proteine

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Herstellernachweise

Tabelle 3.1: Auflistung der Herstellernachweise

Hersteller	Sitz
Abcam	Cambridge, United Kingdom
Active Motif®	Carlsbad, Kalifornien, USA
Agilent Technologies	Santa Clara, Kalifornien, USA
Alleman Pharma GmbH	Rimbach, Deutschland
Alzet	DURECT Corporation, Cupertino, Kalifornien, USA
Andreas Hettich GmbH & Co.KG	Tuttlingen, Deutschland
Applied Biosystems	Waltham, Massachusetts, USA
Assaypro LLC	Saint Charles, Missouri, USA
Bayer AG	Leverkusen, Deutschland
Bella-pharm	Vechta, Deutschland
Bio-Rad Laboratories GmbH	Düsseldorf, Deutschland
BioLegend	San Diego, Kalifornien, USA
Biometra GmbH	Göttigen, Deutschland
BioPorto Diagnostics A/S	Hellerup, Dänemark
Biorbyt	Cambridge, United Kingdom
Biotium, Inc.	Fremont, Kalifornien, USA
BosterBio	Pleasanton, Kalifornien, USA
Braun (Procter & Gamble Service GmbH)	Schwalbach am Taunus, Deutschland
Calbiochem	San Diego, California, USA
Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland
Cayman Chemicals Company	Ann Arbor, Michigan, USA
Eurofins Scientific	Luxemburg, Luxemburg
Fermentas GmbH	Sant Leon-Rot, Deutschland
Fresenius Kabi Deutschland GmbH	Bad Homburg, Deutschland
GE Healthcare	Little Chalfont, UK
GraphPad	La Jolla, Kalifornien, USA
Gribi	Belp, Schweiz
Janvier Labs	Le Genest Sain Isle, France
Leica Biosystems Nussloch GmbH	Nussloch, Deutschland
Leica Camera AG	Wetzlar, Deutschland
Leica Microsystems GmbH	Wetzlar, Deutschland

LifeSpan BioSciences	Seattle, Washington, USA
Memmert GmbH + Co. KG	Schwabach, Deutschland
Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
National Institute of Health	Bethesda, Maryland
Olympus Life Science	Tokio, Japan
Oxford Biomedical Research	Rochester Hills, Michigan, USA
PerkinElmer, Inc.	Waltham, USA
Piromal Critical Care GmbH Deutschland	Hallbergmoos, Deutschland
Qiagen	Hilden, Deutschland
R&D Systems, Inc.	Minneapolis, Minnesota, USA
Roche Deutschland Holding GmbH	Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Rockland Immunochemicals	Limerick, Pennsylvania, USA
Santa Cruz	Dallas, USA
Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland oder St. Louis, Missouri, USA
StessMarq Biosciences	Victoria, Canada
Tecan Trading AG	Männedorf, Schweiz
TEM SEGA	Pessac, Frankreich
Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Thermo Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Vector Laboratories	Newark, Kalifornien, USA
Visitech Systems	Apex, North Carolina, USA
VWR International GmbH	Radnor, Pennsylvania, USA
Zoetis Deutschland GmbH	Berlin, Deutschland

0

### 3.1.2 Versuchstiere

Für die folgenden Versuche wurden ausschließlich männliche wildtypische C57BL/6J Mäuse von Janvier Labs oder transgene männliche B6.Cg-Keap1<sup>tm2Mym</sup>(Alb-cre)21Mgn/J Mäuse verwendet. Die transgenen Mäuse wurden freundlicherweise von Herrn PD Dr. Christoph Jan Wruck (Institut für Anatomie und Zellbiologie, RWTH Aachen, Deutschland) bereitgestellt. In dieser genetisch veränderten Linie sind die Exons vier bis sechs des *Keap1*-Locus mit *Locus of X-over P1* (LoxP)-Sequenzen flankiert. Des Weiteren exprimieren diese Mäuse eine Albumin-Cre (Alb-Cre)-Rekombinase für eine Leber-spezifische Deletion des *Keap1*-Locus über das Cre/LoxP-System [157]. Das gefloxtete *Keap1*-Allel ist hypomorph. Dies bedeutet, dass die Keap1-Expression in Mäusen, die homo- oder heterozygot ein gefloxtes Allel tragen (Keap1<sup>flox/flox</sup> oder Keap1<sup>flox/+</sup>), bereits reduziert ist. Dies führt bereits basal zu einer erhöhten Nrf2-Aktivierung [156].

Für die Versuche wurden nur Mäuse mit dem Genotyp Keap1<sup>flox/flox</sup>:Alb-Cre negativ verwendet, da für dieses Experiment kein Ausschnitt des gefloxteten Keap1-Locus in Alb-

exprimierenden Zellen gewünscht war. Alle im Versuch verwendeten transgenen Mäuse wurden vor Versuchsbeginn genotypisiert. Die transgenen Mäuse werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit als Nrf2<sup>↑</sup>-Mäuse bezeichnet.

### 3.1.3 Geräte

**Tabelle 3.2: Auflistung der verwendeten Geräte**

Bezeichnung	Spezifikation	Hersteller
Autotechnikum		
Begasungs-Anästhesie-Station	MiniTAG	TEM SEGA
Blutdruckmessgerät	BP-2000 Series II	Visitech Systems
ChemiDoc™ Touch Imaging System		Bio-Rad Laboratories GmbH
Dampfgarer	Multi Goumet	Braun
Durchflusszytometer	BD Accuri™ C6	BD Biosciences
Fluoreszenzmikroskop	Olympus BX43	Olympus Life Science
Kryotom	Leica CM 3050S	Leica Camera AG
Lichtmikroskop	DM 750	Leica Mikrosystems GmbH
Mikrotom	Hyrax M25	Carl Zeiss AG
Mini-PROTEAN® Tetra Cell Elektrophorese System		Bio-Rad Laboratories GmbH
Mini Trans-Blot® Cell System		Bio-Rad Laboratories GmbH
Nanodrop	Nanovue Plus	GE Healthcare
Paraffinstation	Leica EG1150H+C	Leica Biosystems Nussloch GmbH
Photospektrometer	Sunrise™	Tecan Trading AG
Power Supply	Power Pac Basic	Bio-Rad Laboratories GmbH
QIAcube		Qiagen
Sonifizierer	Q120AM	Active Motif®
Thermocycler	TPersonal	Biometra GmbH
Echtzeit-Thermocycler	C1100 Touch	Bio-Rad Laboratories GmbH
Trockenschrank		Memmert GmbH + Co. KG
Tissue Lyser	II	Quiagen
UV-Transilluminator	GelDoc 200	Bio-Rad Laboratories GmbH
Wärmeschrank	OV2	Biometra
Zentrifuge	Mikro200R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG

### 3.1.4 Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Falls nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien von Sigma-Aldrich, Thermo Fisher Scientific, Merck KGaA oder VWR International GmbH bezogen.

Für die Tierversuche wurden die Substanzen und Verbrauchsmaterialien aus folgenden Firmen bezogen: Aldosteron von Sigma-Aldrich; R,S-Sulforaphan von Biorbyt; osmotische Minipumpen, Model 1004 von Alzet; Ketamin 100 mg/ml und Carprofen von Zoetis Deutschland GmbH; Xylazin (Rompun 2%) von Bayer AG; Isofluran von Piramal Critical Care Deutschland GmbH; Deltadex 40 von AlleMan Pharma GmbH; Procainhydrochlorid von bela-pharm und Wundklammern von Gribi.

### 3.1.5 Lösungen und Puffer

Tabelle 3.3: Auflistung der verwendeten Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
Blotting-Puffer	250 mM Tris-Base 192 mM Glycin 20 % (v/v) EtOH
Cytosollyse-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,5) 50 mM NaCl 500 mM Sucrose 0,1 mM EDTA 0,5 % (v/v) Triton-X 100 Frisch dazu: 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> und 1xPhosphatase-Inhibitor
Hämatoxylin-Lösung	1 g Hämatoxylin in 48 ml 99,8 % Isopropanol lösen 51,9 ml dH <sub>2</sub> O 50 ml Glycerin 1,5 g Kaliumaluminiumsulfat 5 ml Essigsäure 0,2 g Kaliumiodat
Kernlyse-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,5) 500 mM NaCl 0,2 mM EDTA 1 % (v/v) Nonident P40 1 % (v/v) Tergitol Typ NP40 Frisch dazu: 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
Lyse-Puffer (pH 12)	25 mM NaOH 0,2 mM Na <sub>2</sub> -EDTA
Neutralisationspuffer (pH 5)	40 mM Tris-HCl
PBS (pH 7,4)	2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 137 mM NaCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2,7 mM KCl
Ponceau-S-Lösung	1,5 g/l Ponceau-S 5 ml/l Essigsäure
RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 8,0) 150 mM NaCl 1 mM EDTA

	1 % (v/v) NP-40 (= Tergitol) 0,1 % (w/v) SDS 0,025 % (v/v) Natriumdesoxycholat 1 mM Natriumfluorid
Sammelgel (5 %)	1,3 ml Acrylamid 30 % (Rotiphorese® Gel 30) 1 ml 1,5 M Tris-Base (pH 6,8) 5,5 ml MilliQ-H <sub>2</sub> O 160 µl SDS (10 %) 80 µl APS (100 g/l) 80 µl TEMED (10 %)
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
Sirius-Rot Stammlösung	1 g Sirius-Rot in dH <sub>2</sub> O
Sirius-Rot Färbelösung	10 ml Sirius-Rot Stammlösung 90 ml gesättigte Pikrinsäure
TAE-Puffer (pH 8)	40 mM Tris 1 mM EDTA
TBST (pH 7,4)	50 mM Tris-Base 150 mM NaCl 0,1 % (v/v) Tween-20
TNB-Puffer (pH 7,5)	0,1 M Tris-HCl, pH 7,5 0,15 M NaCl 0,5 % (w/v) TNB (aus Kit)
TNT-Waschpuffer	0,1 M Tris-HCl, pH 7,5 0,15 M NaCl 0,2 % (w/w) Tween-20
Trenngel (10 %)	6,7 ml Acrylamid 30 % (Rotiphorese® Gel 30) 5 ml 1,5 M Tris-Base (pH 8,8) 7,8 ml MilliQ-H <sub>2</sub> O 200 µl SDS (10 %) 200 µl APS (100 g/l) 80 µl TEMED (10 %)

### 3.1.6 Kits und Assays

Tabelle 3.4: Auflistung der verwendeten Kits und Assays

Bezeichnung	Hersteller
Aldosterone ELISA	BIOTREND Chemikalien GmbH
AssayMax™ Mouse Albumin ELISA Kit	Assaypro LLC
Creatinine urinary Colorimetric Assay Kit, No. 500701	Cayman Chemicals Company
DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit, SK-4100	Vector Laboratories
DC™ Protein Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH
DNA Damage (8-OHdG) ELISA Kit	StessMarq Biosciences
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Scientific
<i>In Situ</i> Cell Death Detection Kit	Roche
LEGENDplex™ Mouse Inflammation Panel	BioLegend

Mouse Alpha GST ELISA Kit	LifeSpan BioSciences
Mouse GSTP1/GST Pi ELISA Kit	LifeSpan BioSciences
Mouse KIM1 / TIM1 ELISA Kit PicoKine™	BosterBio
Mouse NGAL ELISA Kit	BioPorto Diagnostics A/S
Proteome Profiler™ Phospho-Kinase Array Kit	R&D Systems, Inc.
RNeasy® Mini Kit	Qiagen
Tyramide Amplification Kit, 33020	biotium
TSA-Biotin-Kit, NEL700A001	Perkin Elmer
Urinary Isoprostane ELISA Kit	Oxford Biomedical Research
Vectastain Elite ABC Kit, PK-6100	Vector Laboratories
VECTOR® VIP Peroxidase Substrate Kit, SK-4600	Vector Laboratories

### 3.1.7 Antikörper

#### 3.1.7.1 Primärantikörper

**Tabelle 3.5: Auflistung der verwendeten Primärantikörper**

Antigen	Bestellnummer	Spezies	Hersteller
8-oxodG	AA1005.2	Maus	Immundiagnostik
γH2AX, phospho Ser139	9718	Kaninchen	Cell Signaling Technology
Aquaporin 2	ab15116	Kaninchen	Abcam
BACH1	abx322188	Kaninchen	Abnova
Calbindin	2173	Kaninchen	Cell Signaling Technology
GAPDH	2118	Kaninchen	Cell Signaling Technology
GCLC	PA1492	Kaninchen	BosterBio
CD13	ab108310	Kaninchen	Abcam
GSK3β	9315	Kaninchen	Cell Signaling Technology
GSK3β, phospho Ser9	9336	Kaninchen	Cell Signaling Technology
HO1	ab12343	Kaninchen	Abcam
Keap1	ab227828	Kaninchen	Abcam
Lamin B2	2328	Kaninchen	Cell Signaling Technology
MafK	GTX129240	Kaninchen	Gene Tex
NQO1	ab34173	Kaninchen	Abcam
Nrf2	sc-722	Kaninchen	Santa Cruz
Nrf2, phospho Ser40	ab76026	Kaninchen	Abcam
p47phox, phospho Ser328	orb256707	Kaninchen	Biorbyt
PARP	9542	Kaninchen	Cell Signaling Technology
PCNA	MAB424R	Maus	Merck
SOD1	GTX100554	Kaninchen	Gene Tex
TRXR1	GTX108727	Kaninchen	Gene Tex

## 3.1.7.2 Sekundärantikörper

Tabelle 3.6: Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper

Name	Bestellnummer	Spezies	Hersteller
anti-Kaninchen IgG, HRP-konjugiert		Ziege, anti-Kaninchen	Rockland Immunochemicals
anti-Maus IgG, HRP-konjugiert		Ziege, anti-Maus	Rockland Immunochemicals
anti-Kaninchen IgG, Biotin-konjugiert	ab6720	Ziege, anti-Kaninchen	Abcam
anti-Maus IgG, Biotin-konjugiert	ab6788	Ziege, anti-Maus	Abcam

## 3.1.8 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden für eine quantitative Echtzeit-PCR verwendet. Oligonukleotide wurden mit der Primer-Blast Software entworfen und gegen das Organismusgenom getestet, um die Amplifikation von unspezifischen Fragmenten zu vermeiden (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) und anschließend von Eurofins synthetisiert. Des Weiteren wurden Primer aus einem mit Sigma-Aldrich entworfenen PCR-Array verwendet. Die Primereffizienz für jeden Primer wurde getestet. Nur Primer mit einer Effizienz von 75-110 % und einem Ct-Wert unter 35 wurden für die Analysen verwendet. Die für die quantitative Echtzeit-PCR verwendeten Primer sind in Tabelle 3.7 aufgeführt.

Tabelle 3.7: Liste der für die quantitative Echtzeit-PCR verwendeten Primer

Zielgen	Primersequenz <i>forward</i> (5'-)	Primersequenz <i>reverse</i> (5'-)
<i>β-actin</i>	GCATTGCTGACAGGATGCAG	CCTGCTTGCTGATCCACATC
<i>αENaC</i>	TGCACCCTTAATCCTTACAGATACA	CCTGGCGAGTGTAGGAAGAG
<i>Apex1</i>	AGAAATTGACCTCCGTAACC	CGCCAACCAACATTCTTAGA
<i>Atm</i>	ACCAGAGGATGCTGTTCA	ATCATTAAAGTCTATGTTGAGTCCAA
<i>Brca1</i>	TTGTGAGCGTTTGAATGA	ACCTGGCTTAGTACTGT
<i>Gapdh</i>	TCTCCTGCGACTTCAACA	TCTCTTGCTCAGTGTCTT
<i>Gclm</i>	TTCTCGGGTGAGGTTTCTGC	AACGAGGGAGCTGTTTCTCTG
<i>Gpx1</i>	TTGGTGATTACTGGCTGC	TGATATTCAGCACTTTATTCTTAGTAG
<i>Gsk3β</i>	GCATTTATCATTAACTAGCACCTT	TGCTGCCATCTTTATCTCGCTA
<i>Ho1</i>	CCAGAGTCCCTCACAGAT	CCCAAGAGAAGAGAGCCA
<i>IL-6</i>	AGTTGCCTTCTTGGGACTGA	CAGAATTGCCATTGCACAA
<i>IL-10</i>	CATGGGTCTTGGGAAGAGAA	CATTCCCAGAGGAATTGCAT
<i>IL-17A</i>	TCTCCACCGCAATGAAGACC	AAAGTGAAGGGGCAGCTCTC
<i>Keap1</i>	ACGACGTGGAGACAGAGACC	ATCAATTTGCTTCCGACAGG
<i>Lig1</i>	ATTTTCGGGTTTGCCTCTC	ACCACTTGATTCTCTCTCTT

<i>Lig4</i>	GTGTCCTGATGCTTAGTTGT	GTGTCCTGATGCTTAGTTGT
<i>MR</i>	GCCAAGGCAGCTATGGAAAC	TTCGGAGTAGCACCGGAAAC
<i>Nox2</i>	GCGGTGTGCAGTGCTATCAT	GGTTCAGTGCCTGTTGCT
<i>Nqp1</i>	GGCCGATTCAGAGTGGCAT	CCAGACGGTTTCCAGACGTT
<i>Nrf2</i>	GCAACTCCAGAAGGAACAGG	AGGCATCTTGTTTGGCAATG
<i>Ogg1</i>	TGAGACTGCTGAGACAAGA	GGAAGCCATGATAAGTGACA
<i>Sod1</i>	ACCAGTTGTGTTGTCAGG	TTTCTTAGAGTGAGGATTAATAATGAG
<i>Romk</i>	GAACAGCACCCTCACTTGC	GCCAAGGCAGCTATGGAAAC
<i>Trxr1</i>	CAGTTCGTCCCAACGAAAAT	GCACATTGGTCTGCTCTTCA

Für die Genotypisierung der transgenen Mäuse wurden die in Tabelle 3.8 aufgeführten Oligonukleotide als Primer verwendet.

**Tabelle 3.8: Liste der für die Genotypisierung verwendeten Oligonukleotide**

<b>Primer</b>	<b>Primersequenz (5'-)</b>
Keap1 – 720s	CAGCAGTTAAGGGCACCAATGC
Keap1 – 925as	CCTGCCTCAGCTTCCCATCA
CKOg1	CAACGAGAAGCGCGATCACA
Cre1	ACGTTACCGGCATCAACGT
Cre2	CTGCATTACCGGTCGATGCA

### 3.1.9 Software

**Tabelle 3.9: Auflistung der verwendeten Software**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
BD Accuri™ C6 Plus	Becton, Dickinson and Company
Bio-Rad CFX Maestro 2.0	Bio-Rad Laboratories GmbH
Fusion Software Version 15.17	Vilber Lourmat Deutschland GmbH
GraphPad Prism 6	GraphPad
ImageLab 6.01	Bio-Rad Laboratories GmbH
LEGENDplex™ Data Analysis Software	BioLegend
Software ImageJ 1.483	National Institute of Health

## 3.2 Methoden

Die in 3.2.1 und 3.2.2 beschriebenen Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien der Europäischen Gemeinschaft zur Handhabung von Versuchstieren und dem deutschen Gesetz zum Schutz von Tieren durchgeführt (Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen, Aktenzeichen: 81-02.04.2017.A364).

### 3.2.1 Dosisversuch zur Lokalisation der Nrf2-Aktivierung und Ald-induzierter Nierenschäden

C57BL/6J-Mäuse wurden in einer Tierversuchsanlage in einem 12-stündigen Licht/Dunkel-Rhythmus bei konstanten Temperaturen ( $22 \pm 2$  °C) mit freiem Zugang zu Futter und Wasser gehalten. Im Alter von zehn Wochen wurden die Tiere randomisiert in 4 Gruppen zu je 5 Tieren aufgeteilt. Die Tiere wurden mit osmotischen Minipumpen (Alzet, Model 1004) ausgestattet. Für die Implantation wurden die Tiere unter Inhalationsanästhesie mittels Isofluran (1,5 – 2 %) über eine Begasungs-Anästhesie-Station gesetzt. Die Minipumpen wurden in eine am Nacken gebildete subkutane Tasche eingesetzt. Die Tasche wurde mit Michel Klammern (7,5 x 1,75 mm) verschlossen und die Tiere wurden bis zum Aufwachen aus der Narkose überwacht. Weiterhin wurde jedem Tier einmalig 5 mg/kg Carprofen subkutan gegen die postoperativen Schmerzen verabreicht. Die Minipumpen enthielten entweder Ald, sodass die Tiere in einer konstanten Rate über einen Behandlungszeitraum von 28 Tagen mit 75, 125 oder 250 µg/kg Körpergewicht (KG) x Tag infundiert wurden, oder 15 % EtOH in PBS als Lösungsmittelkontrolle. Weiterhin erhielten alle Tiere ab dem Tag der Pumpenimplantation eine 1 %-ige Natriumchloridlösung (NaCl) als Trinkwasser (Tabelle 3.10). Während des gesamten Versuchszeitraumes wurden regelmäßig nicht-invasive Blutdruckmessungen durchgeführt. Die Messungen erfolgten zwei Mal pro Woche über ein automatisiertes System (Blutdruckmessgerät BP Series II, Visitech Systems) an wachen Mäusen, bei denen eine Blutdruckmanschette um den Schwanz der Tiere gelegt wurde. Zwei Wochen vor der Implantation der Minipumpen wurden die Tiere an die Messungen gewöhnt, indem sie mehrmals pro Woche gemessen wurden. Die Blutdruckmessungen wurden für die Vergleichbarkeit der Messungen immer vormittags durchgeführt. Vor Beginn und am Ende der Behandlungsphase wurden die Mäuse für 23 Stunden zur Gewinnung von Sammelurin in Stoffwechsellkäfige gesetzt (Abbildung 3.1). Nach vierwöchiger Behandlung wurden die Mäuse mittels Injektionsnarkotika (8 mg/kg KG Xylazin und 120 mg/kg KG Ketamin) in tiefe Narkose versetzt und in Rückenlage fixiert. Nach dem Öffnen des Bauchraumes wurde die *Aorta abdominalis* freigelegt und zur Blutentnahme punktiert. Anschließend wurde der Brustkorb geöffnet und eine Perfusionskanüle in die untere Seite des linken Herzventrikels gestochen. Für den Beginn der Perfusion wurde die Aorta unterhalb der Nierenarterien durchtrennt. Für eine

Weitstellung der Gefäße wurden die Mäuse zunächst mit eiskaltem Deltadex 40 (10 % Dextran, 0,9 % NaCl, AlleMan Pharma GmbH), dem 1 % Procainhydrochlorid (10 % Procainhydrochlorid, bela-pharm) zugefügt wurde, für circa 2 min perfundiert. Anschließend erfolgte die weitere Perfusion mit einer eiskalten 0,9 %-igen Natriumchloridlösung (Fresenius Kabi Deutschland GmbH). Nach der Perfusion wurden beide Nieren, das Herz und die Leber entnommen und gewogen. Die Hälfte der rechten Niere, die Hälfte des Herzens und ein Teil der Leber wurden für circa 16 h in 4 %-iger Formaldehydlösung (Roti-Histofix) fixiert und anschließend in PBS überführt. Die Entwässerung der Gewebe erfolgte mit Hilfe des Autotechnikums des Institutes für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums Düsseldorf. Die Einbettung in Paraffin erfolgte an einer Einbettstation. Die linke Niere und die Hälfte der rechten Niere, sowie die andere Hälfte des Herzens und der Rest der Leber wurden mit Hilfe von flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.



Abbildung 3.1: Zeitlicher Verlauf der in 3.2.1 und 3.2.2 beschriebenen Tierversuche

Tabelle 3.10: Übersicht der Versuchsgruppen für den Dosisversuch

Gruppe	Pumpenfüllung	Trinkwasser	Tierzahl
Kontrolle	Lösungsmittel	1 % NaCl-Lösung	5
Niedrige Dosis	75 µg/kg x Tag Ald	1 % NaCl-Lösung	5
Mittlere Dosis	125 µg/kg x Tag Ald	1 % NaCl-Lösung	5
Hohe Dosis	250 µg/kg x Tag Ald	1 % NaCl-Lösung	5

### 3.2.2 Protektionsversuch zur Untersuchung der Relevanz der Nrf2-Aktivierung in der Protektion vor Aldosteron verursachten Nierenschäden

In diesem Tierversuch wurde sowohl mit wildtypischen C57BL/6J-Mäusen von Janvier Labs als auch mit transgenen Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der RWTH Aachen gearbeitet. Der Protektionsversuch entsprach in Bezug auf Haltung, Implantation der Minipumpen, Blutdruckmessungen und Perfusion der Durchführung des Dosisversuches (siehe 3.2.1). In einem Alter von durchschnittlich zwölf Wochen wurden 16

Nrf2<sup>†</sup>-Mäuse in zwei altersangepasste Gruppen zu je acht Tieren aufgeteilt. 32 C57BL/6J-Mäuse wurden ebenfalls im Alter von 12 Wochen in vier Gruppen zu je acht Tieren randomisiert eingeteilt. Die Mäuse wurden mit einer osmotischen Minipumpe ausgestattet, die entweder Ald in einer Konzentration von 125 µg/kg KG am Tag, oder 15 % EtOH in PBS als Lösungsmittelkontrolle, konstant über 28 Tage abgaben. Weiterhin erhielten alle Tiere ab dem Tag der Pumpenimplantation eine 1 %ige NaCl-Lösung als Trinkwasser. Je acht wildtypische Mäuse, die mit Ald oder Lösungsmittel infundiert wurden, erhielten zusätzlich 15 mg/kg Sulforaphan (Sulf) gelöst in der 1 %igen NaCl-Lösung. Leider fand die Berechnung der Sulf-Dosis unter der Annahme statt, dass die Tiere gleich viel trinken würden. Diese Annahme wurde aufgrund von vorherigen Ergebnissen an Ratten getroffen. Jedoch wurde nach dem Stoffwechselkäfigaufenthalt am Ende deutlich, dass sich die Trinkmenge der mit Sulf oder mit Ald+Sulf behandelten Mäuse unterschied. So erhielten zum Ende des Versuches hin die wildtypischen Sulf-Mäuse 5 mg/kg Sulf und die wildtypischen Ald+Sulf-Mäuse 20 mg/kg Sulf. Es ist davon auszugehen, dass der Effekt sich schleichend über die 4 Wochen aufgebaut hat. Für eine komplett unbehandelte Kontrolle (kein Salz im Trinkwasser) wurden 8 16 Wochen alte männliche Nrf2<sup>†</sup>-Mäuse verwendet, diese erhielten weder osmotische Minipumpen, noch wurden bei diesen der Blutdruck gemessen. Eine Übersicht der Versuchsgruppen ist in Tabelle 3.11 aufgeführt. Vor Beginn und kurz vor Ablauf der 28 Tage wurden die Tiere dieses Versuchs für 20 h in Stoffwechselkäfigen zur Gewinnung von Sammelurin gehalten. Nach 28 Tagen wurden die Tiere wie oben (3.2.1) beschrieben perfundiert. Wie unter 3.2.1 ausgeführt wurden für weitere Untersuchungen beide Nieren, Herz und Leber entnommen und entweder in 4 %-iger Formaldehydlösung für das Einbetten in Paraffin fixiert oder mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

**Tabelle 3.11: Übersicht der Versuchsgruppen für den Protektionsversuch**

Gruppe	Maus	Pumpenfüllung	Trinkwasser	Tierzahl
WT-K	C57BL/6J	Lösungsmittel	1 % NaCl-Lösung	8
WT-Sulf	C57BL/6J	Lösungsmittel	Sulforaphan in 1 % NaCl-Lösung	8
WT-Ald	C57BL/6J	125 µg/kg x Tag Ald	1 % NaCl-Lösung	8
WT-Ald+Sulf	C57BL/6J	125 µg/kg x Tag Ald	Sulforaphan in 1 % NaCl-Lösung	8
Nrf2 <sup>†</sup> -K	Nrf2 <sup>†</sup>	Lösungsmittel	1 % NaCl-Lösung	8
Nrf2 <sup>†</sup> -Ald	Nrf2 <sup>†</sup>	125 µg/kg x Tag Ald	1 % NaCl-Lösung	8
Nrf2 <sup>†</sup> kein Salz	Nrf2 <sup>†</sup>	-	Unbehandeltes Trinkwasser	8

### 3.2.3 Semiquantitative Untersuchungen der Nierenmorphologie / Histopathologie

Für eine Bewertung der histopathologischen Veränderungen in der Niere wurde eine Hälfte der rechten Niere in Paraffin eingebettet und am Mikrotom 3 µm dicke Schnitte hergestellt. Um die Morphologie der Niere zu beurteilen, wurde die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung, Perjodsäure-Schiff (PAS)-Färbung und Sirius-Rot (SR)-Färbung durchgeführt. Zur finalen Auswertung der histopathologischen Veränderungen wurden der Tubulointerstitielle Schädigungsindex (TSI), Glomeruloskleroseindex (GSI) und Mesangiolyseindex (MSI) herangezogen. Für die Färbung der Schnitte wurden diese nach einer einstündigen Inkubation im Trockenschrank bei 60 °C in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert (3x3 min Roti-Histol, 2x3 min 100 % EtOH, 2x3 min 96 % EtOH, 2x3 min, 70 % EtOH). Anschließend erfolgte die Färbung nach dem jeweiligen Standardprotokoll.

#### 3.2.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die HE-Färbung ist eine häufig genutzte Färbemethode, um mikroskopisch zwischen verschiedenen Gewebestrukturen zu differenzieren. Nach dem Entparaffinieren wurden die Schnitte für 4 min in der Hämatoxylin-Lösung inkubiert. Durch diesen Schritt wurden saure bzw. basophile Strukturen des Gewebes, wie Zellkerne, angefärbt. Nach dem 8-minütigen Bläuen der Schnitte unter Leitungswasser erhielten die Zellkerne durch den Anstieg des pH-Wertes ihre typische blaue Färbung. Anschließend erfolgte die Färbung mit Eosin für 2 min. Vor diesem Schritt wurden 2 Tropfen Essigsäure (100 %) auf 100 ml Eosin hinzugegeben. Das Eosin färbt acidophile bzw. basische Strukturen rot. Nach einem kurzen Waschen in dH<sub>2</sub>O wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und mit Entellan zur Konservierung eingedeckt.

#### 3.2.3.2 Periodjodsäure-Schiff-Färbung

Mit der PAS-Färbung werden Kohlenhydrate wie Glycogen und Glycolipide angefärbt. Aufgrund dieser Eigenschaft wird diese Färbung in der Histologie genutzt, um Bindegewebsfasern oder Basalmembranen mikroskopisch zu betrachten.

Nach dem Entparaffinieren wurden die Schnitte in Periodsäure (1 %) inkubiert, dies führte zu einer Oxidierung der Glycolgruppen zu zwei benachbarten Aldehydgruppen. Nach einem kurzen Waschen in dH<sub>2</sub>O wurden die Schnitte für 10 min bei 4 °C im Dunkeln in der Schiff's Reagenz inkubiert. Die fuchsin-schwefelige Säure in der Schiff's Reagenz bindet an die Aldehydgruppen und wechselt von farblos zu magentarot. Durch eine anschließende Inkubation in der Hämatoxylin-Lösung mit nachfolgendem Bläuen erfolgte eine Gegenfärbung der Zellkerne. Nach dem Entwässern wurden die Schnitte mit Entellan für eine längere Lagerung eingedeckt. Unter dem Lichtmikroskop betrachtet sind nach der PAS-Färbung die Zellkerne blauviolett, das Cytoplasma rosa bis bläulich und die Membranen magenta angefärbt.

### 3.2.3.3 Sirius-Rot-Färbung

Über die SR-Färbung kann Kollagen auf Gewebeschnitten angefärbt werden und so fibrotische Flächen lichtmikroskopisch sichtbar gemacht werden.

Hierfür wurden die Schnitte nach dem Entparaffinieren 6 min in Weigert's Eisenhämatoxylin inkubiert. Anschließend erfolgte nach dem 5-minütigen Wässern der Schnitte unter Leitungswasser eine Inkubation der Schnitte in der Sirius-Rot Färbelösung für 30 min. Nach der Entwässerung der Schnitte wurden diese zur Konservierung in Entellan eingedeckt. Nach erfolgreicher Durchführung der Färbung ist das Kollagen rot gefärbt, das normale Gewebe erscheint gelb.

### 3.2.3.4 Tubulointerstitieller Schädigungsindex (TSI)

Über den TSI kann das Tubulussystem sowie der interstitielle Raum der Nierenrinde bewertet werden. Der TSI setzt sich aus der Beurteilung der Entzündung mittels der HE-Färbung, der Atrophie der Basalmembran über die PAS-Färbung und der Fibrose mittels SR-Färbung zusammen. Bewertet wurden je 20 Gesichtsfelder pro Tier in 200-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop. Die Bewertung der Parameter erfolgte in Anlehnung an das in Tabelle 3.12 aufgeführte Bewertungsschema nach Veniant [158].

Der TSI wurde wie folgt berechnet:

$$\text{TSI} = \left( \left( \frac{(n \times S0) + (n \times S1) + (n \times S2) + (n \times S3) + (n \times S4) \text{Entzündung}}{20} \right) + \left( \frac{(n \times S0) + (n \times S1) + (n \times S2) + (n \times S3) + (n \times S4) \text{Atrophie}}{20} \right) + \left( \frac{(n \times S0) + (n \times S1) + (n \times S2) + (n \times S3) + (n \times S4) \text{Fibrose}}{20} \right) \right) / 3$$

n = Anzahl an Gesichtsfeldern in Stadium 0-4

S = Stadium 0-4

Tabelle 3.12: Stadien der tubulointerstitiellen Schädigung nach Veniant [158]

Stadium (Score)	Histologische Veränderung	Prozentualer Anteil (%)
0	Normales Tubulussystem	0
1	Zeichen von interstitieller Inflammation, Fibrose und tubulärer Atrophie	< 5
2	Zeichen von interstitieller Inflammation, Fibrose und tubulärer Atrophie	5-25
3	Zeichen von interstitieller Inflammation, Fibrose und tubulärer Atrophie	25-50
4	Zeichen von interstitieller Inflammation, Fibrose und tubulärer Atrophie	> 50

### 3.2.3.5 Glomeruloskleroseindex (GSI) und Mesangiolyseindex (MSI)

Mit Hilfe des GSI und des MSI können die morphologischen Veränderungen der Glomeruli in der Niere beurteilt werden. Während bei dem GSI die Proliferation von Mesangiumzellen und die Zunahme von mesangialer Matrix analysiert wird, wird bei dem MSI der Verlust an Mesangiumzellen und die daraus folgende Erweiterung von Kapillarschlingen beurteilt. Die Parameter wurden über die PAS-Färbung kalkuliert. Dafür wurden die Präparate unter dem Lichtmikroskop betrachtet und 50 Glomeruli bei einer 200-fachen Vergrößerung beurteilt. Da beide Parameter ineinander übergehen und gleichzeitig auftreten können, wurden diese auch parallel ausgewertet. Die Beurteilung der Glomeruli erfolgte nach einer Methode von El Nahas [159]. Das verwendete Bewertungsschema ist in Tabelle 3.13 aufgeführt.

Der GSI oder MSI wurde wie folgt kalkuliert:

$$\text{GSI oder MSI} = \frac{(n \times S0) + (n \times S1) + (n \times S2) + (n \times S3) + (n \times S4)}{50}$$

n = Anzahl der Glomeruli

S = Stadium 0-4

Tabelle 3.13: Stadien der Glomerulosklerose und Mesangiolyse nach El Nahas [159]

Stadium (Score)	Histologische Veränderungen		Prozentualer Anteil (%)
	GSI	MSI	
0	Normales Glomerulum	Keine Veränderungen der Kapillaren	0
1	Mesangiale Verdickung mit/ohne Proliferation von Mesangiumzellen, keine Kapillarbeteiligung	Erweiterung einzelner Kapillaren	< 25
2	Mesangiale Proliferation mit partieller Gefäßwandbeteiligung, segmentale Sklerose	Erweiterung von Kapillaren >25% oder Kapillaraneurysma bis 50 %	25-50
3	Große Teile der Kapillaren mit Obliteration oder Narbenformation, diffuse Sklerose	Kapillaraneurysma	50-75
4	Totale Obliteration der Kapillaren mit/ohne Kapillarthrombose, globale Sklerose mit Kapillarkollaps	Kapillaraneurysma	> 75

### 3.2.4 Immunhistochemie

In der Immunhistochemie werden mit Hilfe von Antikörpern Proteine auf Gewebeschnitten lokalisiert. Zuerst bindet ein spezifischer Primärantikörper an das zu untersuchende Antigen bzw. Protein. Anschließend bindet ein Sekundärantikörper an den Primärantikörper. Dieser ist entweder mit einem fluoreszierendem Konjugat gekoppelt oder biotinyliert. Der biotinylierte Sekundärantikörper ist mit einer Peroxidase gekoppelt, welche nach Zugabe eines Substrates ein farbiges Präzipitat bildet, sodass die Lokalisation des zu untersuchenden Proteins sichtbar wird. Um die Sensitivität einer Färbung zu erhöhen oder das Signal der Antikörper zu verstärken, können verschiedene Detektionssysteme verwendet werden. Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Signalamplifikation mit Hilfe eines Avidin-Biotin-Komplexes (ABC) und Tyramid-basierten Systemen durchgeführt.

#### 3.2.4.1 Visualisierung mittels Avidin-Biotin-Komplex

Alle Schritte erfolgten, sofern nicht anders beschrieben, bei Raumtemperatur (RT). Zwischen den einzelnen Schritten erfolgte jeweils das Waschen in Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS). 3 µm dicke Paraffinschnitte wurden zunächst bei 60 °C für eine Stunde im Trockenschrank getrocknet. Anschließend erfolgte das Entparaffinieren der Schnitte über eine absteigende Alkoholreihe (3x3 min Roti-Histol, 2x3 min 100 % EtOH, 2x3 min 96 % EtOH, 2x3 min 70 % EtOH). Um die durch die Fixierung verursachte Quervernetzung der Proteine aufzubrechen und die Epitope für die Primärantikörper wieder zugänglich zu

machen, wurde eine Antigenmaskierung durchgeführt. Die Demaskierung erfolgte im Citratpuffer (DAKO Target Retrieval Solution, pH 6, Agilent Technologies) für 30 min im Dampfgarer. Ein Abkühlen der Schnitte wurde anschließend für 30 min im Citratpuffer durchgeführt. Um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden und die Spezifität der Färbung zu erhöhen, wurden die Schnitte für eine Stunde mit einer Blockierlösung (DAKO Protein Block Serum-Free, Agilent Technologies) inkubiert. Anschließend erfolgte das Absättigen der endogenen Peroxidasen mit einer 3 %-igen  $H_2O_2$ -Lösung für 15 min. Für die Absättigung des auf dem Gewebe vorhandenen Biotins wurden die Schnitte zuerst für 15 min mit einer 0,001 %-igen Avidinlösung und anschließend mit einer 0,001 %-igen Biotinlösung inkubiert. Mit dem Primärantikörper wurde in der entsprechenden Verdünnung ( $\gamma$ H2AX 1:200 in Signal Stain, NQO1 1:500 in PBS, PCNA 1:1000 in PBS) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde der biotinylierte Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:200 in PBS für 45 min auf den Schnitten inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurde das ABC-Reagenz (Vectastain Elite ABC Kit, PK-6100, Vector Laboratories) hergestellt. Dieses besteht aus einer Mischung aus Avidin und einer biotinylierten Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP). Anschließend folgte eine 30-minütige Inkubation mit dem ABC-Reagenz. Die Visualisierung erfolgte mit Hilfe des 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Reagenz (DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit, SK-4100, Vector Laboratories). Während der Visualisierung wird DAB in Anwesenheit von  $H_2O_2$  über die HRP in ein braunes Chromogen umgesetzt (Abbildung 3.2). Die Inkubationszeit variierte je nach dem verwendeten Primärantikörper. Die Schnitte wurden nachfolgend zuerst in Leitungswasser und danach in  $dH_2O$  gewaschen. Zuletzt erfolgte eine Gegenfärbung der Kerne in der Hämatoxylin-Lösung mit anschließendem Bläuen für 5 min unter Leitungswasser. Zur Konservierung der Färbung wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe inkubiert (2x3 min 70 % EtOH, 2x3 min 96 % EtOH, 2x3 min 100 % EtOH, 3x3 min Roti-Histol) und mit Entellan eingedeckt. Die Bilder der Färbungen wurden am Lichtmikroskop bei einer 200-fachen Vergrößerung angefertigt.

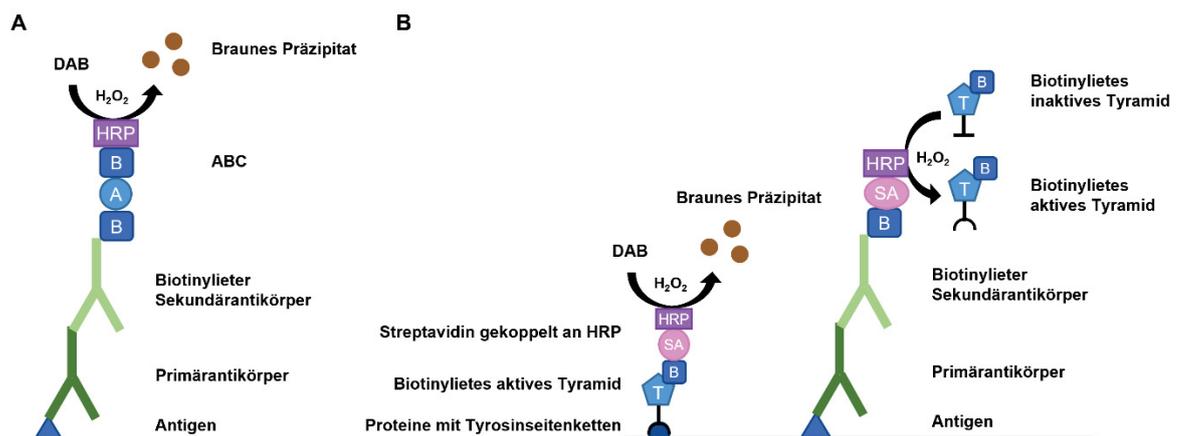
#### 3.2.4.2 Visualisierung mittels Tyramid-Signal-Amplifikation

Die Verstärkung des Signals mittels Tyramid-Signal-Amplifikation (TSA) bietet die Möglichkeit, die Sensitivität der Färbung noch weiter zu erhöhen und so besonders schwache Signale erfolgreich zu detektieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden das TSA-Biotin-Kit (NEL700A001) von Perkin Elmer und das *Tyramide Amplification Kit* (33020) von Biotium verwendet.

Alle Schritte bis hin zur Inkubation des Primärantikörpers erfolgten wie in 3.2.4.1 beschrieben. Zum Waschen wurde jedoch Tris-NaCl-Tween 20 (TNT)-Puffer verwendet und zum Blockieren Tris-NaCl-Blocking (TNB)-Puffer genutzt. Die Primärantikörper wurden

in ihrer entsprechenden Verdünnung (Nrf2 1:500 in PBS, pNrf2 1:1000 in PBS) über Nacht bei 4 °C auf den Schnitten inkubiert.

Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit dem entsprechenden biotinylierten Sekundärantikörper (1:200 in TNB) für 45 min inkubiert. Danach folgte die Inkubation mit Streptavidin-HRP (1:100 oder 1:200 in TNB) für 30 min, gefolgt von der Inkubation mit dem Tyramid-Amplifizierungsreagenz für 10 min. Das inaktive biotinylierte Tyramid wird in Anwesenheit von  $H_2O_2$  über die HRP aktiviert und bindet an Tyrosinseitenketten von benachbarten Proteinen. Diese Reaktion bildet den ersten Schritt: Signalamplifizierung. Das Tyramid wurde für die Amplifizierung 1:50 oder 1:500 in dem jeweiligen Puffer des Kits verdünnt. Für eine weitere Verstärkung des Signals wurden die Schnitte abermals mit Streptavidin-HRP (1:100 oder 1:200 in TNB) für 30 min inkubiert. Die Visualisierung mit DAB und alle weiteren Schritte erfolgten wie bereits in 3.2.4.1 beschrieben, jedoch wurde das DAB-Reagenz 1:2 in  $dH_2O$  verdünnt. Das Prinzip der Amplifizierung ist in Abbildung 3.2 dargestellt. Bilder der Schnitte wurden am Lichtmikroskop in einer 200-fachen Vergrößerung aufgenommen.



**Abbildung 3.2: Immunhistochemischer Nachweis von Proteinen. A:** Amplifizierung mit dem ABC-Reagenz: Der Primärantikörper bindet an das zu untersuchende Antigen. Der biotinylierte Sekundärantikörper bindet wiederum an den Primärantikörper. Der ABC (Avidin-Biotin-Komplex, konjugiert mit HRP) bindet aufgrund der hohen Affinität des Avidins an das Biotin des Sekundärantikörpers. Anschließend erfolgt die indirekte Visualisierung des Antigens mittels DAB. Das DAB wird in Anwesenheit von  $H_2O_2$  von der HRP zu einem braunen Präzipitat umgesetzt. **B:** Amplifizierung mit der Tyramid-Amplifikation: An den biotinylierten Sekundärantikörper bindet das HRP-gekoppelte Streptavidin. Das hinzugegebene biotinylierte Tyramid wird in Anwesenheit von  $H_2O_2$  aktiviert und bindet an benachbarte Proteine mit Tyrosinseitenketten. An das Biotin des Tyramids bindet das HRP-gekoppelte Streptavidin. Anschließend erfolgt die indirekte Visualisierung des Antigens mittels DAB. Das DAB wird in Anwesenheit von  $H_2O_2$  von der HRP zu einem braunen Präzipitat umgesetzt. A: Avidin, B: Biotin, DAB: Diaminobenzidin, HRP: Meerrettichperoxidase, SA: Streptavidin, T: Tyramid.

### 3.2.4.3 Immunhistochemische Doppelfärbung

Für die Lokalisation von  $\gamma H2AX$  (phosphoryliertes Histon 2AX an Serin 139) und pNrf2 in der Niere wurde eine Doppelfärbung durchgeführt, um zwischen den verschiedenen Nierenzelltypen unterscheiden zu können. Für das jeweils erste Antigen ( $\gamma H2AX$  oder pNrf2) wurde die Färbung wie bereits in 3.2.4.1 (für  $\gamma H2AX$ ) oder 3.2.4.2 (für pNrf2) beschrieben durchgeführt. Nach der Visualisierung des Antigens über die DAB-Reaktion

wurde das Färbeprotokoll der Visualisierung mit dem ABC-Reagenz mit den Primärantikörpern zur Markierung verschiedener Nierenzelltypen verwendet. Zur Identifikation von proximalen Tubuluszellen wurde ein Primärantikörper gegen CD13 verwendet [160]. Distale Tubuluszellen und Zellen des frühen Sammelrohres wurden mit Hilfe eines Antikörpers gegen Calbindin identifiziert [161]. Späte distale Tubuluszellen und Zellen des Sammelrohres wurden mit einem Antikörper gegen Aquaporin 2 markiert [162]. Für die Visualisierung des zweiten Antigens wurde das Vector VIP-Reagenz (VECTOR® VIP Peroxidase Substrate Kit, Vector Laboratories) verwendet. Während der Visualisierung wird Vector VIP in Anwesenheit von  $H_2O_2$  über die HRP in ein violette Chromogen umgesetzt. Die Schnitte wurden anschließend mit Hämatoxylin gegengefärbt und über eine absteigende Alkoholreihe (10x in 96 % EtOH dippen, 2x3 min 100 % EtOH, 3x3 min Roti-Histol) entwässert. Anschließend wurden die Schnitte zur Konservierung mit Entellan eingedeckt. Bilder der Doppelfärbungen wurden am Lichtmikroskop in 400-facher Vergrößerung angefertigt.

Im Protektionsversuch wurde nur die pNrf2-Calbindin-Doppelfärbung durchgeführt. Bei dieser Doppelfärbung wurden die weiteren untersuchten Kompartimente des Tubulusystems im Cortex anhand ihrer Struktur identifiziert. Proximale Tubuli wurden anhand des Bürstensaumes und die Sammelrohre anhand ihres Lumens und Calbindin-negativer Zellen identifiziert. Wie in den Doppelfärbungen zuvor konnten die Glomeruli anhand ihrer einzigartigen Struktur bestimmt werden.

#### 3.2.4.4 Detektion von 8-oxodG mittels TSA-Amplifizierung

8-Oxo-2'-Deoxyguanosin (8-oxodG) ist ein oxidiertes Derivat des Nucleosides Deoxyguanosin. 8-oxodG entsteht über die Oxidierung von Guanosin durch reaktive Sauerstoffspezies. Die Detektion der Basenmodifikation 8-oxodG dient daher als Marker für durch oxidativen Stress verursachte DNA-Schäden im Gewebe bzw. der Zelle.

Die Färbung von 8-oxodG erfolgte nach dem Prinzip der Amplifizierung mit TSA, jedoch mit einigen zusätzlichen Schritten und Abwandlungen. Nach dem Trocknen der Schnitte bei 60 °C, Entparaffinieren und Inkubation mit 3 %-igem  $H_2O_2$  (30 %-iges  $H_2O_2$  verdünnt mit Methanol) zum Absättigen der endogenen Peroxidase, folgte die Demaskierung im Citratpuffer (siehe 3.2.4.2) für 15 min. Anschließend kühlten die Schnitte für weitere 20 min im Citratpuffer ab. Nach einem kurzen Waschen in  $dH_2O$  wurden die Schnitte für 20 min bei 37 °C mit 2 N HCl inkubiert. Nach einem erneuten Waschen in  $dH_2O$  folgte ein RNase-Verdau (200  $\mu\text{g/ml}$ ) für eine Stunde bei 37 °C und ein Pepsin-Verdau (0,2 % in  $dH_2O$ , Sigma Aldrich) für 10 min bei RT mit anschließender Inkubation für 20 min bei 37 °C. Für die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Schnitte zuerst für 30 min mit 3 % Bovines Serumalbumin (BSA, verdünnt in PBS) und folgend mit TNB für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach folgte eine jeweils 15-minütige Inkubation mit 0,001 % Avidin und

Biotin bei RT. Die Inkubation des Primärantikörpers wurde über Nacht bei 4°C und einer Verdünnung von 1:1000 in 3 % BSA durchgeführt. Alle weiteren Schritte nach dem Primärantikörper entsprachen der in 3.2.4.4 beschriebenen Durchführung. Die Bilder der Färbung wurden am Lichtmikroskop in einer 200-fachen Vergrößerung aufgenommen.

#### 3.2.4.5 Quantifizierung

Die Quantifizierung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte mit Hilfe des Programmes ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Für die Auswertung der Bilder wurden entweder die Anzahl der positiven Kerne auf die Gesamtzellzahl oder die positive Fläche auf die Gesamtfläche des Gewebes bezogen. Bei den Doppelfärbungen wurden nur die Kerne in den entsprechenden gegengefärbten spezifischen Nierenzellen berücksichtigt.

#### 3.2.5 Dihydroethidium-Färbung

Das Fluorophor Dihydroethidium (DHE) wurde in dieser Arbeit verwendet, um die Anwesenheit von ROS in der Niere nachzuweisen. In Anwesenheit von ROS wird das Fluorophor DHE in seine oxidierte Form Ethidium umgewandelt, welche in die DNA interkalieren kann. Nach der Interkalation ändert sich die Fluoreszenz von Blau zu Rot und kann am Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Für die Färbung wurden 8 µm dicke Gefrierschnitte der Nieren am Kryotom angefertigt. Bis zur Verwendung wurden diese bei -80 °C gelagert. Die Gefrierschnitte wurden für die Färbung 20 min im Dunkeln mit 10 µM DHE in dH<sub>2</sub>O inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte direkt mit dem Fluoreszenzmikroskop bei einer 200-fachen Vergrößerung fotografiert. 20 Bilder pro Tier wurden mit ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) ausgewertet. Für die Auswertung wurde die Fluoreszenzintensität des Gewebes pro Bild gemessen.

#### 3.2.6 TUNEL-Assay

Über den TUNEL-Assay (*TdT-mediated dUTP-Flourescein nick end labeling*; TdT = *terminal desoxynucleotidyl transferase*) kann Apoptose auf Einzelzellebene detektiert werden. Während der Apoptose wird die DNA fragmentiert, was zu freien Hydroxylgruppen innerhalb der DNA-Strangbrüche führt. Die freien Hydroxylgruppen werden durch Markierung mit modifizierten Nukleotiden über eine enzymatische Reaktion nachgewiesen [163]. Für die Markierung apoptotischer Zellen auf Paraffinschnitten der Niere wurde das *In Situ* Cell Death Detection Kit (Roche) verwendet. Dieses Kit enthält das Enzym TdT, welches die Polymerisation des modifizierten Nukleotids Fluorescein-Desoxyuridin-Triphosphat (dUTP) an die freien Hydroxylgruppen katalysiert. Das modifizierte Nukleotid kann unter dem Mikroskop sichtbar gemacht werden.

Zur Durchführung des Assays wurden die Schnitte zunächst bei 60 °C für eine Stunde getrocknet und, wie bereits in 3.2.4.1 beschrieben, entparaffiniert. Anschließend erfolgte ein Proteinverdau mittels Proteinase K von Qiagen (20 µg/ml in 10 mM Tris-HCl; pH 7,4)

für 30 min bei RT. Nach dem Waschen mit PBS wurden ein Schnitt als Positivkontrolle mit 150U/ml DNase (Qiagen) für 7,5 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte für alle Schnitte die Behandlung mit der *Labeling Solution* (5 µl *Enzyme-Solution* + 45 µl *Labeling-Solution* pro Schnitt) für eine Stunde im Dunkeln, bei der die apoptotischen Zellen über die TdT und Fluorescein-dUTP markiert wurden. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Schnitte mit VECTASHIELD® *Antifade Mounting Medium* mit DAPI (Vector Laboratories) eingedeckt und mit Nagellack versiegelt. Fluoreszenzbilder wurden mit dem Fluoreszenz-Mikroskop Olympus BX43 in 200-facher Vergrößerung aufgenommen und mit ImageJ analysiert. Für die Auswertung wurden die TUNEL-positiven Zellen auf die Gesamtzellzahl bezogen.

### 3.2.7 Kolorimetrische Messung von Kreatinin

Die kolorimetrische Bestimmung von Kreatinin im Serum und Urin erfolgte in Anlehnung an die Jaffe-Reaktion mit dem *Creatinine urinary/serum Colorimetric Assay Kit* (700460/500701, Cayman Chemical Company). Bei der Jaffe-Reaktion kommt es zu einem gelb/orangen Farbumschlag, wenn der Metabolit mit Pikrinsäure inkubiert wird [164]. Die Intensität des Farbumschlags ist dabei proportional zur Kreatinin-Konzentration in Serum oder Urin.

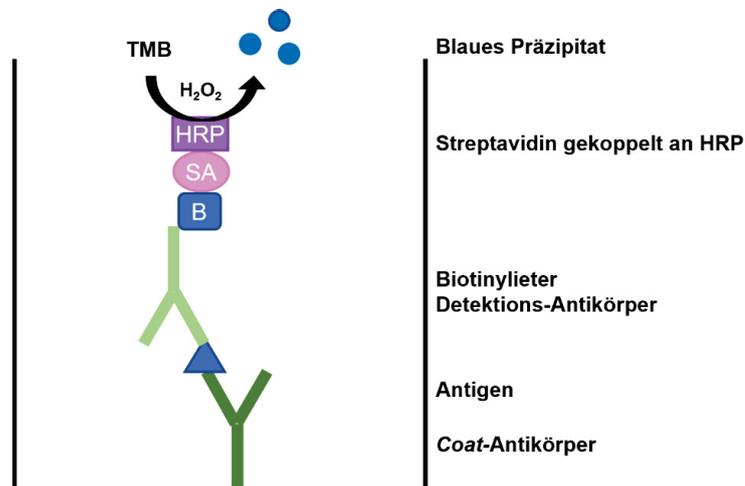
Für die Durchführung der Assays wurde jeweils der am Versuchsende gewonnene Sammelurin und das Serum verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Zuerst wurde eine Kreatinin-Standardreihe hergestellt und in die verwendete Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurde dasselbe Volumen an Probe in die Platte gegeben. Das Serum wurde unverdünnt und die Urinproben wurden 1:10 in dH<sub>2</sub>O verdünnt eingesetzt. Über die Zugabe der *Alkaline Picrate Solution* kam es zu einem Farbumschlag. Die Absorption wurde initial und nach 7 (Serum) oder 20 (Urin) min bei 490 nm im Photospektrometer Sunrise™ gemessen.

### 3.2.8 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Der ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) ist ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren zur Konzentrationsbestimmung von verschiedenen Stoffen. Der Nachweis des Antigens erfolgt über einen Farbumschlag, der entweder fluorimetrisch oder kolorimetrisch gemessen wird. Bei diesem Verfahren ist der Primärantikörper, der spezifisch für das nachzuweisende Antigen ist, an die Mikrotiterplatte gebunden. Das spezifische Antigen bindet an diesen und wird über eine enzymatische Farbreaktion nachgewiesen. Die am häufigsten verwendeten ELISA-Techniken sind der Sandwich-ELISA und der kompetitive ELISA. Für die ELISAs wurde, wenn nicht anders erwähnt, entweder der am Versuchsende gewonnene Sammelurin oder das bei der Perfusion gewonnene Serum genutzt (siehe 3.2.1 und 3.2.2).

### 3.2.8.1 Sandwich-ELISA

Bei dem Sandwich-ELISA bindet das nachzuweisende Antigen zunächst an den auf der Mikrotiterplatte gebundenen spezifischen *coat*-Antikörper. Nachfolgend bindet der biotinylierte Detektions-Antikörper an eine andere Stelle des nachzuweisenden Antigens. Anschließend bindet an das Biotin des Detektions-Antikörpers ein Streptavidin-HRP-Konjugat, welches das Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) zu einem blauen Präzipitat umwandelt. Nach Zugabe einer Säure wird die Reaktion gestoppt und das Präzipitat kann an einem Photometer kolorimetrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen werden. Das Prinzip des Sandwich-ELISA ist in Abbildung 3.3 exemplarisch dargestellt und fand Anwendung für die Messung von Albumin, Neutrophilengelatinase assoziiertem Lipocalin (NGAL), *kidney injury molecule-1* (KIM-1),  $\alpha$ -Glutathion-S-Transferase ( $\alpha$ GST) und Glutathion-S-Transferase Pi (GST-Pi).



**Abbildung 3.3: Prinzip des Sandwich-ELISA.** Die Vertiefung der Mikrotiterplatte ist mit einem *Coat*-Antikörper beschichtet, welcher spezifisch für das zu untersuchende Antigen ist. An das gebundene Antigen binden ein biotinylierter Detektions-Antikörper, welcher an eine andere Stelle des Antigens bindet. An den Detektions-Antikörper bindet Streptavidin gekoppelt mit HRP. In Anwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> setzt die Peroxidase das Substrat TMB in ein blaues Präzipitat um. B: Biotin, ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, HRP: Meerrettichperoxidase, SA: Streptavidin, TMB: Tetramethylbenzidin.

#### 3.2.8.1.1 Albumin-Bestimmung im Urin

Für die Bestimmung von Albumin wurde der Sammelurin der verwendeten Mäuse zum jeweiligen Versuchsende genutzt. Genutzt wurde das AssayMax™ Mouse Albumin ELISA Kit (Assaypro LLC) nach den Herstellerangaben bei RT. Zuerst wurde die Albumin - Standardreihe, sowie Waschpuffer und *MIX Diluent* hergestellt. Anschließend wurden die Proben in *MIX Diluent* verdünnt. 50 µl des Standards oder der Proben wurden in die mit dem *coat*-Antikörper gegen Albumin beschichteten Vertiefungen pipettiert und für 2 h inkubiert. Nach dem Waschen erfolgte die Inkubation mit dem biotinylierten Antikörper für 1 h, gefolgt von einer einstündigen Inkubation mit dem *SP Conjugate*. Der Nachweis von Albumin erfolgte über die Zugabe von TMB für 20 min. Die Reaktion wurde anschließend

mit 0,5 N Salzsäure gestoppt und die Absorption bei 450 nm am Photospektrometer Sunrise™ gemessen.

#### 3.2.8.1.2 NGAL-Bestimmung im Urin

Über das Mouse NGAL ELISA Kit (BioPorto Diagnostics A/S) erfolgte die Konzentrationsbestimmung von NGAL im Sammelurin. Die Durchführung erfolgte nach den Herstellerangaben und bei RT. Nach Herstellung der Standardreihe und Verdünnung der Proben 1:1000 in 1x *Sample Diluent* wurden 100 µl des Standards und der verdünnten Proben in die Vertiefungen gegeben und für 1 h inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen zum Entfernen ungebundener Substanzen wurde das gebundene NGAL mit einem Biotin gekoppelten spezifischen Antikörper für 1 h markiert. Nach erneutem Waschen folgte die Inkubation mit dem HRP-Streptavidin-Konjugat für eine weitere Stunde. Der enzymatische Nachweis von NGAL erfolgte mit TMB für 10 min und wurde durch die Zugabe von 0,5 M Schwefelsäure gestoppt. Die Absorption wurde am Photospektrometer Sunrise™ bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

#### 3.2.8.1.3 KIM-1-Bestimmung im Urin

Für den Nachweis von KIM-1 im Sammelurin der in 3.2.2 verwendeten Mäuse wurde das Mouse KIM1 / TIM1 ELISA Kit PicoKine™ (Boster Bio) verwendet. Die jeweiligen Inkubationsschritte erfolgten bei 37 °C im Wärmeschrank. Der Standard wurde nach Herstellerangaben hergestellt und die Urinproben 1:2 in *Sample Diluent* verdünnt. Je 100 µl des Standards oder der Proben wurde in die mit Antikörpern beschichteten Vertiefungen pipettiert und für 2 h inkubiert. Nach dem Abkippen der nichtgebundenen Substanzen und dreimaligem Waschen erfolgte eine Inkubation mit einem biotinylierten Antikörper spezifisch für KIM-1 für eine weitere Stunde, gefolgt von der Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex für 1 h. Die Nachweisreaktion wurde mit der Zugabe von TMB gestartet und nach 25 min mit der Zugabe der *Stop Solution* gestoppt. Die Absorption wurde am Photospektrometer Sunrise™ bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

#### 3.2.8.1.4 Bestimmung von $\alpha$ -Glutathion-S-Transferase in der Niere

Für die Bestimmung der  $\alpha$ GST wurden Gesamtproteinisolate aus der Niere der in 3.2.2 verwendeten Mäuse genutzt. Das Mouse Alpha GST ELISA Kit (LifeSpan BioSciences) wurde nach den Herstellerangaben verwendet. Alle hier beschriebenen Inkubationsschritte erfolgten bei 37 °C im Wärmeschrank. Für die  $\alpha$ GST-Bestimmung wurden 50 µg Protein pro Probe eingesetzt. Die Vertiefungen wurden zuerst mit Waschpuffer gewaschen und anschließend je 100 µl des Standards oder der Proben in die beschichteten Vertiefungen überführt und für 90 min inkubiert. Anschließend erfolgte nach dem Waschen die Inkubation mit dem Detektions-Antikörper für 1 h, gefolgt von der Inkubation mit dem HRP-Streptavidin-Konjugat für 30 min. Der Nachweis von  $\alpha$ GST erfolgte über die Inkubation mit

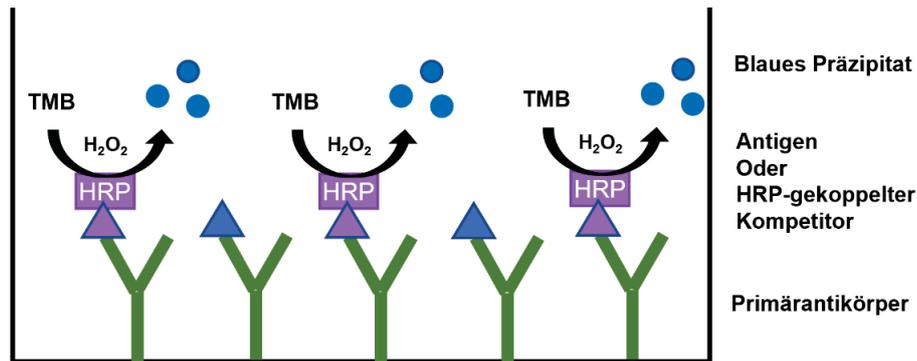
dem Substrat TMB. Nach der sichtbaren Bildung des blauen Präzipitats über die HRP wurde die Reaktion mit der im Kit mitgelieferten Stopplösung nach 20 min beendet. Anschließend wurde die optische Dichte jeder Vertiefung am Photospektrometer Sunrise™ bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt.

#### 3.2.8.1.5 Bestimmung von Glutathion-S-Transferase Pi in der Niere

Der Nachweis von GST-Pi erfolgte über das Mouse Alpha GSTP1/GST Pi ELISA Kit (LifeSpan BioSciences). Für die Konzentrationsbestimmung wurden dieselben Proteinisolate wie in 3.2.8.1.4 verwendet. Die Herstellung der GST-Pi Standardreihe erfolgte nach den Herstellerangaben. Die Versuchsaufbau war identisch mit der Messung von  $\alpha$ GST, mit dem Unterschied, dass die Proben zu Anfang für 2 h inkubiert wurden und die Vertiefungen vor der Zugabe des Detektions-Antikörpers nicht gewaschen wurden.

#### 3.2.8.2 Kompetitiver ELISA

Der kompetitive ELISA basiert ebenfalls auf der Antikörper-Antigenbindung. Auch bei diesem Testprinzip sind die Vertiefungen der Mikrotiterplatten mit einem Antikörper, spezifisch für das nachzuweisende Antigen, beschichtet. Mit der Inkubation des in den Proben vorhandenen Antigens erfolgt außerdem die Co-Inkubation mit einem HRP-markierten Kompetitor-Antigen. Dabei konkurrieren das in der Probe vorhandene Antigen und das Kompetitor-Antigen um die freien Bindungsstellen des Antikörpers. Eine Zugabe eines Sekundärantikörpers ist bei dieser Art von ELISA nicht notwendig. Der Nachweis erfolgt über die Zugabe des Substrates TMB, welches von der HRP zu einem blauen Präzipitat umgewandelt wird. Die Reaktion wird, wie bei dem Sandwich-ELISA, durch die Zugabe einer Säure gestoppt und die Absorption am Photometer gemessen. Die gemessene Absorption der Proben ist bei dem kompetitiven ELISA umgekehrt proportional zur Antigen-Konzentration. Das Testprinzip des kompetitiven ELISAs ist in Abbildung 3.4 dargestellt und fand Anwendung für den Nachweis von Aldosteron, 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosin (8-OHdG) und 15-Isoprostan F<sub>2t</sub>.



**Abbildung 3.4: Prinzip des kompetitiven ELISA.** Die Mikrotiterplatte ist mit einem für das Antigen spezifischen Antikörper beschichtet. Das Antigen konkurriert mit dem HRP-gekoppelten Kompetitor um die freie Bindungsstelle. Die gekoppelte HRP setzt das Substrat TMB in Anwesenheit von  $H_2O_2$  in ein blaues Präzipitat um. ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, HRP: Meerrettichperoxidase, TMB: Tetramethylbenzidin.

#### 3.2.8.2.1 Bestimmung von Aldosteron im Serum

Die Bestimmung der Aldosteron-Konzentration im Serum erfolgte mit dem Aldosteron ELISA von BIOTREND. Zu Beginn wurde die Standardreihe und der Waschpuffer nach Herstellerangaben vorbereitet. Der Standard oder das Serum wurden in die mit Antikörper beschichteten Vertiefungen pipettiert. Anschließend wurde das Aldosteron-HRP-Konjugat hinzugefügt und das Gemisch für 1 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen folgte das TMB-Substrat für 20 min. Zum Stoppen der enzymatischen Reaktion wurde in die Wells 1 M Schwefelsäure pipettiert und die Absorption der Proben am Photospektrometer Sunrise™ bei 450 nm gemessen.

#### 3.2.8.2.2 Bestimmung von 8-OHdG im Urin

Für den Nachweis der Basenmodifikation 8-OHdG wurde das DNA Damage (8-OHdG) ELISA Kit (StressMarq Biosciences) verwendet. Vor dem Start des ELISA wurden die Proben entsprechend den Herstellerangaben verdünnt und die 8-OHdG-Standardreihe hergestellt. Bei diesem ELISA waren die Vertiefungen mit der modifizierten Base 8-OHdG beschichtet; aufgrund dessen folgte nach dem Pipettieren des Standards und der Proben ein HRP-gekoppelter Antikörper gegen 8-OHdG. In diesem Assay fungierte also das beschichtete 8-OHdG als Kompetitor. Nach dem Waschen war so nur noch der an 8-OHdG gebundene Antikörper vorhanden. Je mehr 8-OHdG in der Urinprobe gelöst war, desto weniger Antikörper konnte an das beschichtete Antigen binden. Der Nachweis des gebundenen Antikörpers erfolgte über die Reaktion mit dem Substrat TMB. Nach 30 min wurde die Reaktion mit der im Kit enthaltenen Stopplösung gestoppt und die Absorption am Photospektrometer Sunrise™ bei 450 nm gemessen.

#### 3.2.8.2.3 Bestimmung von 15-Isoprostan $F_{2t}$ im Urin

Um die 15-Isoprostan  $F_{2t}$  Konzentration im Sammelurin der Mäuse zu bestimmen, wurde das Urinary Isoprostane ELISA Kit (Oxford Biomedical Research) verwendet. Zu Beginn

wurde die 15-Isoprostan  $F_{2t}$  Standardreihe hergestellt und die Proben nach Herstellerempfehlung mit  $\beta$ -Glucuronidase inkubiert. Diese Behandlung ermöglichte es, nicht nur das freie, sondern auch das an Glucuronsäure gebundene Isoprostan für eine genauere Bestimmung des oxidativen Stressmarkers, zu messen. Anschließend wurden die Urinproben 1:4 verdünnt und mit dem 15-Isoprostan  $F_{2t}$ -HRP-Konjugat in der mit dem Antikörper beschichteten Mikrotiterplatte für 2 h inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen folgte eine Inkubation mit dem TMB-Substrat. Die Reaktion wurde mit der Zugabe von 3 M Schwefelsäure gestoppt und die Absorption am Photospektrometer bei 450 nm bestimmt.

### 3.2.9 Molekularbiologische Methoden

#### 3.2.9.1 RNA-Extraktion

Die Isolation der RNA aus dem Nierengewebe erfolgte mit Hilfe des QIAcube unter Benutzung des RNeasy® MiniKit (Qiagen) nach Herstellerangaben. Für die RNA-Isolation wurden 15-25 mg der rechten schockgefrorenen Niere verwendet. In einem Reaktionsgefäß wurde die Niere mit RLT-Puffer/ 1 % Dithiothreitol versetzt und im Tissue Lyser II für 60 s bei 30 Hz homogenisiert. Das Lysat wurde anschließend auf QIA-Shredder-Säulen überführt und zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 70 % EtOH versetzt und auf eine RNeasy-Spin-Säule pipettiert und zentrifugiert. Nach einem DNase I-Verdau und Waschen folgte die Elution der RNA mit 50  $\mu$ l RNase freiem  $dH_2O$ . Danach wurde die Konzentration der RNA am Nanodrop bestimmt. Wenn mit der RNA nicht direkt weitergearbeitet wurde, wurde sie bis zur weiteren Verwendung bei  $-80$  °C gelagert.

#### 3.2.9.2 cDNA-Synthese

Um die isolierte RNA für die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) in einsträngige cDNA umzuschreiben, wurde das High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Für eine Inhibierung der RNasen im Reaktionsgemisch wurde Ribolock RNase Inhibitor (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Alle Schritte erfolgten, wenn nicht anders erwähnt, auf Eis. Für die Reaktion wurden je 2000 ng RNA verwendet. Der Reaktionsansatz pro eingesetzter RNA ist in Tabelle 3.14 aufgeführt. Nach dem Pipettieren des Reaktionsansatzes wurden die PCR-Reaktionsgefäße gevortext und herunterzentrifugiert. Die cDNA-Synthese erfolgte im PCR-Cycler nach dem in Tabelle 3.15 aufgeführten Thermoprofil. Während der PCR wurde die isolierte RNA mit Hilfe der Transkriptase linear in cDNA umgeschrieben. Durch die Verwendung der randomisierten Hexamer-Primer wurden die gesamte isolierte RNA umgeschrieben. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei  $-20$  °C gelagert.

**Tabelle 3.14: Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese pro verwendete RNA mit dem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit**

Reagenzien	Volumen pro RNA (µl)
10 x Buffer RT	2,0
25 x dNTP Mix (100 mM)	0,8
10 x Random <i>Primer</i>	2,0
Ribolock RNase Inhibitor (40 U/µl)	0,5
MultiScribe Reverse Transkriptase	1,0
RNase freies dH <sub>2</sub> O	3,7
2000 µg RNA in freiem dH <sub>2</sub> O	10
Gesamtvolumen pro RNA	20

**Tabelle 3.15: Thermoprofil für die cDNA-Synthese**

Temperatur (°C)	Zeit (min)
25	10
37	120
85	5
8	unendlich

### 3.2.9.3 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Die qRT-PCR basiert auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR und ermöglicht die Quantifizierung von bestimmten Nukleinsäureabschnitten für die Diagnostik oder Analyse. Im initialen Schritt der PCR wird die DNA denaturiert, sodass die spezifischen Primer im nächsten Schritt an die DNA binden können. Während der folgenden Elongation dienen die Primer als Startmolekül für die DNA-Polymerase, welche die DNA komplementär zum Matrizenstrang verlängert. Die Amplifizierung der Nukleinsäuren während der PCR wird dabei in Echtzeit mittels des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR®Green gemessen. Dieser interkaliert in die DNA und die gemessene Fluoreszenz nimmt dabei proportional mit der Menge an PCR-Produkten zu. Über die Verwendung von spezifischen Primern und synthetisierten cDNAs kann so auf die Transkriptmenge eines Gens geschlossen werden. Der verwendete SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) enthielt sowohl den Fluoreszenzfarbstoff SYBR®Green als auch die benötigte DNA-Polymerase und freien Desoxynukleosid-Triphosphate (dNTP). Die verwendeten Primer sind in Tabelle 3.7 aufgeführt. Selbst designte Primerpaare wurden mit Hilfe der Primer-Blast Software bestimmt und vor der Verwendung auf ihre Effizienz hin überprüft. Es wurden nur Primer mit einer Effizienz über 75-110 % verwendet. Das Gesamtreaktionsvolumen betrug 20 µl. Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 3.16 aufgeführt. Die Echtzeit-PCR erfolgte im Thermocycler in einer 96er Mikrotiterplatte (Applied Biosystems) unter dem in Tabelle 3.17

aufgeführtem Programm. Für die Auswertung der qRT-PCR wurden insgesamt 44 Zyklen durchgeführt. Für die Auswertungen wurden nur Amplikate berücksichtigt, die spezifische Schmelzkurven lieferten und vor 35 Zyklen den Schwellenwert-Zyklus erreichten. Als Referenzgene wurden *β-Actin* und *Gapdh* verwendet.

Für die Quantifizierung wurde die Expression des Zielgens auf ein nicht reguliertes Referenzgen bezogen. Für die Berechnung der relativen Genexpression wurde die  $\Delta\Delta Ct$ -Methode verwendet. Hierfür wurde das Programm Bio-Rad CFX Maestro genutzt. Der hier verwendete Ct-Wert (Schwellenwert-Zyklus) entsprach dabei dem Zyklus, bei dem erstmals das Fluoreszenzsignal signifikant zur Hintergrund-Fluoreszenz anstieg. Für die Berechnung wurde zunächst der Ct-Wert des Referenzgens von dem Ct-Wert des Zielgens abgezogen ( $\Delta Ct = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{Referenzgen}}$ ). Anschließend wurde der  $\Delta Ct$ -Wert von den behandelten Proben von den  $\Delta Ct$ -Werten der Kontrollen abgezogen ( $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Behandlung}} - \Delta Ct_{\text{Kontrolle}}$ ). Der relative Expressionsunterschied wurde über  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  kalkuliert [165].

**Tabelle 3.16: Reaktionsansatz für die quantitative Echtzeit-PCR**

Reagenzien	Volumen (µl)
SensiMix™ SYBR Hi-ROX (2X)	10
Forward Primer (3 µM)	1,7
Reverse Primer (3 µM)	1,7
cDNA (100 ng/µl)	0,2
H <sub>2</sub> O	6,5
Gesamtvolumen	20

**Tabelle 3.17: Programm der quantitativen Echtzeit-PCR**

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (min:ss)
Initiale Denaturierung	95	10:00
Denaturierung	95	00:15
Primerhybridisierung	55	00:15
Elongation	72	00:17

X 44 Zyklen

#### 3.2.9.4 Genotypisierung der transgenen Mäuse

Für die Bestätigung des Genotyps wurden die Elterntiere, sowie die verwendeten Nachkommen der transgenen Nrf2<sup>↑</sup>-Mäuse genotypisiert. Hierfür wurde eine PCR durchgeführt, bei der nur bestimmte Abschnitte des Genoms amplifiziert wurden. Mit Hilfe der PCR wurde der Flox-Status des Keap1-Genoms, sowie die An- oder Abwesenheit des Cre-Rekombinase Genabschnittes untersucht, da für den in 3.2.2 beschriebenen Protektionsversuch nur homozygot gefloxt und Cre-negative Tiere verwendet wurden.

Für die Genotypisierung wurden die Ohrstanzen verwendet, welche zur Markierung der Tiere durch die Mitarbeiter der Tierversuchsanalage generiert wurden. Die Ohrstanzen wurden in einem Reaktionsgefäß mit Lysepuffer versetzt und für 30 min bei 95 °C im Heizblock inkubiert. Nach der Lyse wurden die Proben mit einem gleichen Anteil an Neutralisationspuffer versetzt und auf Eis gestellt. Für die PCR wurde der REDTaq® ReadyMix™ PCR-Reaktionsmix (Sigma Aldrich) verwendet, welcher nicht nur die DNA-Polymerase, sondern auch die dNTP beinhaltet. Die verschiedenen PCR-Ansätze für die zwei unterschiedlichen Genomabschnitte sind in den Tabellen 3.18 und 3.19 zu finden. Beide Reaktionsansätze wurden nach dem PCR-Programm (siehe Tabelle 3.20) mit insgesamt 33 Zyklen durchgeführt. Für den Nachweis der PCR-Produkte wurde anschließend eine Gelelektrophorese durchgeführt. Dafür wurde ein 2 %-iges Agarosegel gegossen. Die Agarose wurde in 1 x Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer aufgekocht und mit 20 µl Ethidiumbromid versetzt. Das Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und die PCR-Produkte konnten so unter UV-Licht nachgewiesen werden. Als Größenmarker wurden 250 ng *Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder* (Fermentas GmbH) mitgeführt. Für die Elektrophorese wurde für 15 min eine Spannung von 60 Volt und für weitere 60 min eine Spannung von 100 Volt angelegt. Anschließend erfolgte die Visualisierung der PCR-Produkte unter UV-Licht am UV-Transilluminator. In Abbildung 3.5 ist jeweils ein repräsentatives Gelbild für die Genotypisierung bezüglich des *Keap1*-Allels (A) und der Cre-Rekombinase (B) zu finden. Das PCR-Produkt für das wildtypische *Keap1*-Allel wies eine Größe von 250 bp auf, während das gefloxtete *Keap1*-Allel eine Größe von 481 bp aufwies. Das PCR-Produkt der Cre-Rekombinase hatte eine Größe von 350 bp. Alle verwendeten transgenen Mäuse wiesen den Genotyp *Keap1*<sup>flox/flox</sup>:Alb-Cre negativ auf.

**Tabelle 3.18: Reaktionsansatz für die Amplifizierung des *Keap1*-Genomabschnitts**

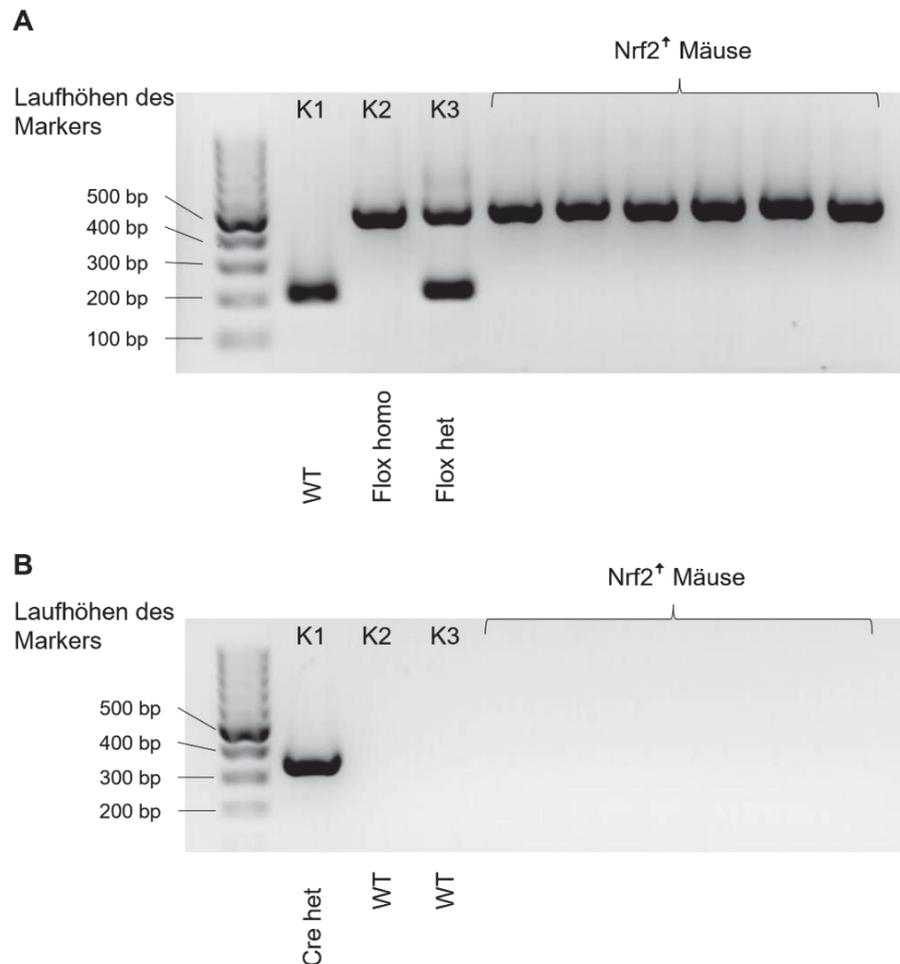
Reagenz	Volumen (µl)
REDTaq® ReadyMix™	10
720s Primer (4 µM)	1
925as Primer (4 µM)	1
CKOg1 Primer (10 µM)	1
H <sub>2</sub> O	6
Probe (DNA)	1
Gesamtvolumen	20

Tabelle 3.19: Reaktionsansatz für die Amplifizierung des *Cre*-Genomabschnitts

Reagenz	Volumen ( $\mu$ l)
REDTaq® ReadyMix™	10
Cre Primer 1 (10 $\mu$ M)	1
Cre Primer 1 (10 $\mu$ M)	1
H <sub>2</sub> O	7
Probe (DNA)	1
Gesamtvolumen	20

Tabelle 3.20: Thermoprofil für die Genotypisierung der transgenen Mäuse

Temperatur ( $^{\circ}$ C)	Zeit (s)	
94	60	
94	30	X 33 Zyklen
60	30	
72	60	
8	$\infty$	



**Abbildung 3.5: Genotypisierung der transgenen Nrf2<sup>+</sup>-Mäuse.** Um den Genotyp der Nrf2<sup>+</sup>-Mäuse zu bestimmen, wurde aus den Ohrstanzen der Mäuse DNA isoliert und mittels in der PCR verwendeter spezifischer Primer das *Keap1* oder *Cre*-Allel amplifiziert. **A:** Repräsentatives Bild der *Keap1*-PCR. Das mit dem wildtypischen *Keap1* gewonnene PCR-Produkt weist eine Größe von 205 bp auf, während das gefloخته *Keap1*-Allel eine Produktgröße von 481 bp aufweist. Die drei verwendeten internen Kontrollen waren wildtypisch, homo- und heterozygot für das gefloخته Allel. **B:** Repräsentatives Bild der *Cre*-PCR. Das mit dem *Cre*-Allel gewonnene PCR-Produkt weist eine Größe von 350 bp auf. War *Cre* nicht im Genom vorhanden, wurde kein Produkt in der PCR gebildet. Die drei verwendeten internen Kontrollen waren heterozygot oder wildtypisch (negativ) für *Cre*. Bp: Basenpaare, K: Kontrolle, het: Heterozygot, homo: Homozygot, WT: Wildtyp.

### 3.2.10 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.2.10.1 Proteinisolierung

Für die Isolation des Gesamtproteins aus der Niere wurden 30-50 mg schockgefrorenes Nierengewebe verwendet. Alle Schritte fanden, falls nicht anders erwähnt, auf Eis oder bei 4 °C statt. Die Nierenstücke wurden in einem Reaktionsgefäß mit Radioimmunpräzipitationsassay (RIPA)-Puffer, dem 1 x Proteaseinhibitorcocktail (Calbiochem), 1 x Phosphataseinhibitorcocktail (Calbiochem) und 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) hinzugefügt wurden, versetzt. Anschließend wurden die Nierenstücke im Tissue Lyser II drei Mal für 30 Sekunden (s) bei 30 Hz mit Hilfe einer Stahlkugel homogenisiert. Anschließend erfolgte das Aufschließen der Zellen am

Sonifizierer (5 x 35 % Amplitude, 2 s Puls, 1 s Pause, 5 Stöße, RT). Die entstandenen Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (10000 g, 15 min, 4 °C) pelletiert, der proteinhaltige Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinkonzentration des Überstandes wurde mit Hilfe des DC™ Protein Assays über die Bradford-Methode bestimmt. 50 µg des Proteinlysates wurden mit Roti®-Load-Puffer versetzt. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 95 °C im Heizblock denaturiert. Das im Puffer vorhandene Natriumdodecylsulfat (SDS) dient in Kombination mit Hitze als Denaturierungsmittel, sodass sich die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine auflöst. Des Weiteren werden über das im Roti-Load vorhandene β-Mercaptoethanol die Disulfidbrücken zwischen den Peptiden gespalten. Das negativ geladene SDS bildet außerdem mit den Proteinen Komplexe und überlagert so die Eigenladung der Proteine. Die Proteine weisen so eine konstante negative Ladung in Relation zu ihrem Molekulargewicht auf. Die Proteinisolate wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C und die mit Roti-Load versetzten Proben bei -20 °C gelagert.

### 3.2.10.2 Präparation von Kern/Cytosol-Proteinextrakten

Um die Translokation bestimmter Proteine in den Kernen nachzuweisen, wurde mit einem angepassten Protokoll eine Cytosol- und Kernfraktion gewonnen. Dafür wurden 30-50 mg schockgefrorenes Nierengewebe verwendet. Dem Cytosol- und Kernlyse-Puffer wurden kurz vor Versuchsbeginn 1 mM Dithiothreitol (DTT), 1 mM PMSF, 1 mM Natriumorthovanadat und 1 x Proteaseinhibitorcocktail (Calbiochem) hinzugefügt. Alle Arbeiten fanden auf Eis oder bei 4 °C statt. Für die Extraktion wurde zunächst das Nierenstück zerkleinert, in ein vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt und mit 300 µl Cytosollyse-Puffer versetzt. Das Gewebe wurde mit einem Pistill für 2 min homogenisiert und anschließend für weitere 5 min inkubiert. Das Homogenat wurde bei 1000 g für 10 min zentrifugiert und so die Kerne (Pellet) von den cytosolischen Proteinen (Überstand) getrennt. Der Überstand wurde abgenommen und abermals bei 14000 g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum abgenommen und als Cytosolfraktion auf Eis gelagert. Das Pellet des ersten Zentrifugationsschrittes wurde in 100 µl Cytosollyse-Puffer suspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach weiterer Zentrifugation (1000 g, 4 min) wurde das Pellet in 300 µl Cytosollyse-Puffer resuspendiert. Ein Tropfen wurde entnommen und unter dem Lichtmikroskop im Phasenkontrast auf die Anwesenheit der intakten Zellkerne überprüft. Nach weiterer Zentrifugation wurde der Überstand abermals verworfen. Das Pellet wurde in 150 µl Kernlyse-Puffer resuspendiert und die noch intakten Zellkerne mit Hilfe einer Sonifizierung aufgebrochen (5 x 25 % Amplitude, 2 s Puls, 1 s Pause, 5 Stöße, RT). Bei einer 10-minütigen Zentrifugation bei 14000 g wurden die Kerntrümmer pelletiert, der Überstand als Kernfraktion abgenommen und auf Eis gelagert. Die Proteinkonzentration des Überstandes wurde mit Hilfe des DC™ Protein Assays (Bio-Rad

Laboratories GmbH) über die Bradford-Methode bestimmt. 50 µg des Proteinlysates der Cytosolfraktion und 10 µg des Proteinlysates der Kernfraktion wurden mit Roti®-Load-Puffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die versetzten Proben bei -20 °C und die Cytosol- und Kernfraktion bei -80 °C gelagert.

#### 3.2.10.3 Gelelektrophorese zur Auftrennung von Proteinen - SDS-PAGE

Über die diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden die in 3.2.10.1 + 3.2.10.2 isolierten und denaturierten Proteine ihrem Molekulargewicht nach aufgetrennt. Durch die Erzeugung eines elektrischen Feldes wandern die negativ geladenen Proteine zur Anode und werden durch die Poren im Acrylamidgel ihrer Größe nach separiert. Die hier verwendeten Acrylamidgele bestanden aus einem Sammelgel (5 %) mit anschließendem Trenngel (10 %). Im Sammelgel wurden die Proteine an der Grenze zum Trenngel zunächst konzentriert. Im Trenngel erfolgte die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Die Proteine wurden im Laufpuffer bei einer Spannung von 10 – 30 mA aufgetrennt. Für die Gelelektrophorese wurde das Mini-PROTEAN® *Tetra Cell Elektrophorese System* genutzt. Um die Größe der Proteine bestimmen zu können, wurde der Größenmarker *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific) genutzt.

#### 3.2.10.4 Western Blot

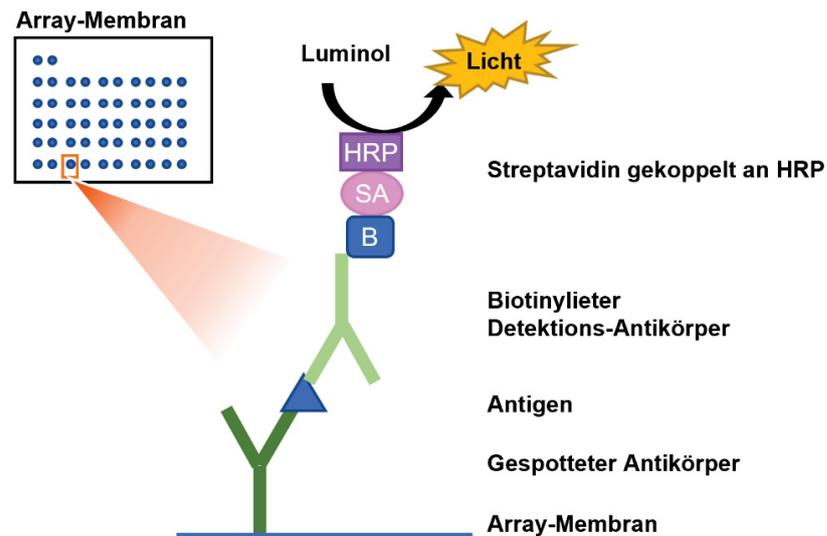
Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden anschließend mit Hilfe des Mini Trans-Blot® Cell Systems über das Nass-Blot Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Nass-Blot erfolgte im Blottingpuffer bei 300 mA für 90 min. Um den erfolgreichen Proteintransfer nachzuweisen, wurde die Nitrozellulosemembran anschließend temporär mit Ponceau-S-Lösung angefärbt. Die Membran wurde zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungen nachfolgend für 2 h in 5 % Magermilchpulver/Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20 (TBST) inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit Primärantikörper über Nacht bei 4 °C. Nach einem Waschen der Membran in TBST erfolgte die Inkubation mit HRP gekoppeltem Sekundärantikörper (1:2000 in 5 % Milchpulver/TBST) für 2 Stunden bei RT. Nach erneutem Waschen mit TBST wurde die Membran mit einer luminolhaltigen Chemilumineszenzlösung des *BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD) Kits* für 1 min bei RT inkubiert. Die Intensität der Chemilumineszenz wurde mittels ChemiDoc™ Touch Imaging System fotografiert und der Image Lab™ Software quantifiziert.

#### 3.2.11 Phospho-Kinase Array

Die Proteinphosphorylierung ist eine der häufigsten post-translationalen Proteinmodifikationen und ein entscheidender Kontrollmechanismus für die Signalweiterleitung und -induktion in der Zelle. Die Analyse des Phosphorylierungs-

Statuses von Kinasen und deren Substratproteinen kann dazu beitragen, Signalwege aufzudecken, und besser zu verstehen, wie die Zelle oder der Organismus auf intrinsische oder extrinsische Reize reagiert. Um das Phosphorylierungs-Profil verschiedener Kinasen gleichzeitig zu untersuchen, wurde das Proteome Profiler™ Phospho-Kinase Array Kit (R&D Systems, Inc.) verwendet. Mit Hilfe dieses Arrays konnte der Phosphorylierungsstatus von 37 Kinase-Phosphorylierungsstellen gleichzeitig untersucht werden. Der Array ist ein membranbasierter Sandwich-Immunoassay und funktioniert nach folgenden Prinzip: Auf zwei Nitrozellulose-Membranen wird dabei die spezifischen Antikörper in Duplikaten gespottet. Während einer Inkubation der Membranen mit Gewebe- oder Zellysaten können die spezifischen Antigene an die gespotteten Antikörper binden. Nach dem Waschen, um nicht gebundene Antigene zu entfernen, folgte die Bindung der spezifischen biotinylierten Detektions-Antikörper. Anschließend bindet an das Biotin ein Streptavidin-HRP-Konjugat, welches Luminol in Anwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> unter Chemilumineszenz-Bildung oxidiert. Das detektierte Chemilumineszenz-Signal korrespondiert dabei mit der Menge an gebundenem Antigen (Abbildung 3.6).

Für den Phospho-Kinase Array wurde nur die Niere eines Tieres je Gruppe aus dem in 3.2.1 beschriebenen Dosisversuch verwendet. 40 – 60 mg Nierengewebe wurde auf Eis zerkleinert und in 300 µl eiskalten Lysepuffer (in Kit enthalten und mit je 10 µg/ml Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin versetzt) überführt. Das Gewebe wurde mit einem Pistill homogenisiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Lysat bei 4 °C und 15000 g für 5 min zentrifugiert und der Proteine enthaltende Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte eine Proteinbestimmung mit dem DC™ Protein Assay (Bio-Rad Laboratories GmbH) nach der Bradford-Methode. Nachdem die unspezifischen Antigen-Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran für eine Stunde im Array-Puffer blockiert wurden, wurde je 400 µg Protein verdünnt in Array-Puffer auf die Membranen pipettiert und auf einem Schüttler über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Membranen im mitgelieferten Waschpuffer 10 min gewaschen; dabei sollten die beiden zusammengehörigen Membranen im selben Gefäß gewaschen werden. Die Membranen wurden in eine 8er-Vertiefungsplatte überführt und 1 ml der verdünnten Antikörper-Lösungen (20 µl Detektions-Antikörper Cocktail A/B + 1 ml Array Puffer) auf die entsprechenden Membranen pipettiert. Nach einer Inkubation von 2 Stunden bei RT wurden die Membranen in separaten Containern für 10 min gewaschen. Danach folgte das Streptavidin-HRP-Konjugat für 30 min bei RT. Nach einem erneuten Waschen wurden die Membranen 1 min mit dem *Chemi Reagent Mix* inkubiert und die Chemilumineszenz mittels ChemiDoc™ Touch Imaging System fotografiert und per ImageJ Software quantifiziert.



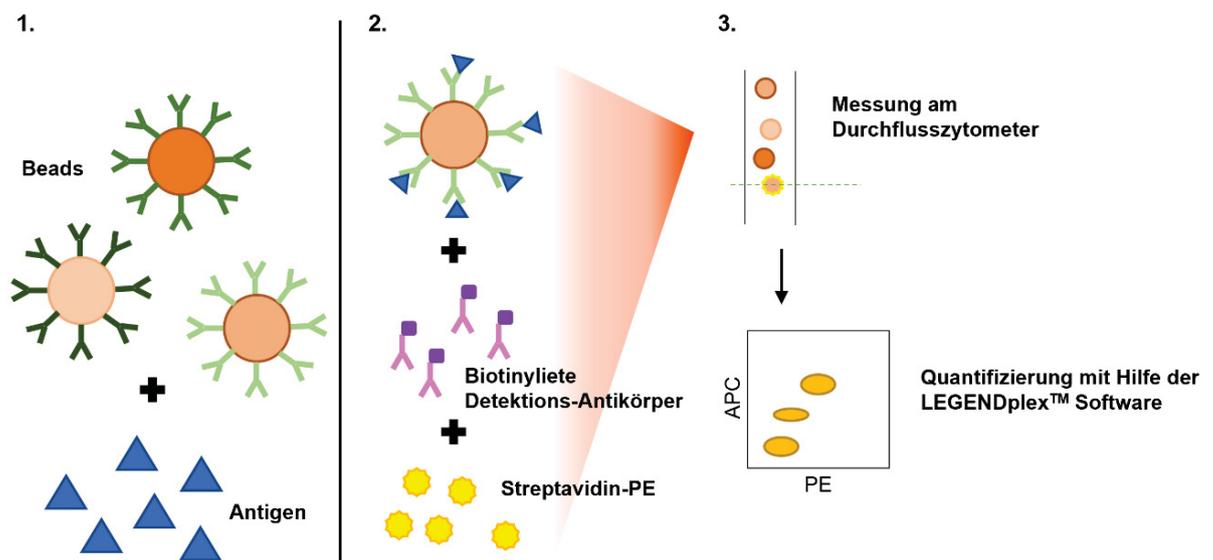
**Abbildung 3.6: Prinzip des Proteome Profiler™ Phospho-Kinase Arrays.** Auf die Nitrozellulose-Membran sind Antikörper gespottet, die jeweils gegen die zu untersuchende Phosphorylierungsstelle des Antigens gerichtet sind. Nach der Bindung des Antigens an seinen spezifischen Antikörper folgt eine Inkubation mit einem für das Antigen spezifischen biotinylierten Detektions-Antikörper. An den Detektions-Antikörper bindet Streptavidin gekoppelt mit HRP. Das Substrat Luminol wird anschließend von der HRP umgesetzt. Das dabei entstandene Lumineszenzsignal ist proportional zur Menge des Antigens in der Probe. B: Biotin, HRP: Meerrettichperoxidase, SA: Streptavidin.

### 3.2.12 Messung inflammatorischer Zytokine mittels LEGENDplex™

Für die Messung der im Blut zirkulierenden inflammatorischen Zytokine wurde das LEGENDplex™ Mouse Inflammation Panel (13-plex) (BioLegend) verwendet. Dieser Array ist ein Bead-basierter Sandwich-Immunoassay. Durch die Verwendung von fluoreszierenden Beads unterschiedlicher Größe können mehrere Analyte gleichzeitig gemessen werden. In diesem Assay wurden Beads mit zwei unterschiedlichen Größen verwendet, die jeweils eine unterschiedliche Allophycocyanin (APC)-Fluoreszenz besaßen. Alle verwendeten Beads wurden außerdem mit Antikörpern, welche spezifisch für das zu untersuchende Zytokin waren, konjugiert. Während der Inkubation der Beads mit der zu untersuchenden Probe binden diese an die jeweiligen Zytokine. Daraufhin bindet ein biotinylierter Detektions-Antikörper an die Bead-gekoppelten Zytokine und bildet ein Bead-Antigen-Antikörper-Sandwich. An den biotinylierten Detektions-Antikörper bindet anschließend das Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE). Durch die Bindung von SA-PE ist nun das Fluoreszenzsignal proportional zur Menge der gemessenen Analyten. Die Messung erfolgte an einem Durchflusszytometer und die Analyse kann mittels mitgelieferter LEGENDplex™ *Data Analysis Software* durchgeführt werden (Abbildung 3.7).

Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Zunächst wurde die Standardreihe hergestellt und sowohl der Standard als auch die Serumproben der in 3.2.1 verwendeten Mäuse 1:1 verdünnt und in eine V-Boden-Platte pipettiert. Anschließend wurde dem Standard Matrix C und den Proben Assaypuffer hinzugegeben. Nach Hinzufügen der gemischten Beads wurde die Platte über Nacht im Dunklen bei 4 °C inkubiert. Nach einem Zentrifugieren der Platte (1 min, 250 g) wurde der Überstand abgenommen und die

pelletierten Bead-Antigen-Komplexe mit Assaypuffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Detektions-Antikörper für 1 h im Dunkeln, gefolgt von der SA-PE Inkubation für 30 min im Dunkeln. Nach einem weiteren Waschschrift wurden das pelletierte Bead-Antigen-Antikörper-Sandwich in Waschpuffer resuspendiert und die Proben am Durchflusszytometer gemessen.



**Abbildung 3.7: LEGENDplex™ Mouse Inflammation Panels.** An die fluoreszierenden Beads sind jeweils Antikörper gebunden, die gegen das jeweilige zu analysierende Antigen (Zytokin) gerichtet sind. Nach Bindung des Antigens und den gekoppelten Antikörper folgt die Inkubation mit einem ebenfalls gegen das Antigen gerichteten biotinylierten Detektions-Antikörper. Es kommt zu einem Bead-Antigen-Detektions-Antikörper-Sandwich. An das Biotin des Detektions-Antikörpers bindet anschließend das PE-gekoppelte Streptavidin. Das am Durchflusszytometer gemessene Fluoreszenzsignal ist nun proportional zur Menge des Antigens in der Probe. Die Analyse der am Durchflusszytometer gewonnenen Daten erfolgt mit der LEGENDplex™ Software. APC: Allophycocyanin, PE: Phycoerythrin

### 3.2.13 Statistik

Die Daten von 4-8 Tieren sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM). Zur Auswertung der Statistik wurde das Programm GraphPad Prism verwendet. Die Überprüfung auf Normalverteilung erfolgte mittels Kolmogorov-Smirnov-Tests mit Dallal-Wilkinson-Liliefor p-Werten. Die Überprüfung auf Signifikanz im Dosisversuch erfolgte bei normalverteilten Werten gegen die Kontrolle über den ungepaarten zweiseitigen *Student's t*-Test. Bei nicht normalverteilten Werten wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Im Protektionsversuch (3.2.2) wurden die Gruppen der jeweiligen Mausstämmen untereinander oder gegen die Kontrolle mittels Varianzanalyse (*one-way-ANOVA*) mit anschließender Tukey-Korrektur auf Signifikanz getestet (Normalverteilung). Nicht normalverteilte Werte wurden mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests mit anschließendem *Dunn's Multiple Comparison Test* auf Signifikanz hin untersucht. Signifikante Unterschiede zwischen den Mausstämmen (Kontrollen oder Ald-infundierte Tiere) wurden mit Hilfe des 2-way ANOVA und anschließender Tukey-Korrektur auf Signifikanz getestet. Ein p-Wert  $\leq 0,05$  wurde als signifikant anerkannt.

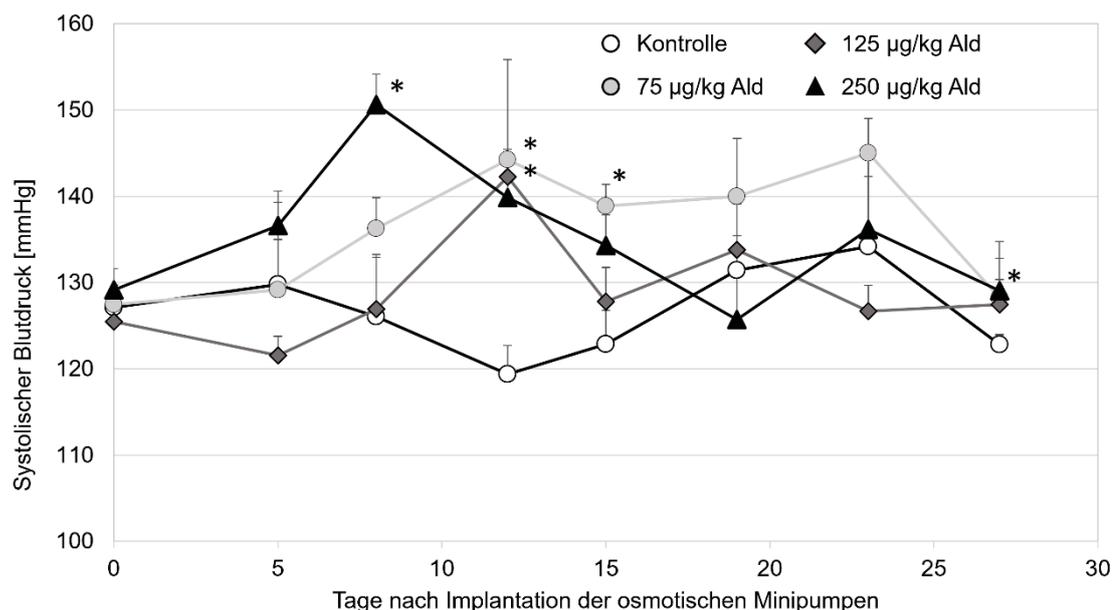
## 4. Ergebnisse

### 4.1 Dosisfindung und Lokalisation der Nrf2-Aktivierung und Aldosteron-induzierter Nierenschäden

Um das Aldosteron-Maus-Model zu etablieren und eine Dosis zu bestimmen, bei der Ald zu einer Nrf2-Aktivierung und Nierenschädigung führt, wurden die Mäuse über vier Wochen mit drei verschiedenen Ald-Konzentrationen behandelt. Des Weiteren sollte die Lokalisation der Nrf2-Aktivierung und der induzierten Schäden genauer untersucht werden. Da in der Literatur Mäusen zwischen 7 und 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Ald x Tag verabreicht wurden und bereits bei Konzentrationen von 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Ald Schäden beobachtet werden konnten [90, 166-169], wurden für diesen Dosisversuch die Mäuse mit 75, 125 und 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KG Ald x Tag infundiert.

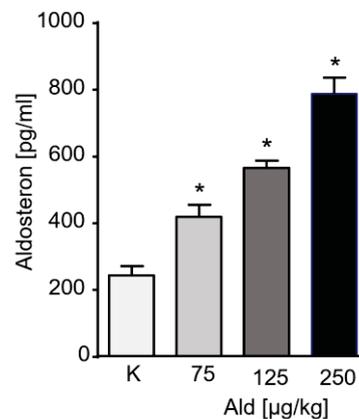
#### 4.1.1 Blutdruckverlauf während der Aldosteron-Behandlung

Die für die Dosisfindung ausgewählten Ald-Konzentrationen führten nicht zu einer gleichbleibend signifikanten Erhöhung des Bluthochdrucks über den Behandlungszeitraum von 28 Tagen verglichen zu den Kontroll-Mäusen. Die höchste Ald-Dosis (250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) führte nach 7 Tagen, im Vergleich zur Kontrolle zu einem signifikanten Blutdruckanstieg. Eine Behandlung mit 75 oder 125  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Ald führte zu einem signifikanten Anstieg des Blutdrucks nach 12 Tagen. In den letzten 2 Wochen des Behandlungszeitraumes konnte kein signifikanter Unterschied mehr im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen beobachtet werden. Stattdessen wurde eine Anpassung des Blutdrucks in den Ald-behandelten Mäusen und ein nicht-signifikanter Anstieg in den Kontroll-Mäusen sichtbar (Abbildung 4.1).



**Abbildung 4.1: Entwicklung des systolischen Blutdrucks [mmHg] in Aldosteron-infundierten und Kontroll-Tieren über einen Zeitraum von 28 Tagen.** Der Blutdruck wurde nicht-invasiv an sieben verschiedenen Zeitpunkten nach Akklimatisierung an die Prozedur gemessen. Der erste Messzeitpunkt repräsentiert den initialen Blutdruck vor der Pumpenimplantation. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert + Standardfehler. n = 5. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle.

Eine Messung der Ald-Konzentration im Serum der Mäuse nach 28-tägiger Behandlung zeigte einen Dosis-abhängigen Anstieg in allen Behandlungsgruppen (Abbildung 4.2).



**Abbildung 4.2: Aldosteron-Konzentration im Serum 28 Tage nach der Pumpenimplantation.** Gezeigt ist jeweils der Mittelwert + Standardfehler. Ald: Aldosteron, K: Kontrolle. n = 5. \*p≤0,05 vs. Kontrolle

#### 4.1.2 Gewichtsparameter nach Aldosteron-Behandlung

Ein Unterschied im Körpergewicht zwischen den Ald-behandelten und Kontroll-Mäusen wurde nach 28 Tagen nicht beobachtet. Alle drei Ald-Konzentrationen führten zu einem signifikanten Anstieg des relativen Nierengewichtes verglichen zu den Kontroll-Tieren. In den Mäusen, welche mit 125 oder 250 µg/kg Ald behandelt wurden, konnte ebenso eine signifikante Erhöhung des relativen Herzgewichtes nachgewiesen werden. Eine Ald-Konzentration von 75 µg/kg Ald führte zwar zu einem tendenziellen, jedoch nicht signifikanten Anstieg des relativen Herzgewichtes in Relation zur Kontrolle (Tabelle 4.1).

**Tabelle 4.1: Körper- und Organgewichte der Aldosteron-infundierten und Kontroll-Tiere nach 28-tägiger Behandlung.** Gezeigt ist jeweils der Mittelwert ± Standardfehler. n = 5. Ald: Aldosteron. \*p≤0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 vs. Kontrolle.

Parameter	Kontrolle	75 µg/kg Ald	125 µg/kg Ald	250 µg/kg Ald
Körpergewicht [g]	27,3 ± 0,4	27,7 ± 0,3	27,1 ± 0,9	26,0 ± 0,8
Relatives Nierengewicht [‰]	6,3 ± 0,2	8,7 ± 0,4***	9,6 ± 0,3***	9,7 ± 0,2***
Relatives Herzgewicht [‰]	4,9 ± 0,1	5,8 ± 0,5	5,7 ± 0,2*	5,5 ± 0,1**

#### 4.1.3 Nierenfunktionsparameter nach Aldosteron-Behandlung

Für eine nähere Untersuchung der Nierenfunktion wurden verschiedene klinische Parameter verwendet. Zum Ende des Versuches wurde das Trink- und Urinvolumen bestimmt, sowie der für die Messung von Kreatinin, Albumin und NGAL verwendete Urin gewonnen. Das für die Bestimmung von Kreatinin verwendete Serum wurde ebenfalls am Ende des Versuches gewonnen.

Eine Ald-Behandlung führte in allen drei Behandlungsgruppen zu einem tendenziellen Anstieg des Trink- und Urinvolumens. Ein signifikanter Unterschied konnte wegen der hohen Volumenschwankungen der anderen Gruppen nur im Trinkvolumen der mit 75 µg/kg behandelten Mäuse im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen beobachtet werden. Die Kreatinin-Clearance zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ald-infundierten und Kontroll-Tieren unabhängig von der Ald-Dosis. Eine erhöhte Ausscheidung von Albumin im Urin gibt Hinweise auf eine gestörte glomeruläre Filtration und somit auch auf eine mögliche Nierenschädigung. Eine erhöhte NGAL-Ausscheidung gibt wiederum Hinweise auf einen tubulären Schaden. Die ausgeschiedene Albumin- und NGAL-Menge wurde zur Berücksichtigung der Verdünnung des Urins in Relation zur Kreatinin-Ausscheidung gesetzt. In allen drei Behandlungsgruppen konnte im Urin sowohl ein signifikant höheres Albumin/Kreatinin-Verhältnis, als auch ein höheres NGAL/Kreatinin-Verhältnis im Vergleich zu den Kontroll-Tieren gezeigt werden. Dabei konnte außerdem eine Dosisabhängigkeit beobachtet werden (Tabelle 4.2).

**Tabelle 4.2: Nierenfunktionsparameter von Aldosteron-infundierten und Kontroll-Tieren nach 28-tägiger Behandlung.** Bestimmt wurden die Parameter am Ende des 28-tägigen Versuches. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert ± Standardfehler. n = 5. Ald: Aldosteron, NGAL: Neutrophilengalactinase-assoziiertes Lipocalin. \*p<0,05, \*\*p<0,01 vs. Kontrolle.

Parameter	Kontrolle	75 µg/kg Ald	125 µg/kg Ald	250 µg/kg Ald
Trinkvolumen [ml/23h]	7,6 ± 1,7	16,8 ± 2,1**	19,7 ± 5,9	12,7 ± 5,2
Urinvolumen [ml/23h]	3,5 ± 2,3	9,9 ± 2,4	12,0 ± 5,2	9,3 ± 3,9
Kreatinin-Clearance [ml/h]	2,4 ± 0,5	4,0 ± 0,8	4,6 ± 1,0	3,0 ± 0,4
Albumin/Kreatinin [µg/mg]	111,2 ± 14,8	1776,1 ± 678,1*	2519,6 ± 1563,4*	2716,0 ± 913,3*
NGAL/Kreatinin [ng/mg]	138,2 ± 30,4	540,8 ± 69,6**	817,4 ± 156,4*	1086,7 ± 220,9**

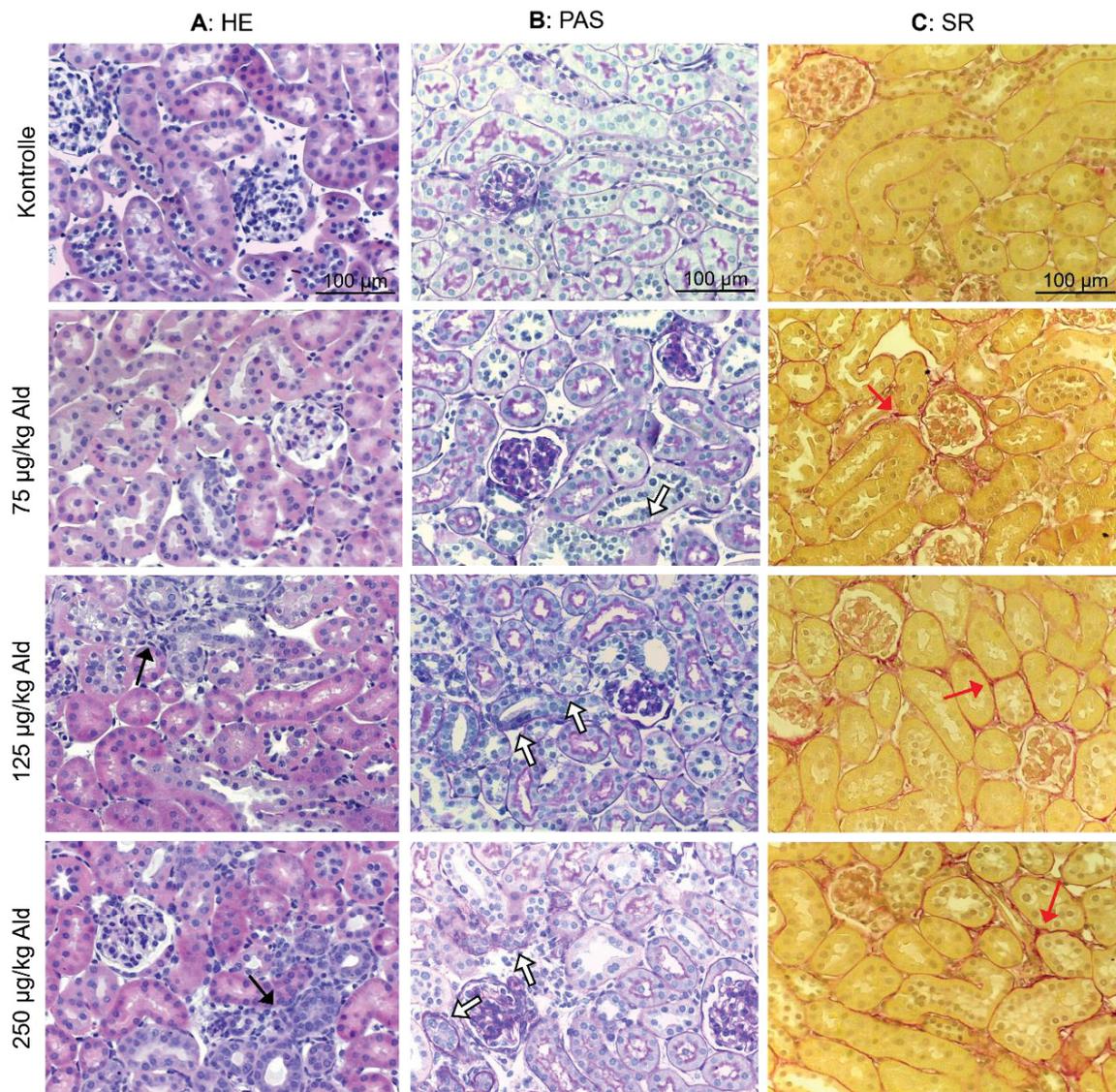
#### 4.1.4 Veränderung der Nierenmorphologie nach Aldosteron-Behandlung

Um zu untersuchen, ob die Ald-Behandlung morphologische Veränderungen in der Nierenrinde induziert, wurden verschiedene Schädigungsscores bestimmt. Über den TSI wurden Schäden des Tubulussystems sowie des umgebenden Interstitiums in der Rinde bewertet. Dabei wurden interstitielle Entzündungen, Fibrose und tubuläre Atrophie bewertet (siehe 3.2.3.4). Mit Hilfe des GSI und MSI wurden die Glomeruli in Bezug auf die Proliferation und Verdickung der Mesangiumzellen, als auch die Erweiterung der Kapillaren analysiert (siehe 3.2.3.5).

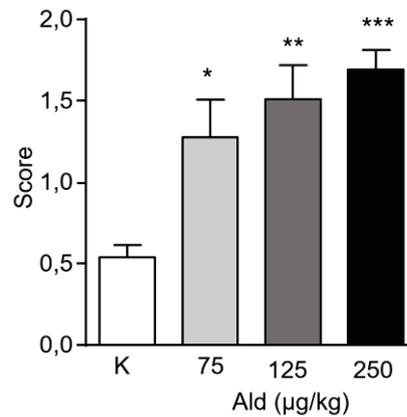
##### 4.1.4.1 TSI

Eine Ald-Infusion über einen Zeitraum von 28 Tagen führte bei allen verwendeten Ald-Konzentrationen zu histopathologischen Veränderungen des Tubulussystems. Repräsentative Bilder der verschiedenen Färbungen für die Beurteilung der interstitiellen Entzündung (HE-Färbung, schwarze Pfeile), Kollagenablagerungen als Anzeichen für eine

Fibrose (SR-Färbung, rote Pfeile) und Atrophie der Basalmembranen (PAS-Färbung, weiße Pfeile) sind in Abbildung 4.3 dargestellt. Die Kalkulation des TSI aus den drei verschiedenen Parametern ergab für die Kontroll-Mäuse einen durchschnittlichen Score von 0,5. Im Gegensatz dazu wiesen die Ald-behandelten Tiere je nach Ald-Konzentration einen Score von 1,3 – 1,7 auf. Der TSI war in allen drei Behandlungsgruppen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe signifikant erhöht; dabei stieg der TSI tendenziell mit einer erhöhten Dosis an Ald (Abbildung 4.4).



**Abbildung 4.3: Histopathologische Veränderungen in der Nierenrinde der Kontroll- und Aldosteron-induzierten Mäuse.** **A:** Repräsentative Bilder der HE-gefärbten Nieren für die Visualisierung inflammatorischer Regionen. Die schwarzen Pfeile zeigen in das Gewebe migrierte Leukozyten als Marker für eine beginnende Inflammation. **B:** Repräsentative Bilder der PAS-gefärbten Nieren zur Visualisierung der Basalmembran-Atrophie. Weiße Pfeile: Beispiele für eine Atrophie der Basalmembranen. **C:** Repräsentative Bilder der SR-gefärbten Nieren zur Visualisierung von Kollagenablagerungen. Rote Pfeile: Kollagenablagerungen. 200x Vergrößerung. Maßstab = 100 µm. Ald: Aldosteron, HE: Hämatoxylin-Eosin, PAS: Perjodsäure-Schiff, SR: Sirius-Rot.



**Abbildung 4.4: Semiquantitative Auswertung des TSI auf dem Nierengewebe von Aldosteron-infundierten und Kontroll-Mäusen.** Die Auswertung erfolgte mit den entsprechenden Färbungen und der verschiedenen Schädigungsscores (3.2.3.4). Gezeigt ist jeweils der Mittelwert + Standardfehler, n = 5. Ald: Aldosteron, K: Kontrolle, TSI: Tubulointerstieller Schädigungsindex. \*p≤0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 vs. Kontrolle.

In Tabelle 4.3 sind die analysierten Parameter einzeln dargestellt. Der Anteil an infiltrierten Zellen in der Niere stieg signifikant im Verhältnis zur Kontrolle nach einer Infusion von 125 und 250 µg/kg Ald über 28 Tage. Ebenso kam es zu einer signifikant erhöhten Ablagerung von Kollagen und einer erhöhten Atrophie der Basalmembranen in allen drei Behandlungsgruppen, verglichen mit der Kontrolle.

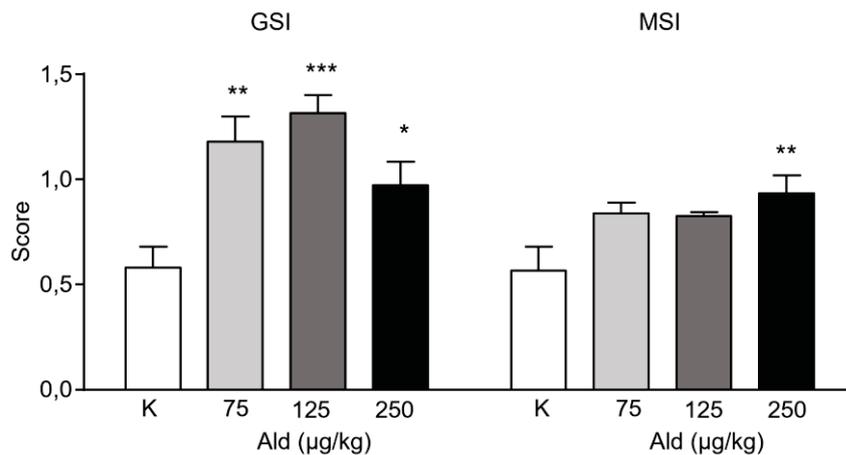
**Tabelle 4.3: Semiquantitative Auswertung der morphologischen Parameter für die Beurteilung des Tubulussystems.** Ausgewertet wurden die inflammatorischen Regionen, Atrophie der Basalmembranen und Kollagenablagerung auf dem Nierengewebe der Aldosteron-infundierten Mäuse und Kontroll-Mäuse nach 28-tägiger Behandlung nach dem Anfärben des Gewebes mit der entsprechenden histologischen Färbung. Für jede Färbung wurden 18 Gesichtsfelder unter dem Mikroskop betrachtet. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert ± Standardfehler. n = 5. Ald: Aldosteron. \*p≤0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 vs. Kontrolle.

Parameter	Kontrolle	75 µg/kg Ald	125 µg/kg Ald	250 µg/kg Ald
Infiltrierte Zellen [%]	0,47 ± 0,12	0,38 ± 0,05	1,62 ± 0,53*	1,94 ± 0,56*
Atrophie der Basalmembran [%]	4,7 ± 1,8	20,2 ± 6,0*	23,9 ± 7,5**	27,3 ± 5,0**
Kollagenablagerungen [%]	1,9 ± 0,7	7,5 ± 1,5**	10,9 ± 1,7**	11,7 ± 1,7***

#### 4.1.4.2 GSI/MSI

Eine Behandlung mit Ald führte in den Mäusen zu morphologischen Veränderungen der Glomeruli. Die Glomeruli der Kontroll-Mäuse wiesen zum größten Teil eine normale Morphologie auf. Dies spiegelt sich in einem durchschnittlichen GSI von 0,5 wieder. Bei den mit Ald behandelten Mäusen war vermehrt eine Proliferation und Verdickung der Mesangiumzellen zu beobachten. Dies zeigte sich auch bei der Kalkulation des GSI, der bei allen drei Ald-Konzentrationen signifikant zu den Kontroll-Mäusen stieg. Der GSI lag in den Behandlungsgruppen durchschnittlich zwischen 1,0-1,3. Eine Erweiterung der Kapillaren konnte über die Kalkulation des MSI tendenziell in allen Ald-Behandlungsgruppen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe nachgewiesen werden. Nur die

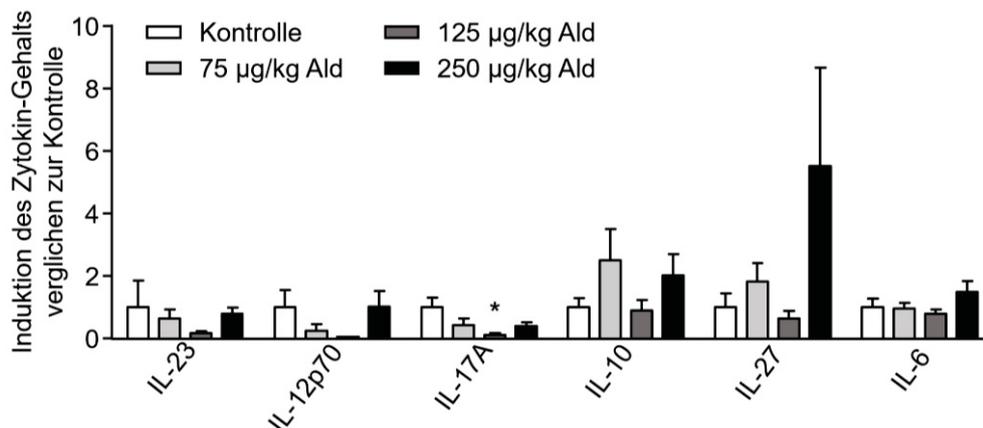
höchste Ald-Konzentration von 250 µg/kg führte jedoch zu einem signifikanten Anstieg des MSI (Abbildung 4.5).



**Abbildung 4.5: Semiquantitative Auswertung des GSI/MSI auf dem Nierengewebe von Aldosteron-infundierten und Kontroll-Mäusen.** Die Auswertung erfolgte mit der PAS-Färbung und den verschiedenen Schädigungsscores (3.2.3.5). Gezeigt ist jeweils der Mittelwert + Standardfehler, n = 5. Ald: Aldosteron, K: Kontrolle, GSI: Glomeruloskleroseindex, MSI: Mesangiolyseindex, PAS: Perjodsäure-Schiff. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 vs. Kontrolle.

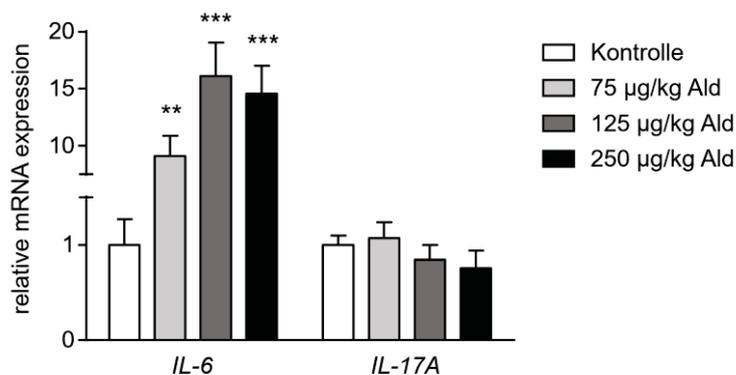
#### 4.1.5 Untersuchung inflammatorischer Zytokine nach Aldosteron-Behandlung

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Ald-Behandlung bei den drei verwendeten Konzentrationen zu morphologischen Veränderungen in der Nierenrinde führte, sollte im Anschluss geprüft werden, ob die Ald-Behandlung auch systemische inflammatorische Prozesse induziert. Das LEGENDplex™-Inflammations-Panel wurde hier genutzt, um die systemische Produktion von inflammatorisch relevanten Zytokinen im Serum der Mäuse nach 28-tägiger Behandlung nachzuweisen. Die Quantifizierung der zirkulierenden Zytokine zeigte keinen konsistenten oder Dosis-abhängigen Veränderungen der untersuchten Zytokine IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-23 und IL-27. Lediglich für IL-17A zeigte sich eine signifikant geringere Konzentration im Serum der mit 125 µg/kg behandelten Tiere im Vergleich zu den Kontroll-Tieren (Abbildung 4.6).



**Abbildung 4.6: LEGENDplex™-Inflammations-Panel zur Analyse von Zytokinen im Serum von Aldosteron-infundierten und Kontroll-Mäusen.** Untersucht wurden die Zytokine IL-23, IL-12p70, IL-17A, IL-10, IL-27 und IL-6 nach der entsprechenden 28-tägigen Behandlung. Die Serumkonzentration wurde auf die Kontroll-Gruppe normiert. n = 4-5. Ald: Aldosteron, IL: Interleukin. \*p<0,05, \*\*p<0,01 vs. Kontrolle.

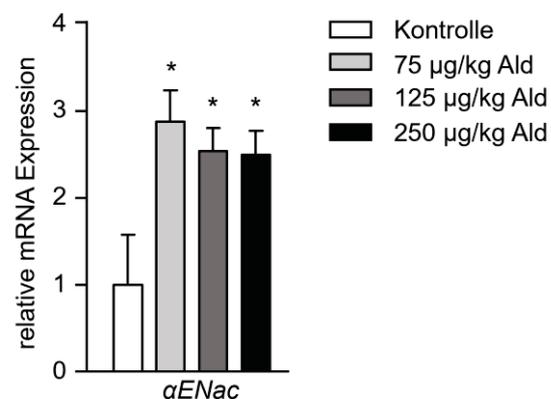
Die Analyse der IL-6 mRNA-Expression mittels quantitativer RT-PCR in der Niere zeigte eine signifikant erhöhte Expression in allen drei Behandlungsgruppen im Vergleich zur Kontrolle. Die systemisch nachgewiesene niedrigere Produktion von IL-17A konnte in der Niere nicht beobachtet werden (Abbildung 4.7).



**Abbildung 4.7: mRNA-Expression von IL-6 and IL-17A in der Niere von Aldosteron-infundierten Mäusen und Kontroll-Mäusen.** Die mRNA-Expression von IL-6 und IL-17A in den Nieren von Mäusen wurde mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Die RNA wurde aus den Nieren von Kontroll-Mäusen und von Mäusen denen Aldosteron infundiert wurde, isoliert. Die mRNA-Werte wurden auf *Gapdh* und *β-actin* als Referenz-Gene bezogen. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte + Standardfehler, n = 5. Ald: Aldosteron, IL: Interleukin, Gapdh: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase. \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 vs. Kontrolle.

#### 4.1.6 Einfluss auf die Expression von ENaC, einem klassisch Aldosteron-regulierten Gen

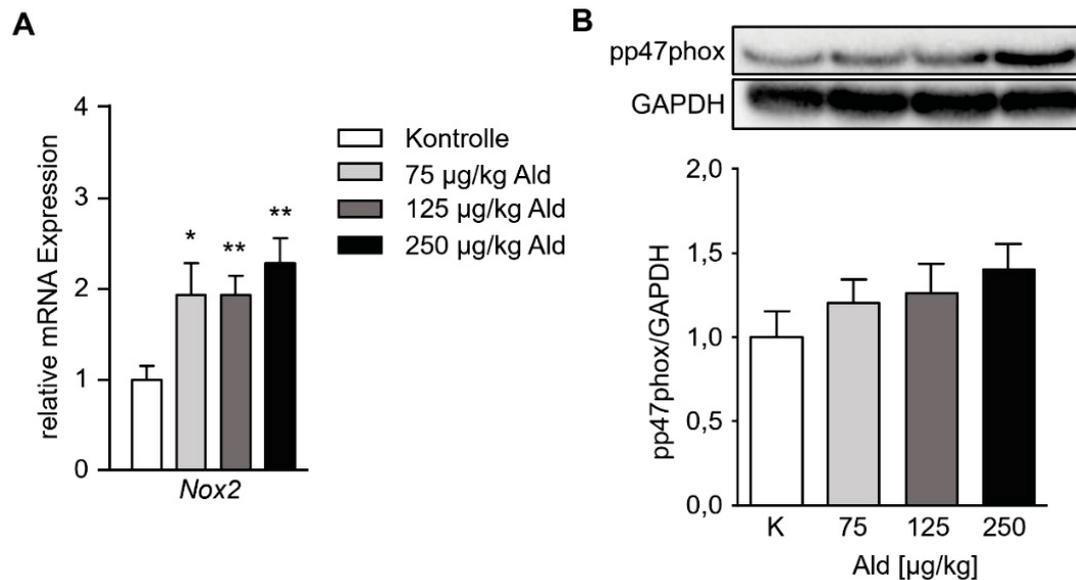
Um zu untersuchen, wie sich eine vierwöchige Ald-Behandlung auf die Expression von klassischen, durch Ald-induzierbaren Genen auswirkt, wurde über quantitative RT-PCR die Expression der  $\alpha$ -Untereinheit des ENaC ( $\alpha$ ENaC) bestimmt. Alle drei verwendeten Ald-Konzentrationen (75, 125 und 250  $\mu$ g/kg) führten zu einer erhöhten Expression von  $\alpha$ ENaC. Die mRNA-Expression von  $\alpha$ ENaC war dabei in allen drei Gruppen signifikant gesteigert verglichen mit der Kontroll-Gruppe (Abbildung 4.8).



**Abbildung 4.8: mRNA-Expression von  $\alpha$ ENaC in der Niere von Aldosteron-infundierten und Kontroll-Mäusen.** Die mRNA-Expression von  $\alpha$ ENaC in den Nieren von Mäusen wurde mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Die RNA wurde aus den Nieren von Kontroll-Mäusen und von Mäusen, denen Aldosteron infundiert wurde, isoliert. Die mRNA-Werte wurden auf *Gapdh* und  *$\beta$ -actin* als Referenz-Gene bezogen. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte + Standardfehler. n = 5. Ald: Aldosteron, K: Kontrolle,  $\alpha$ ENaC:  $\alpha$ -Untereinheit des epithelialen Natriumkanals, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase. \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle.

#### 4.1.7 Effekt einer Aldosteron-Behandlung auf die Produktion von oxidativem Stress

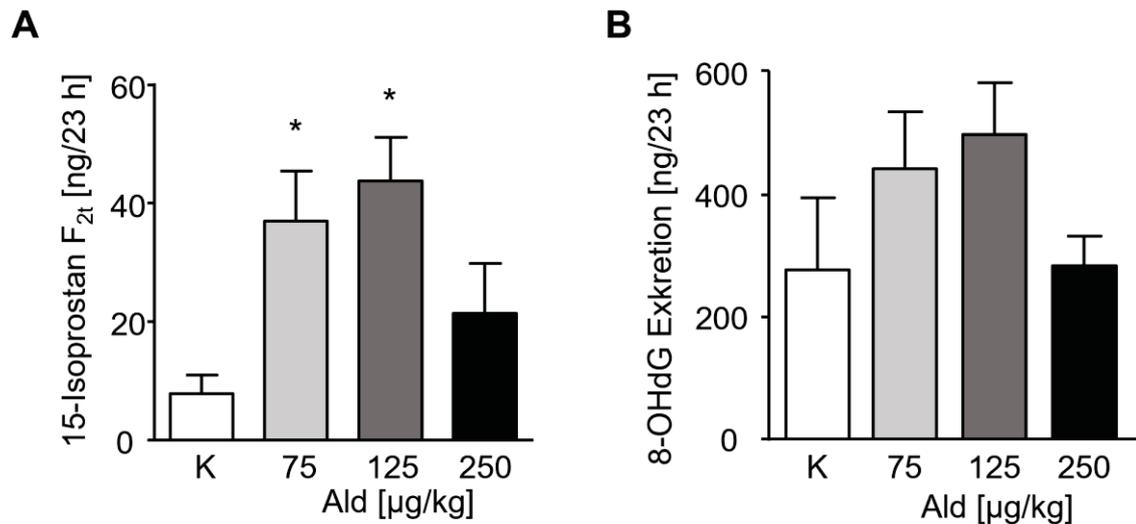
In vorherigen *in vitro*- und *in vivo*- Studien konnte gezeigt werden, dass Ald zu einer Produktion von ROS und oxidativem Stress führt. Als wahrscheinlich verantwortliche Enzyme für den über Ald-induzierten oxidativen Stress wurden die NOX identifiziert. Dabei konnte sowohl eine Aktivierung der NOX als auch eine erhöhte Expression ihrer Untereinheiten nachgewiesen werden [44, 46]. Alle verwendeten Ald-Konzentrationen führten zu einer signifikanten Induktion der mRNA-Expression von *Nox2*, der Hauptuntereinheit von NOX2 (Abbildung 4.9 A). Ebenso konnte eine tendenziell erhöhte Protein-Expression der phosphorylierten und somit aktivierten cytosolischen Untereinheit der NOX2, pp47phox, beobachtet werden (Abbildung 4.9 B).



**Abbildung 4.9: Expression und Aktivierung von NOX2 in der Niere von Aldosteron-infundierten und Kontroll-Mäusen.** **A:** Die mRNA-Expression von *Nox2*, der Hauptuntereinheit von NOX2, in den Nieren von Mäusen wurde mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Die RNA wurde aus den Nieren von Kontroll-Mäusen und von Mäusen, denen Aldosteron infundiert wurde, isoliert. Die mRNA-Werte wurden auf *Gapdh* und  $\beta$ -*actin* als Referenz-Gene normiert. **B:** Gezeigt sind repräsentative Banden der 4 Gruppen für die phosphorylierte cytosolische und somit aktive Untereinheit der NOX2, p47phox. Die Proben wurden jeweils auf das Referenzprotein GAPDH und anschließend auf die Kontroll-Tiere normiert. Die Quantifizierung erfolgte mit dem Programm ImageLab. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte + Standardfehler. n = 5. Ald: Aldosteron, K: Kontrolle, Nox2: NADPH oxidase 2. GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase. \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle.

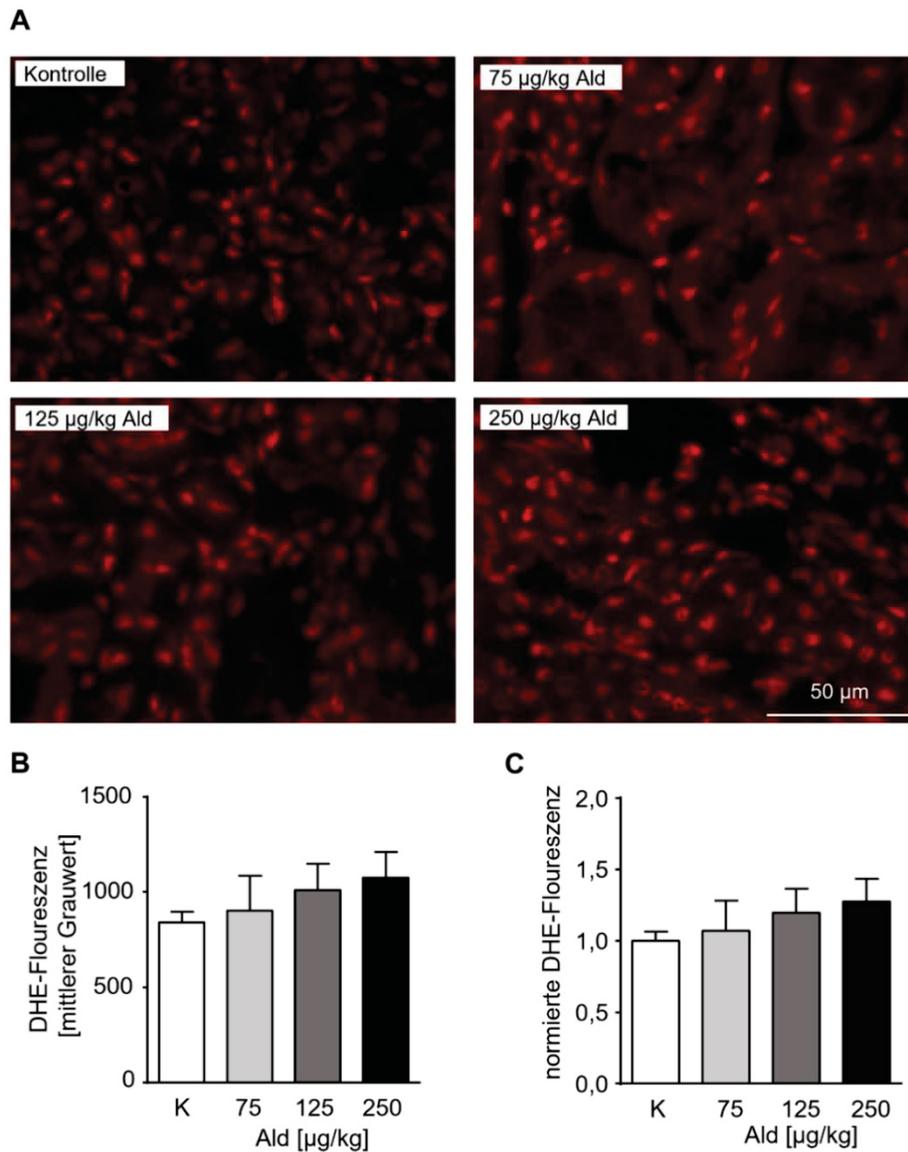
Um zu untersuchen, ob die hier verwendeten Ald-Konzentrationen nach einer 28-tägigen Behandlung auch zu einer Induktion von oxidativem Stress führten, wurde der Sammelurin auf verschiedene stabile Marker hin analysiert. 15-Isoprostan  $F_{2t}$  entsteht als stabiles Produkt bei der Lipidperoxidation. Die durch Oxidation entstehende Basenmodifikation 8-oxodG ist ein oxidiertes Derivat von Deoxyguanosin, dessen ausgeschnittene Form 8-OHdG im Urin nachgewiesen werden kann. Der Nachweis von 15-Isoprostan  $F_{2t}$  und 8-OHdG im Sammelurin der Mäuse nach 28-tägiger Behandlung wurde für den Nachweis von systemischem oxidativem Stress verwendet.

In den mit 75 und 125 µg/kg Ald infundierten Mäusen war eine signifikant erhöhte Exkretion von 15-Isoprostan  $F_{2t}$  zu beobachten. Im Urin der mit 250 µg/kg Ald-infundierten Tiere war nur ein nicht-signifikanter Anstieg nachzuweisen (Abbildung 4.10 A). Die Konzentration von 8-OHdG im Sammelurin über 23 h stieg in der niedrigen und mittleren Ald-Dosis tendenziell im Vergleich zur Kontrolle. Ein Anstieg von 8-OHdG war im Urin der Gruppe mit der höchsten Ald-Konzentration nicht nachweisbar (Abbildung 4.10 B).



**Abbildung 4.10: Nachweis von oxidativen Stressmarkern im Sammelurin von Aldosteron-infundierten und Kontroll-Mäusen nach 28-tägiger Behandlung.** **A:** Menge des durch Peroxidation vermittelten 15-Isoprostans F<sub>2t</sub> im Sammelurin **B:** Menge der ausgeschnittenen und oxidierten Base 8-OHdG im Sammelurin. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte + Standardfehler. n = 5. 8-OHdG: 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosin, Ald: Aldosteron, K: Kontrolle. \*p<0,05 vs. Kontrolle.

Für einen Nachweis von lokalem oxidativem Stress wurde eine DHE-Färbung auf Gefrierschnitten der Nieren durchgeführt. In Abbildung 4.11 A sind repräsentative Bilder der DHE-Färbungen abgebildet. Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität zeigte eine tendenzielle Erhöhung, die mit der jeweils höheren Ald-Dosis weiter zunahm (Abbildung 4.11 B).

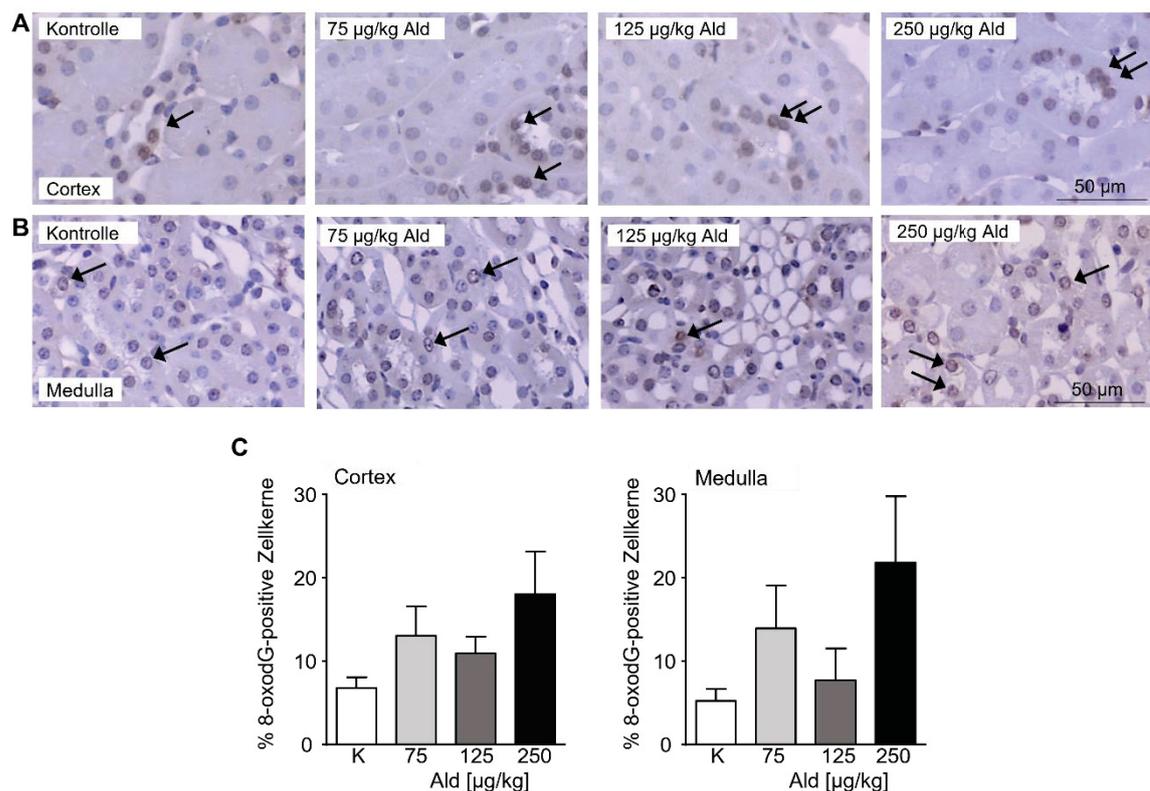


**Abbildung 4.11: Nachweis von ROS auf der Niere von Aldosteron-infundierten und Kontroll-Mäusen mittels DHE.** Für die Visualisierung der ROS wurden Gefrierschnitte der Nieren verwendet und mit dem Farbstoff DHE inkubiert. **A:** Repräsentative Bilder DHE-gefärbter Nierenschnitte. **B:** Quantifizierung der ROS-Produktion durch Messung der mittleren Fluoreszenz der Zellkerne von 10 Gesichtsfeldern pro Maus mit Hilfe von Image J. **C:** Normierte DHE-Fluoreszenz in Relation zur Kontrolle. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert + Standardfehler.  $n = 5$ . 200x Vergrößerung. Maßstab = 50  $\mu\text{m}$ . Ald: Aldosteron, DHE: Dihydroethidium, K: Kontrolle, ROS: reaktive Sauerstoffspezies.

#### 4.1.8 Induktion von DNA-Schäden nach Aldosteron-Behandlung

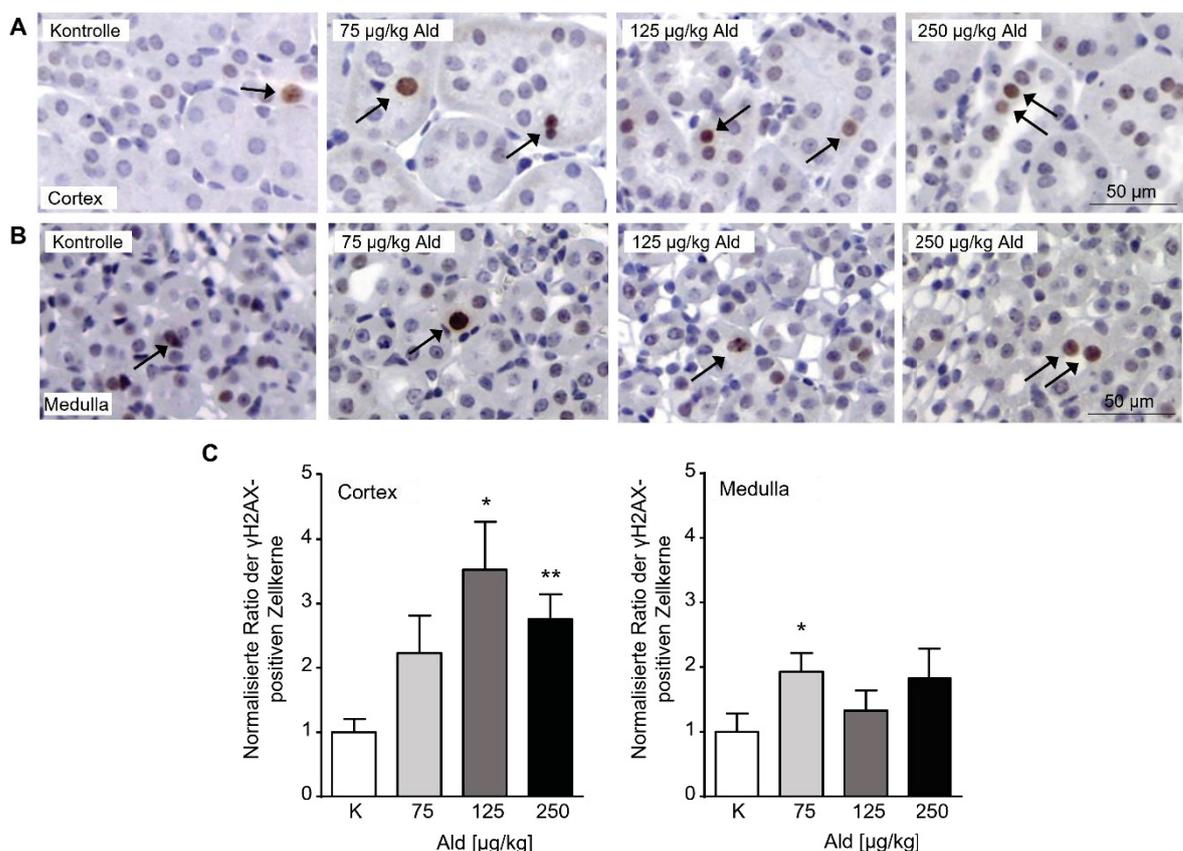
Dass eine Behandlung von Ald über die Bildung von ROS zu einer Induktion von DNA-Schäden führt, konnte bereits in vorangegangenen Studien nachgewiesen werden [55, 76]. Aufgrund dessen wurde in dieser Arbeit untersucht, ob der beobachtete systemische oxidative Stress zu einer Erhöhung der DNA-Schäden in der Niere führte. Hierfür wurde die durch ROS induzierte Basenmodifikation 8-oxodG und als DNA-Schadensmarker die phosphorylierte Form des Histons H2AX ( $\gamma$ H2AX) immunhistochemisch auf Nierengewebschnitten untersucht.

Die immunhistochemische Färbung von 8-oxodG zeigte im Cortex der Niere aufgrund der interindividuellen Variabilität nur einen tendenziellen Anstieg an 8-oxodG positiven Zellkernen, obwohl sich bei der höchsten verwendeten Ald-Dosis von 250  $\mu$ g/kg fast doppelt so viele 8-oxodG positive Zellkerne nachweisen ließen wie im Cortex der Kontrollmäuse (Abbildung 4.12 A und C). In der Medulla war die gleiche Tendenz sichtbar, mit dem höchsten Anteil an 8-oxodG positiven Zellkernen in der Gruppe mit der höchsten Ald-Konzentration (Abbildung 4.12 B und C).



**Abbildung 4.12: Nachweis der Basenmodifikation 8-oxodG in der Niere von Aldosteron-infundierten und Kontrollmäusen.** In Paraffin eingebettete Nierenschnitte wurden mit einem Antikörper gegen die oxidierte Base 8-oxodG angefärbt. **A:** Repräsentative Bilder von kortikalen Nierenschnitten von Kontroll- und Aldosteron infundierten Mäusen. Beispiele für positiv gefärbte Zellkerne sind mit schwarzen Pfeilen markiert. **B:** Repräsentative Bilder von medullären Nierenschnitten von Kontroll- und Aldosteron infundierten Tieren. **C:** Prozentsatz der 8-oxodG-positiv gefärbten Zellkerne in Relation zu der Anzahl der gesamten Zellkerne. Für die Quantifizierung der positiven Kerne wurden 10 Sichtfelder von kortikalen Schnitten und 5 Sichtfelder von medullären Nierenschnitten mit Image J analysiert. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert + Standardfehler, n = 5. 200x Vergrößerung. Maßstab = 50  $\mu$ m. 8-oxodG: 8-Oxo-2'-deoxyguanosin, Ald: Aldosteron, K: Kontrolle.

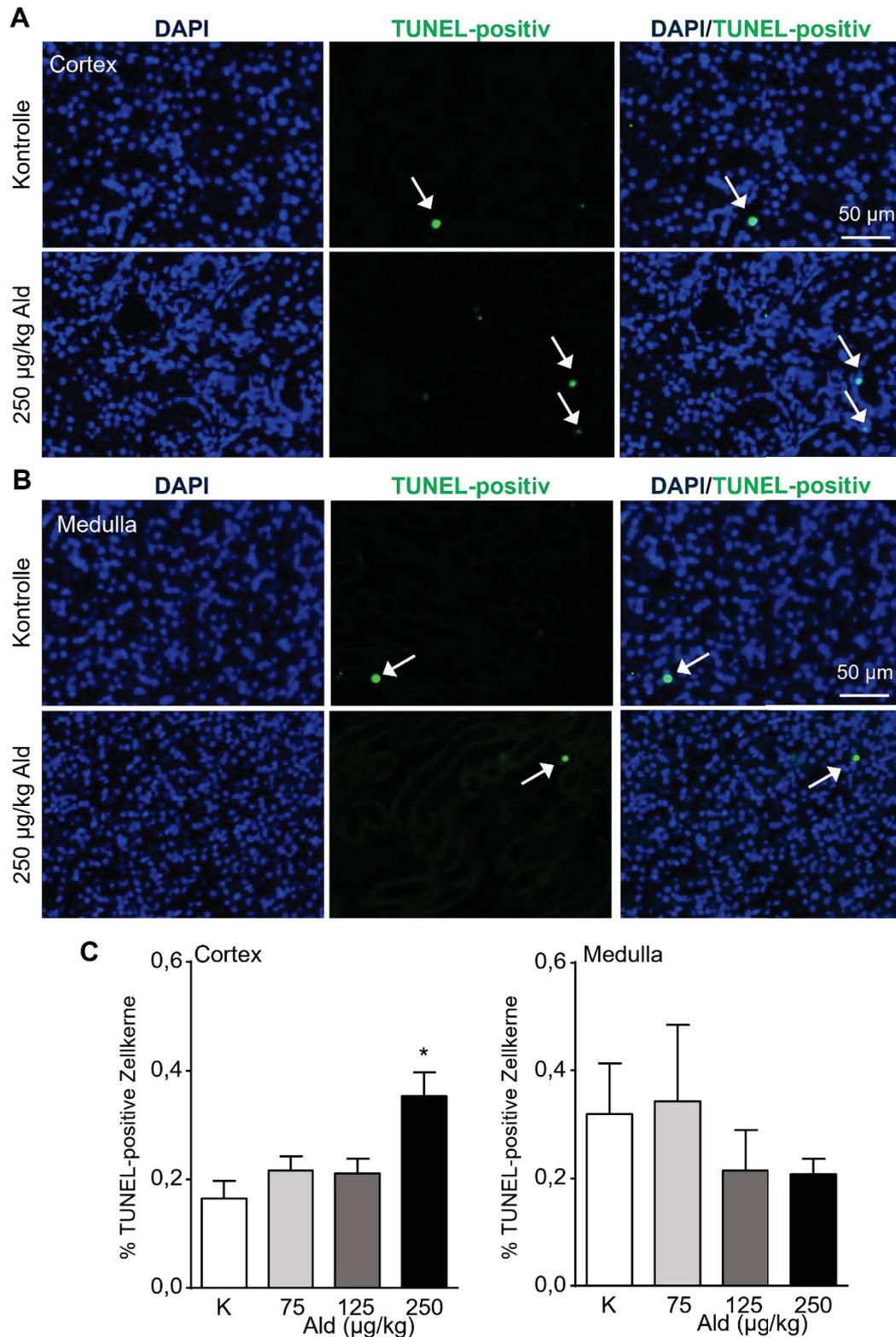
Der immunhistochemische Nachweis von  $\gamma$ H2AX zeigte eine Induktion der Phosphorylierung von H2AX im Cortex der mit Ald behandelten Mäuse (Abbildung 4.13 A). Die Quantifizierung der positiven Zellkerne zeigte eine Verdopplung bis Verdreifachung an  $\gamma$ H2AX-positiven Zellkernen im Nierencortex. Ein signifikanter Anstieg war in den Tieren, die die mittlere und höchste Ald-Dosis erhielten, nachweisbar (Abbildung 4.13 C). Repräsentative Bilder des immunhistochemischen Nachweises von  $\gamma$ H2AX sind in Abbildung 4.13 B dargestellt. In der Nierenmedulla konnte nach der Quantifizierung nur ein signifikanter Anstieg an  $\gamma$ H2AX-positiven Zellkernen in der niedrigsten Ald-Dosis im Vergleich zu Kontrolle nachgewiesen werden. In der mittleren und höchsten Ald-Dosis ließ sich nur eine leichte Tendenz nachweisen (Abbildung 4.13 C).



**Abbildung 4.13:  $\gamma$ H2AX-Färbung zum Nachweis von DNA-Schäden in der Niere von Aldosteron-infundierten Mäusen und Kontrollmäusen.** Paraffinschnitte des Nierengewebes wurden mit einem Antikörper gegen  $\gamma$ H2AX, einem Marker für DNA-Schäden, immunhistochemisch angefärbt. **A:** Repräsentative Bilder im Nierencortex von Kontroll- und Aldosteron-infundierten Mäusen.  $\gamma$ H2AX-positiv Zellkerne sind mit schwarzen Pfeilen markiert. **B:** Repräsentative Bilder in der Nierenmedulla von Kontroll- und Aldosteron-infundierten Mäusen. **C:** Ratio der  $\gamma$ H2AX-positiven Zellkerne normiert auf die Kontrolle. Für die Quantifizierung wurden 10 Gesichtsfelder des Nierencortex und 5 Gesichtsfelder der Nierenmedulla pro Tier mit Hilfe von Image J ausgewertet. Die Anzahl der  $\gamma$ H2AX-positiven Zellkerne wurde auf die Gesamtkernzahl des Bildes bezogen. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert + Standardfehler.  $n = 5$ . 200x Vergrößerung. Maßstab = 50  $\mu$ m. Ald: Aldosteron, K: Kontrolle. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle.

Ob die verursachten Schäden auch zu einem Anstieg an apoptotischen Zellen führten, wurde anschließend mittels des TUNEL-Assays näher untersucht. Repräsentative Bilder aus dem Nierencortex und -mark der mit 250 µg/kg Ald infundierten und Kontroll-Tiere sind in Abbildung 4.14 A+B gezeigt. Die Quantifizierung der TUNEL-positiven Zellkerne zeigte, dass nur die höchste Ald-Dosis im Cortex zu einem signifikanten Anstieg apoptotischer Zellen geführt hatte. In der Medulla konnte kein signifikanter Unterschied zur Kontroll-Gruppe nachgewiesen werden. Ein tendenziell geringerer Anteil an TUNEL-positiven Zellkernen konnte in der mittleren und hohen Dosis-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe beobachtet werden (Abbildung 4.14 C).

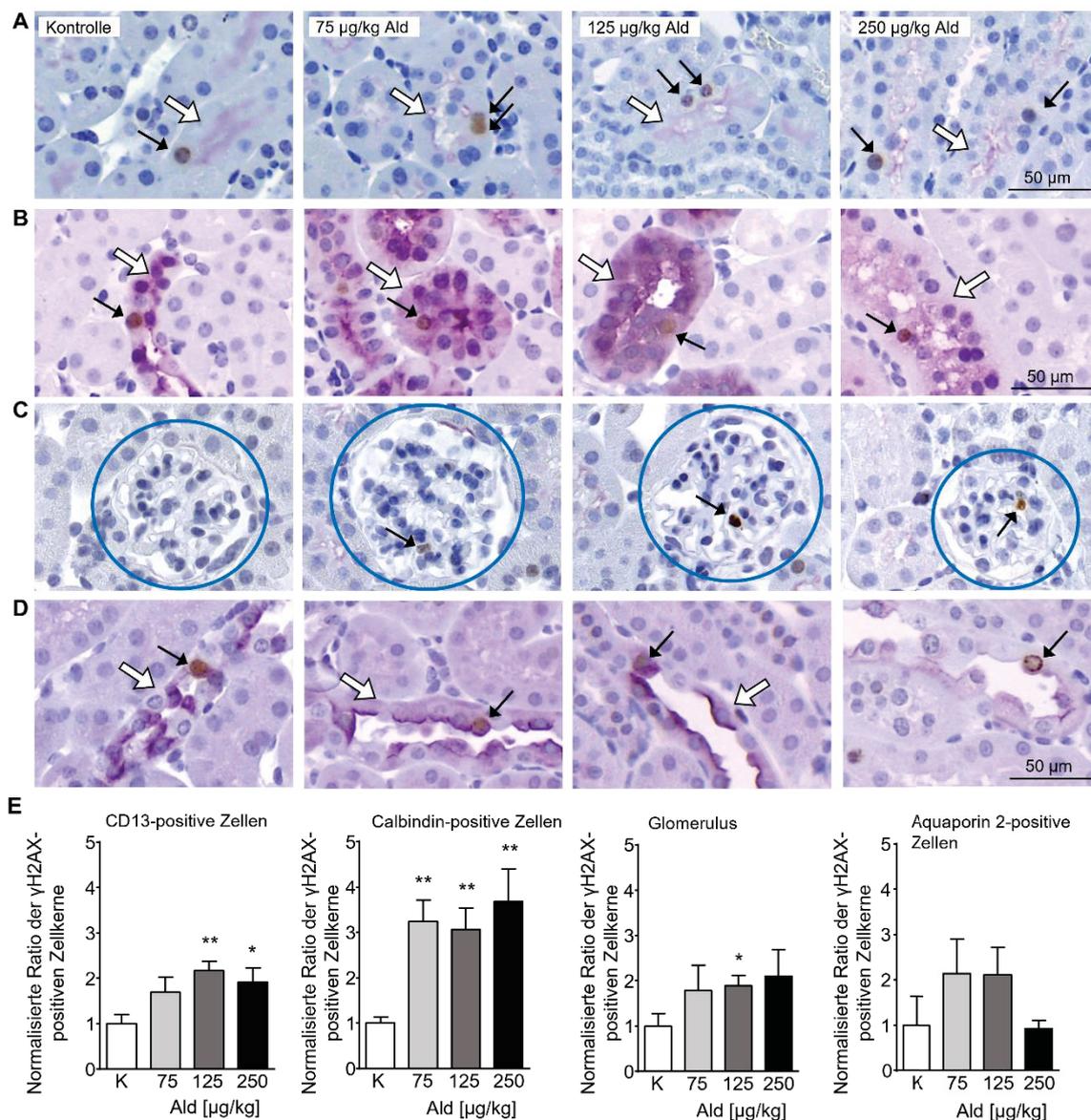
Weiterführende Untersuchungen zu Proteinen der DNA-Reparatur zeigten keine Veränderung der mRNA-Expression für *DNA-(apurinische/apyrimidimische) Endonuklease (Apex1)*, *Ataxia Telangiectasia Mutated (Atm)*, *Ligase 4 (Lig4)* und *8-Oxoguanin-Glykosylase 1 (Ogg1)*. Für *Brustkrebsgen 1 (Breast Cancer 1, Brac1)* und *Ligase 1 (Lig1)* konnte ein tendenzieller Anstieg in allen mit Ald-behandelten Mäusen im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (siehe Anhang, Abbildung 10.1). Eine signifikant höhere Expression der DNA-Reparatur-assoziierten Proteine Poly-(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) und *Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen (PCNA)* konnte für Ald-infundierte Mäuse im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen nachgewiesen werden (siehe Anhang, Abbildung 10.2 + 10.3).



**Abbildung 4.14: TUNEL-Assay zum Nachweis apoptotischer Zellen auf dem Nierengewebe von Aldosteron-infundierten Mäusen und Kontroll-Mäusen. A:** Repräsentative Bilder der Fluoreszenz-Färbung im Nierencortex von Kontroll- und Aldosteron-infundierten Mäusen. TUNEL-positive Zellkerne sind mit weißen Pfeilen markiert. Im DAPI-Filter sind alle Zellkerne und im FITC-Filter TUNEL-positive Zellkerne zu sehen. **B:** Repräsentative Bilder der Nierenmedulla von Kontroll- und Aldosteron-infundierten Mäusen. **C:** TUNEL-positive Zellkerne in Relation zu der Anzahl an Zellkernen in Prozent. Für die Quantifizierung wurden 10 Gesichtsfelder des Nierencortex und 5 Gesichtsfelder der Nierenmedulla pro Tier mit Hilfe von Image J ausgewertet. Die Anzahl der TUNEL-positiven Zellkerne wurde auf die Gesamtkernzahl des Bildes bezogen. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert + Standardfehler. n = 5. 200x Vergrößerung. Maßstab = 50 μm. Ald: Aldosteron, K: Kontrolle, TUNEL: *TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*. \* $p \leq 0,05$  vs. Kontrolle.

#### 4.1.9 Lokalisation der Aldosteron-induzierten DNA-Schäden in der Niere

Um die im Nierencortex nachgewiesenen DNA-Schäden zu lokalisieren, wurden immunhistochemische Doppelfärbungen durchgeführt. In der Doppelfärbung wurden für die Identifizierung der verschiedenen Zelltypen spezifische Antikörper und für den Nachweis von DNA-Schäden ein Antikörper gegen  $\gamma$ H2AX genutzt. Mit CD13 wurden proximale Tubuluszellen nachgewiesen (Abbildung 4.15 A). Calbindin diente zur Identifizierung von Zellen des distalen Tubulus und des frühen Sammelrohres (Abbildung 4.15 B) und Aquaporin-2-positive Zellen gehören dem Sammelrohr oder späten distalen Tubulus an (Abbildung 4.15 D). Die Glomeruli wurden anhand ihrer Struktur identifiziert (Abbildung 4.15 C). Die höchste Induktion von DNA-Schäden konnte in Calbindin-positiven Zellen gezeigt werden. In allen drei Behandlungsgruppen stieg der Anteil an  $\gamma$ H2AX-positiven Zellkernen signifikant zur Kontroll-Gruppe um ca. das 3-fache an. In glomerulären, CD13- und Aquaporin-2-positiven Zellen stieg der Anteil an  $\gamma$ H2AX positiven Zellkernen um das 1-5-fache an. Die Anzahl an  $\gamma$ H2AX-positiven Zellkernen war in CD13-positiven Zellen in mit 125 und 250  $\mu$ g/kg infundierten Mäusen signifikant gegenüber den Kontroll-Mäusen gesteigert. In glomerulären Zellen war nur eine Signifikanz in Relation zur Kontrolle in der Gruppe der mittleren Dosis nachzuweisen.



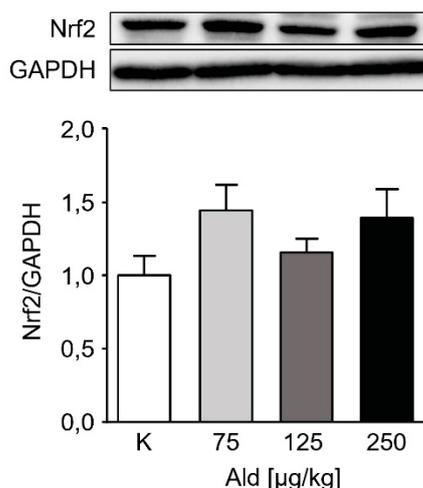
**Abbildung 4.15: Lokalisierung der von Aldosteron verursachten DNA-Schäden.** A-D: Repräsentative Bilder für die Lokalisation von  $\gamma$ H2AX in den Nierenzellen. Die Doppelfärbungen wurden auf Paraffinschnitten der Nieren von Aldosteron-infundierten und Kontroll-Tieren nach 28-tägiger Behandlung durchgeführt. Für die Doppelfärbungen wurde ein Antikörper gegen  $\gamma$ H2AX (braune Färbung) und gegen Zell-spezifische Antigene (violette Färbung) eingesetzt. **A:** Für die proximalen Tubuluszellen wurde ein Antikörper gegen CD13, als Marker für proximale Tubuluszellen, welcher im Bürstensaum lokalisiert ist. **B:** Distale Tubuluszellen und Zellen des oberen Sammelrohres wurden über einen Antikörper gegen Calbindin identifiziert. **C:** Der Glomerulus wurde anhand seiner Struktur identifiziert und ist mit blauen Kreisen eingerahmt. **D:** Sammelrohrzellen und Zellen des späten distalen Tubulus wurden über einen Antikörper gegen Aquaporin 2 angefärbt. **E:** Die Quantifizierung der Doppelfärbungen zeigt das Verhältnis der  $\gamma$ H2AX-positiven Zellkernen in der jeweiligen Nierenstruktur, normalisiert auf die Kontroll-Gruppe. Für die Quantifizierung der  $\gamma$ H2AX-positiven Zellkerne in CD13-, Calbindin- und Aquaporin-2-positiven Zellen wurden 10 Sichtfelder von kortikalen Nierenschnitten analysiert. Für die Quantifizierung im Glomerulus wurden je 50 Glomeruli evaluiert. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert + Standardfehler. n = 5. 400x Vergrößerung. Maßstab = 50  $\mu$ m. Ald: Aldosteron, K: Kontrolle. \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle.

#### 4.1.10 Einfluss einer Aldosteron-Behandlung auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2

Da in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte, dass eine Behandlung mit Ald zu oxidativem Stress und daraus resultierenden DNA-Schäden führt, wurde weiterführend untersucht, ob es infolgedessen auch zu einer Aktivierung und Translokation des Transkriptionsfaktors Nrf2 kommt. Nrf2 ist ein redox-sensitiver Transkriptionsfaktor, welcher durch oxidativen Stress aktiviert wird und die Transkription von Genen der antioxidativen Abwehr induziert.

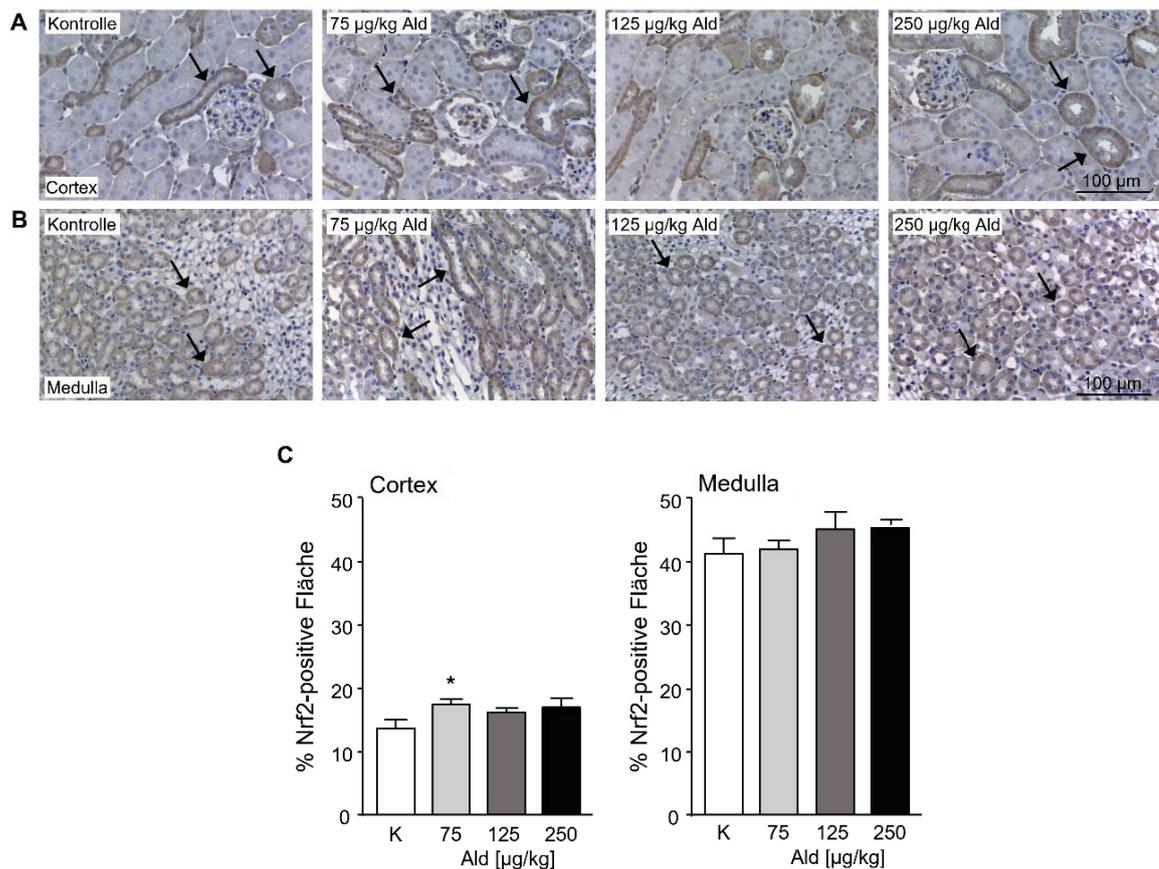
##### 4.1.10.1 Nrf2-Expression in der Niere

Zunächst wurde analysiert, ob es durch die Induktion von Ald zu einer erhöhten Nrf2-Expression oder -Stabilisierung in der Niere kam. Die Protein-Expression war in Isolaten der Nieren tendenziell, jedoch nicht signifikant, erhöht. Dabei konnte in den mit 75 und 250 µg/kg Ald infundierten Mäusen die höchste Nrf2-Expression beobachtet werden (Abbildung 4.16).



**Abbildung 4.16: Western Blots zum Nachweis der Nrf2-Expression auf Proteinebene.** Gezeigt sind repräsentative Banden der 4 Gruppen. Die Proben wurden jeweils auf das Referenzprotein GAPDH und anschließend auf die Kontroll-Tiere normiert. Die Quantifizierung erfolgte mit dem Programm ImageLab. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte + Standardfehler. n = 5. Ald: Aldosteron, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, K: Kontrolle, Nrf2: *Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2*.

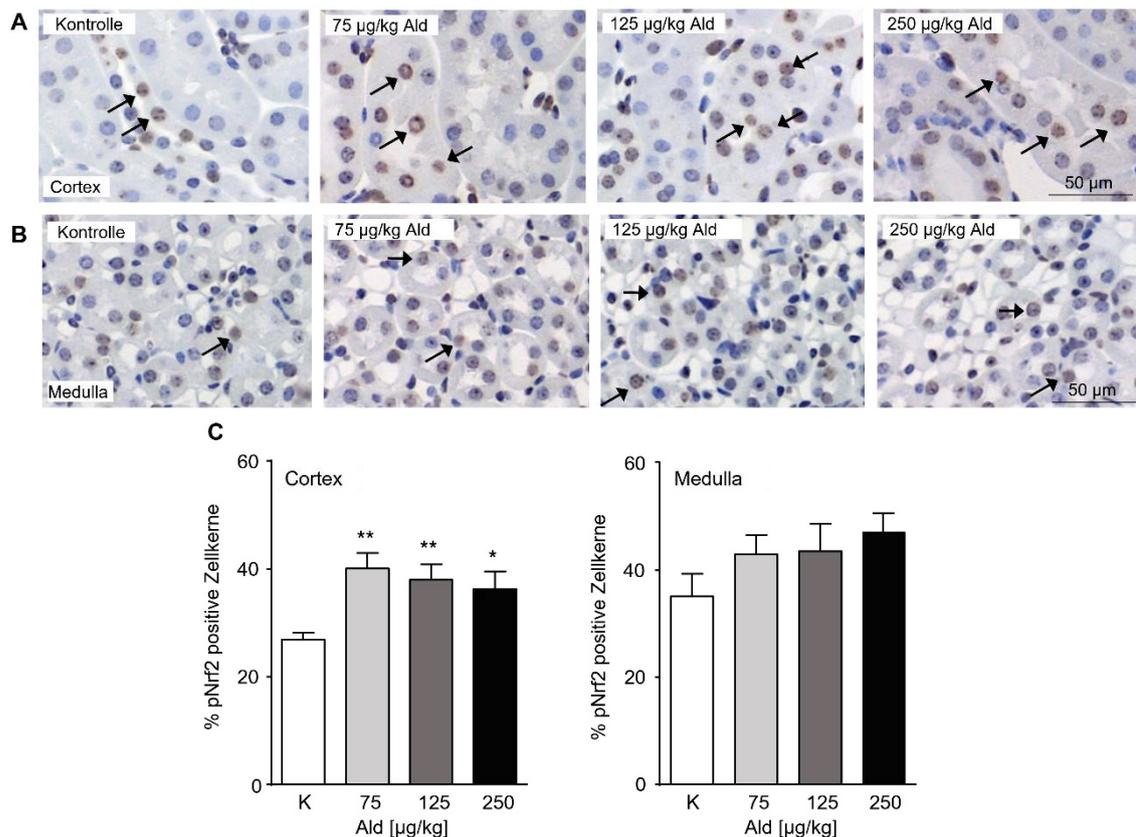
Der immunhistochemische Nachweis von Nrf2 auf Nierengewebe der Ald-infundierten Mäuse zeigte im Cortex ebenfalls einen erhöhten Proteingehalt (Abbildung 4.17 A). In der Quantifizierung konnte gezeigt werden, dass die Nrf2-positive Fläche im Nierencortex in der niedrigsten Ald-Behandlung signifikant erhöht gegenüber der Kontrolle war (Abbildung 4.17 C). In der Medulla war die basale Menge an Nrf2-positiver Fläche höher verglichen mit dem Cortex. Ein signifikanter Effekt der Ald-Infusion konnte nicht beobachtet werden (Abbildung 4.17 B+C).



**Abbildung 4.17: Nachweis von Nrf2 auf Nierengewebe von Aldosteron-infundierten Mäusen und Kontrollmäusen.** Paraffinschnitte des Nierengewebes wurden mit einem Antikörper gegen Nrf2 immunhistochemisch angefärbt. **A:** Repräsentative Bilder des Nierencortex von Kontroll- und Aldosteron-infundierten Mäusen. Beispiele für Nrf2-positive Flächen sind mit schwarzen Pfeilen markiert. **B:** Repräsentative Bilder der Nierenmedulla von Kontroll- und Aldosteron-infundierten Mäusen. **C:** Prozentualer Anteil der Nrf2-positiven Fläche in Bezug auf die Gesamtfläche. Für die Quantifizierung wurden 10 Gesichtsfelder des Nierencortex und 5 Gesichtsfelder der Nierenmedulla pro Tier mit Hilfe von Image J ausgewertet. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert + Standardfehler. n = 5. 200x Vergrößerung. Maßstab = 100 µm. Ald: Aldosteron, K: Kontrolle, Nrf2: *nuclear factor-erythroid-2-related factor*. \*p≤0.05 vs. Kontrolle.

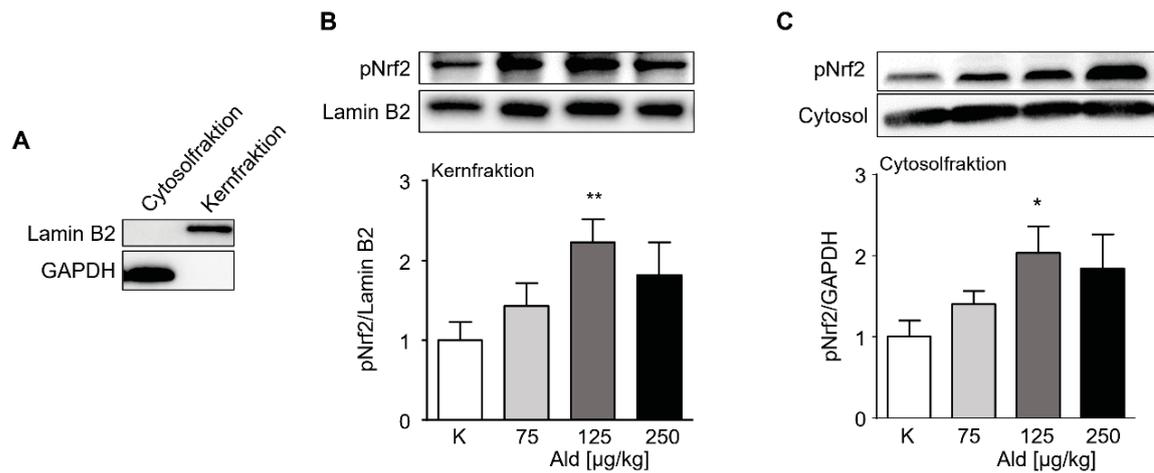
#### 4.1.10.2 Translokation des phosphorylierten und somit aktivierten Nrf2

Die Anwesenheit des an Ser40 phosphorylierten Nrf2 (pNrf2) auf den Nierenschnitten wurde analysiert. Diese posttranslationale Modifikation weist auf einen aktiven Status von Nrf2 in Antwort auf oxidativen Stress hin [125]. Eine immunhistochemische Färbung von pNrf2 auf dem Nierengewebe zeigte eine Lokalisation von pNrf2 primär im Kern (Abbildung 4.18 A+B). In allen drei Ald-Gruppen konnte im Cortex ein signifikant höherer Anteil an pNrf2-positiven Zellkernen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe nachgewiesen werden. Dabei stieg der Anteil an positiven Kernen jedoch nicht mit einer erhöhten Ald-Dosis. In den Kontrollmäusen waren in der Medulla basal mehr pNrf2-positive Kerne vorzufinden. Gegenüber den Ald-behandelten Gruppen konnte nur ein tendenzieller Anstieg gezeigt werden, der jedoch mit einer höheren Ald-Dosis zunahm (Abbildung 4.18 C).



**Abbildung 4.18: pNrf2-Färbung zum Nachweis der Nrf2-Aktivierung in der Niere von Aldosteron-infundierten Mäusen und Kontrollmäusen.** In Paraffin eingebettete Nierenschnitte wurden mit einem Antikörper gegen Nrf2 angefärbt, der an Ser40 phosphoryliert und somit aktiviertes Nrf2 (pNrf2) zeigt. **A:** Repräsentative Bilder des Nierencortex von Kontroll- und Aldosteron-infundierten Mäusen. pNrf2-positive Zellkerne sind mit schwarzen Pfeilen markiert. **B:** Repräsentative Bilder der Nierenmedulla von Kontroll- und Aldosteron-infundierten Mäusen. **C:** Prozentualer Anteil an pNrf2-positiven Zellkernen in Nierencortex und -medulla. Für die Quantifizierung wurden 10 Gesichtsfelder des Nierencortex und 5 Gesichtsfelder der Nierenmedulla pro Tier mit Hilfe von Image J ausgewertet. Die Anzahl der positiven Zellkerne wurde auf die Anzahl der Gesamtzellkerne bezogen. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert + Standardfehler. n = 5. 200x Vergrößerung. Maßstab = 50 µm. Ald: Aldosteron. Nrf2: *Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2*, pNrf2: Nrf2 phosphoryliert an Ser40. \*p<0,05, \*\*p<0,01 vs. Kontrolle.

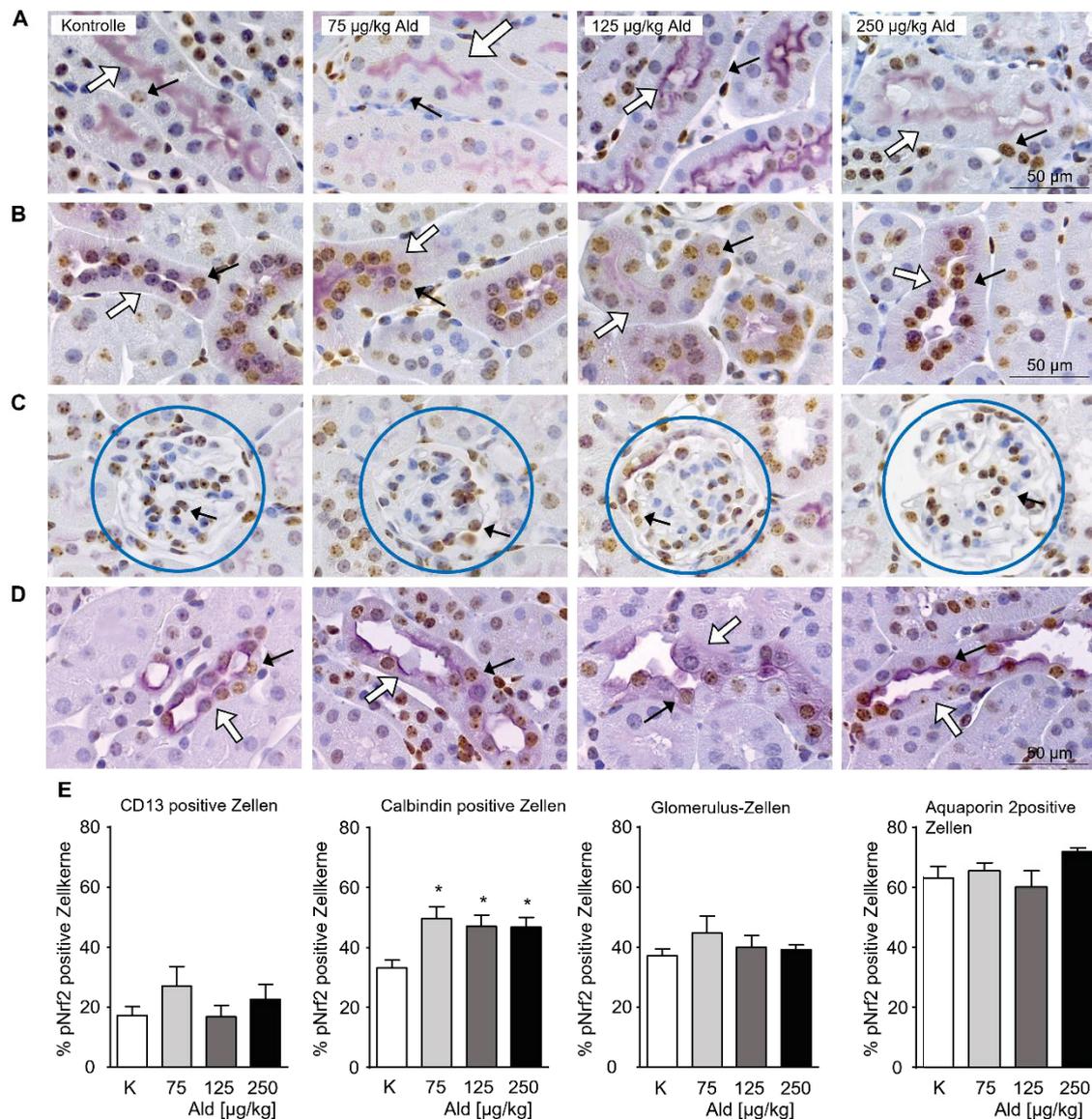
Für eine weitere Untersuchung der Translokation des phosphorylierten Nrf2 in den Zellkern wurde aus den Nierenhomogenaten die Cytosol- und die Kernfraktion gewonnen. So konnte zwischen einer Lokalisation im Kern oder im Cytosol unterschieden werden. Die erfolgreiche Isolation der Kernproteine wurde mit Hilfe von Lamin B2, einem nuklearen Protein, und GAPDH als Cytosolmarker nachgewiesen (Abbildung 4.19 A). Sowohl in der Kern- als auch in der Cytosolfraction konnte in mit 125 µg/kg Ald behandelten Mäusen eine signifikant erhöhte Anwesenheit von pNrf2 nachgewiesen werden. In mit 250 µg/kg infundierten Mäusen war der pNrf2 Gehalt tendenziell erhöht (Abbildung 4.19 B+C).



**Abbildung 4.19: Western Blots zum Nachweis von pNrf2 in der Kern- und Cytosolfraktion aus Nierenhomogenaten von Aldosteron-infundierten Mäusen und Kontrollmäusen.** Für eine genauere Untersuchung der pNrf2-Lokalisation wurden Kern- und Cytosolfractionen aus Nierenhomogenaten gewonnen. **A:** Gezeigt sind repräsentative Banden einer Cytosol- und Kernfraktion mit den entsprechenden Referenzproteinen Lamin B2 und GAPDH. **B:** Gezeigt sind repräsentative Banden der 4 Kernfraktion sowie die Quantifizierung von pNrf2. **C:** Gezeigt sind repräsentative Banden der jeweiligen Cytosolfraction sowie die Quantifizierung von pNrf2. Die Proben wurden jeweils auf das Referenzprotein GAPDH oder Lamin B2 und anschließend auf die Kontroll-Tiere normiert. Die Quantifizierung erfolgte mit ImageLab. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte + Standardfehler. n = 5. Ald: Aldosteron, GAPDH: Glycerinaldehyd -3-Phosphat-Dehydrogenase, K: Kontrolle, pNrf2: *Nuclear factor-erythroid-2-related factor*, pNrf2: Nrf2 phosphoryliert an Ser40. \*p<0,05, \*\*p<0,01 vs. Kontrolle.

#### 4.1.10.3 Lokalisation der Nrf2-Aktivierung

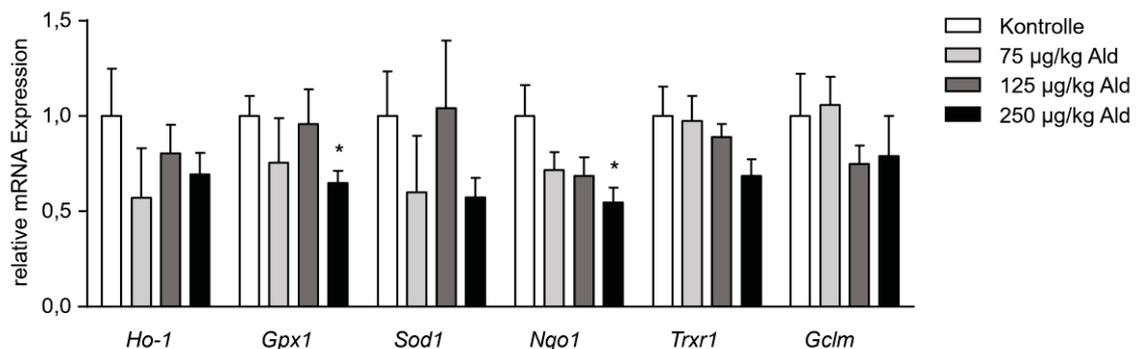
Nachdem ein erhöhter pNrf2-Gehalt in den Ald-Gruppen im Nierencortex nachgewiesen werden konnte, wurde für eine Lokalisation des phosphorylierten und somit aktivierten pNrf2 eine Doppelfärbung durchgeführt. Nach einem immunhistochemischen Nachweis von pNrf2 folgte ein immunhistochemischer Nachweis eines für einen bestimmten Abschnitt des Tubulusystems spezifischen Antigens. Über CD13 wurden proximale Tubuluszellen identifiziert (Abbildung 4.20 A). Der Nachweis von Zellen des distalen Tubulus und oberen Sammelrohres hingegen erfolgte über Calbindin (Abbildung 4.20 B). Die Identifikation der Glomeruli erfolgte über deren markante Struktur und als Marker für Sammelrohrzellen und Zellen des späten distalen Tubulus diente Aquaporin-2 (Abbildung 4.20 C+D). Die Untersuchung der Verteilung von pNrf2 zeigte zunächst eine unterschiedliche basale Verteilung von pNrf2-positiven Zellkernen innerhalb der vier Tubulusabschnitte (proximale Tubuli, distale Tubuli, Glomeruli und Sammelrohre) des Nierencortex. Während der pNrf2-Gehalt in CD13-positiven Zellen bei rund 20 % lag, war der Gehalt an Calbindin-positiven und Glomerulus-Zellen doppelt so hoch. In Aquaporin-2-positiven Zellen war der Anteil an pNrf2-positiven Zellen sogar vervierfacht im Vergleich zu den CD13-positiven Zellen. Die Ald-Infusion führte jedoch nur in Calbindin-positiven Zellen zu einem signifikanten Anstieg an pNrf2 in allen drei Dosisgruppen (Abbildung 4.20 E).



**Abbildung 4.20: Lokalisierung der Aktivierung des Transkriptionsfaktors pNrf2 in der Niere von Aldosteron-infundierten Mäusen und Kontrollmäusen. A-D:** Repräsentative Bilder der Lokalisation von pNrf2 in den Nierenzellen. Die Doppelfärbungen wurden auf Paraffinschnitten der Nieren von Aldosteron-infundierten und Kontroll-Tieren nach 28-tägiger Behandlung durchgeführt. Für die Doppelfärbungen wurden Antikörper gegen pNrf2, der an das an Ser40 phosphorylierte und somit aktivierte Nrf2 (pNrf2) bindet (braune Färbung), und gegen Zell-spezifische Antigene verwendet (violette Färbung) **A:** Für die proximalen Tubuluszellen wurde ein Antikörper gegen CD13, als Marker für proximale Tubuluszellen, welcher im Bürstensaum lokalisiert ist. **B:** Distale Tubuluszellen und Zellen des oberen Sammelrohres wurden über einen Antikörper gegen Calbindin identifiziert. **C:** Der Glomerulus wurde anhand seiner Struktur identifiziert und ist mit blauen Kreisen eingerahmt. **D:** Sammelrohrzellen und Zellen des späten distalen Tubulus wurden über einen Antikörper gegen Aquaporin 2 angefärbt. **E:** Die Quantifizierung der Doppelfärbungen zeigt das Verhältnis der pNrf2-positiven Zellkerne zu der Menge der gesamten Zellkerne in der jeweiligen Nierenstruktur. Für die Quantifizierung der pNrf2-positiven Zellkerne in CD13-, Calbindin- und Aquaporin-2-positiven Zellen wurden 10 Sichtfelder von kortikalen Nierenschnitten analysiert. Für die Quantifizierung im Glomerulus wurden je 50 Glomeruli evaluiert. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert + Standardfehler. n = 5. 200x Vergrößerung. Maßstab = 50 µm. Ald: Aldosteron, K: Kontrolle, Nrf2: *nuclear factor-erythroid-2-related factor 2*, pNrf2: phosphoryliert an Ser40. \*p<0,05 vs. Kontrolle.

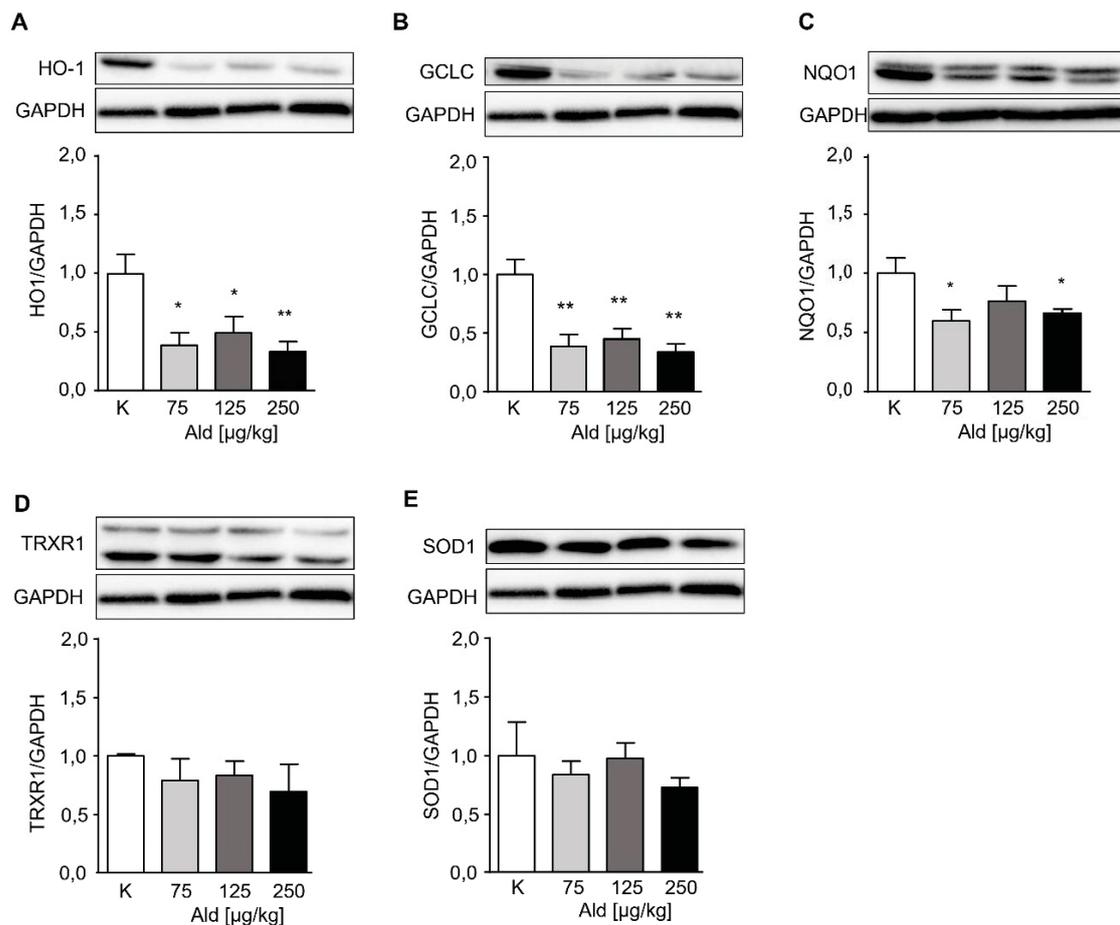
#### 4.1.11 Effekt der Aldosteron-Behandlungen auf die Expression von Nrf2-regulierten Zielgenen und -proteinen

Nachfolgend wurde analysiert, ob die nachgewiesene Aktivierung und Translokation von Nrf2 in den Ald-behandelten Gruppen auch zu einer erhöhten Expression von Nrf2-Zielgenen und -proteinen führte. Eine erhöhte mRNA-Expression von Nrf2-regulierten Genen konnte in den Nieren der Ald-infundierten Mäuse nicht nachgewiesen werden. Stattdessen zeigten die sechs untersuchten Gene eine Tendenz zur niedrigeren Expression im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen. In Mäusen, die mit der höchsten Ald-Dosis behandelt wurden, konnte für *Nqo1* und *Gpx1* sogar eine signifikant niedrigere Expression im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden (Abbildung 4.21).



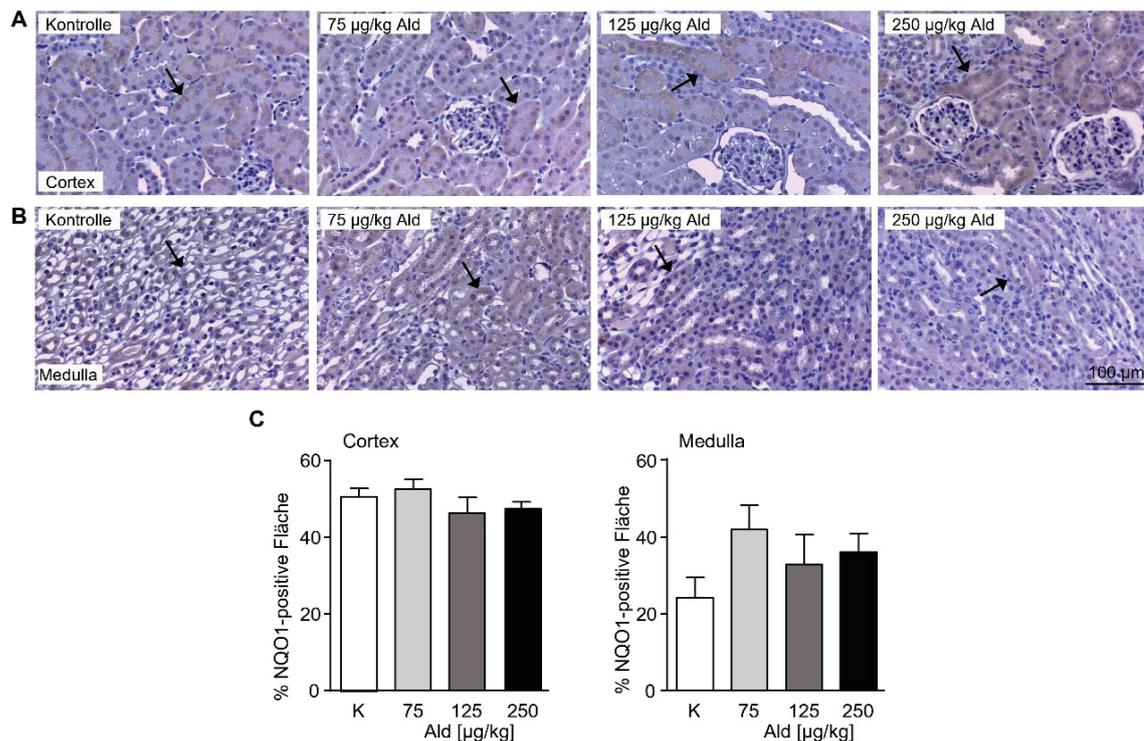
**Abbildung 4.21: mRNA-Expression von Nrf2-regulierten Genen in Aldosteron-infundierten Mäusen und Kontroll-Mäusen.** Die mRNA-Expression von *Ho1*, *Gpx1*, *Sod1*, *Nqo1*, *Trxr1* und *Gclm* in den Nieren von Mäusen wurde mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Die RNA wurde aus den Nieren von Kontroll-Mäusen und von Mäusen, denen Aldosteron infundiert wurde, isoliert. Die mRNA-Werte wurden auf *Gapdh* und  $\beta$ -*actin* als Referenz-Gene bezogen. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte + Standardfehler, n = 5. Ald: Aldosteron, *Gpx1*: Glutathionperoxidase 1, *Sod1*: Superoxiddismutase 1, *Ho-1*: Hämoxxygenase 1, *Nqo1*: NAD(P)H-(Chinon)-Dehydrogenase 1, *Trxr1*: Thioredoxinreduktase 1, *Gclm*: Glutamat-Cystein-Ligase regulatorische Untereinheit, *Gapdh*: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase. \* $p \leq 0,05$  vs. Kontrolle.

Auf Proteinebene konnte in allen drei Ald-Gruppen eine signifikant niedrigere Expression von HO-1 und GCLC im Vergleich zur Kontroll-Gruppe beobachtet werden (Abbildung 4.22 B+C). Für NQO1 wurde in den Mäusen, die mit der niedrigsten und höchsten Ald-Dosis behandelt wurden, eine signifikant geringere Protein-Expression nachgewiesen werden. Mit der mittleren Dosis konnte eine Tendenz gezeigt werden (Abbildung 4.22 A). Keine signifikanten Veränderungen konnten für die Proteine TRXR1 und SOD1 nachgewiesen werden, hier war vereinzelt eine tendenziell geringere Protein-Expression zu sehen (Abbildung 4.22 D+E).



**Abbildung 4.22: Western Blots zum Nachweis von Nrf2-regulierten Proteinen in der Niere von Aldosteron-infundierten Mäusen und Kontrollmäusen.** Gezeigt sind repräsentative Banden der 4 Gruppen und die Quantifizierung der Expression der Proteine HO-1 (A), GCLC (B), NQO1 (C), TRXR1 (D) und SOD1 (E). Für den Nachweis der Expression wurden mehrere Blots verwendet. Die Proben wurden jeweils auf das Referenzprotein GAPDH und anschließend auf die Kontroll-Tiere normiert. Die Quantifizierung erfolgte mit ImageLab. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte + Standardfehler. n = 5. Ald: Aldosteron, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, GCLC: Glutamat-Cysteinylgase, katalytische Untereinheit, HO-1: Hämoxigenase 1, K: Kontrolle, NQO1: NAD(P)H-(Chinone) Dehydrogenase 1, Nrf2: *Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2*. SOD1: Superoxiddismutase 1, TRXR1: Thioredoxinreduktase 1.  $p \leq 0,05$ ,  $**p < 0,01$  vs. Kontrolle.

Ein immunhistochemischer Nachweis des Nrf2-regulierten Proteins NQO1 zeigte auf dem Nierengewebe Ald-behandelter Mäuse weder im Cortex noch in der Medulla signifikante Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollmäusen. In der Medulla welcher Ald-infundierter Mäuse war jedoch tendenziell eine größere NQO1-positive Fläche zu beobachten (Abbildung 4.23).

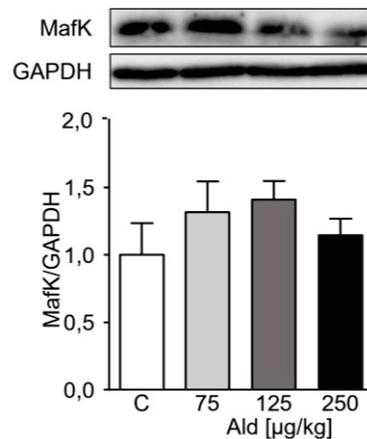


**Abbildung 4.23: Nachweis von NQO1 auf Nierengewebe von Aldosteron-infundierten und Kontrollmäusen.** Paraffinschnitte des Nierengewebes wurden mit einem Antikörper gegen NQO1 immunhistochemisch angefärbt. **A:** Repräsentative Bilder des Nierencortex von Kontroll- und Aldosteron-infundierten Mäusen. Beispiele für NQO1-positive Flächen sind mit schwarzen Pfeilen markiert. **B:** Repräsentative Bilder der Nierenmedulla von Kontroll- und Aldosteron-infundierten Mäusen. **C:** Prozentualer Anteil der NQO1-positiven Fläche in Bezug auf die Gesamtfläche. Für die Quantifizierung wurden 10 Gesichtsfelder des Nierencortex und 5 Gesichtsfelder der Nierenmedulla pro Tier mit Hilfe von Image J ausgewertet. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert + Standardfehler. n = 5. 200x Vergrößerung. Maßstab = 100 µm. Ald: Aldosteron, K: Kontrolle, NQO1: NAD(P)H-(Chinone) Dehydrogenase.

#### 4.1.12 Effekt einer Aldosteron-Behandlung auf die Keap1 unabhängige Regulation von Nrf2

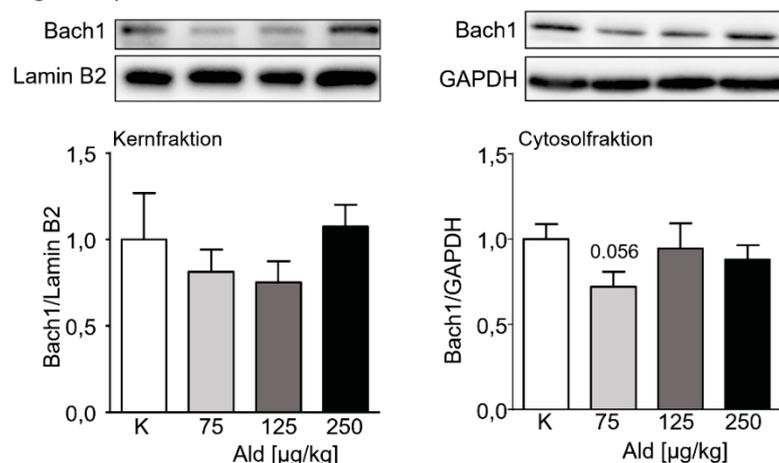
Nachdem beobachtet werden konnte, dass die vermeintliche Aktivierung und Translokation von Nrf2 nicht zu einer Induktion der Genexpression, sondern eher zu einer geringeren Expression der Nrf2-Zielgene führte, wurde fortführend der Einfluss der Ald-Behandlung auf die Keap1-unabhängige Regulation von Nrf2 in der Niere genauer untersucht.

Für die Bindung an die DNA bildet Nrf2 im Kern ein Heterodimer mit sMaf-Proteinen. Die Bildung des dimeren Komplexes ist für die Bindung an die DNA und Induktion der Expression von Nrf2-Zielgenen essenziell [126]. Aus diesem Grund wurde die Expression des sMaf-Proteins MafK mittels Western Blot genauer analysiert. Die Ald-Behandlung der Mäuse führte in keiner der verwendeten Konzentrationen zu einem signifikanten Unterschied der MafK-Expression in der Niere, in der niedrigen und mittleren Dosis war eine tendenzielle Induktion zu beobachten (Abbildung 4.24).



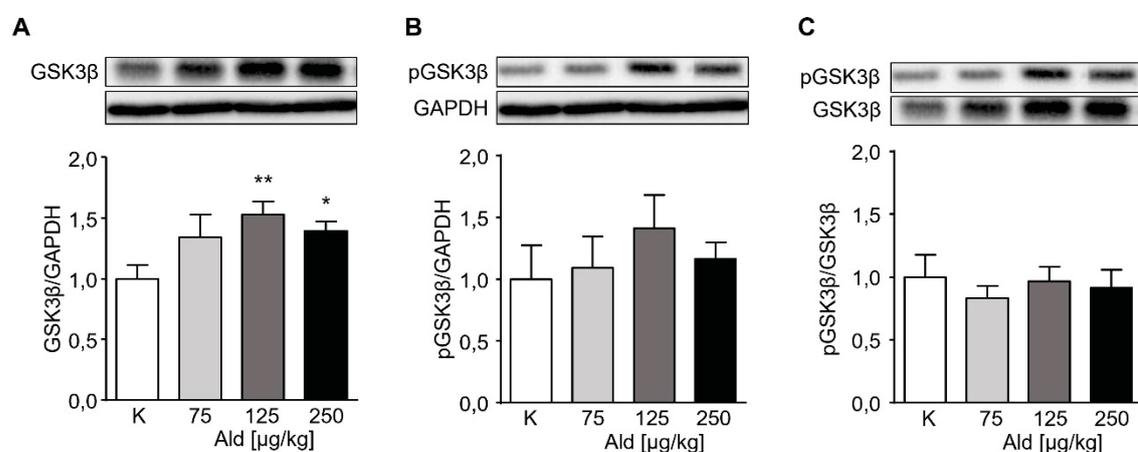
**Abbildung 4.24: Western Blot zum Nachweis der MafK-Expression auf Proteinebene.** Protein-Expression von MafK. Gezeigt sind repräsentative Banden der 4 Gruppen. Die Proben wurden jeweils auf das Referenzprotein GAPDH und anschließend auf die Kontrolltiere normiert. Die Quantifizierung erfolgte mit dem Programm ImageLab. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte + Standardfehler. n = 5. Ald: Aldosteron, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, K: Kontrolle, MafK: *Musculoaponeurotic fibrosarcoma K*.

Das Transkriptionsregulator-Protein Bach1 bildet ebenfalls im Kern Heterodimere mit *small* Maf-Proteinen und bindet anschließend als Repressor an ARE. Dies führt zu einer Repression ARE-exprimierter und somit auch Nrf2-regulierter Gene. Des Weiteren konkurriert Bach1 mit Nrf2 um die Bindungsstelle am ARE. Aufgrund dessen wurde die Akkumulation von Bach1 im Kern in den Nieren der Ald-infundierten Mäuse näher untersucht. Sowohl in der hergestellten Kernfraktion als auch Cytosolfraktion konnten mit Hilfe des Western Blots keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontroll- und mit Ald-behandelten Mäusen beobachtet werden. In der Kernfraktion der mit 75 µg/kg und 125 µg/kg und in der Cytosolfraktion der mit 75 µg/kg behandelten Mäuse konnte eine tendenziell geringere Anwesenheit von Bach1 im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden (Abbildung 4.25).



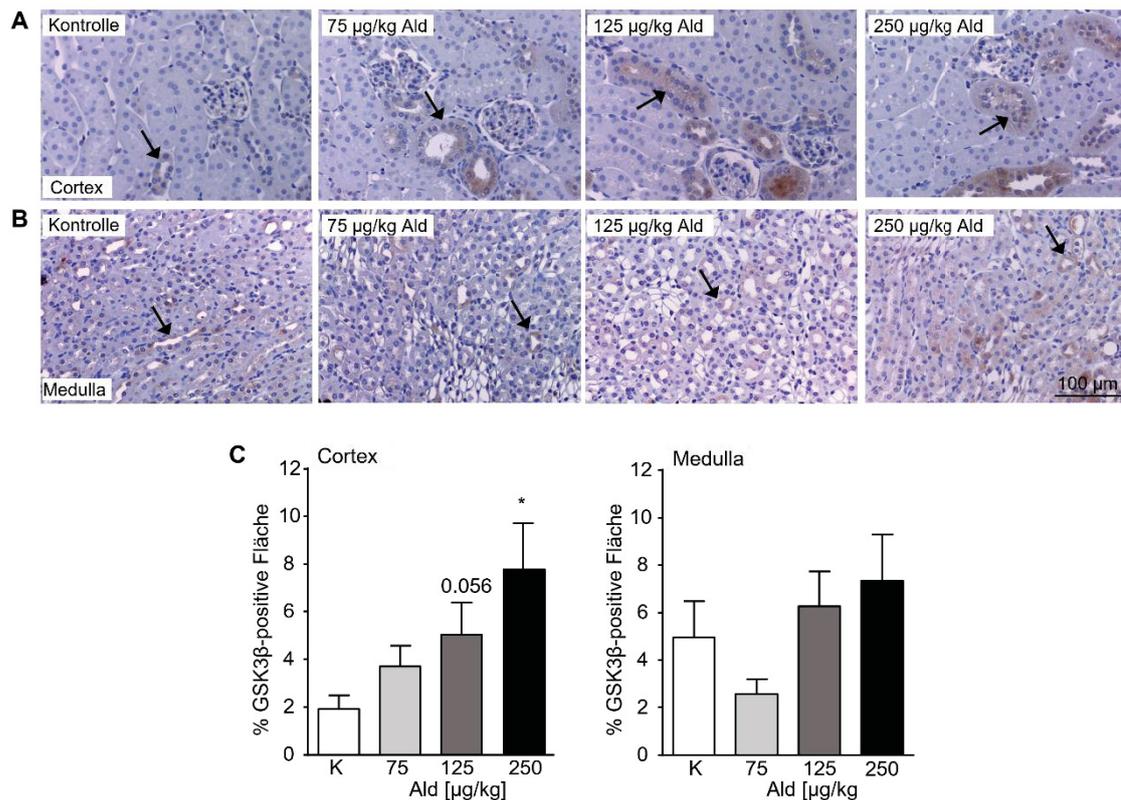
**Abbildung 4.25: Western Blots zum Nachweis von Bach1 in der Kern- und Cytosolfraktion aus Nierenhomogenaten von Aldosteron-infundierten Mäusen und Kontroll-Mäusen.** Für eine genauere Untersuchung der Anwesenheit von Bach1 wurden Kern- und Cytosolfractionen aus Nierenhomogenaten gewonnen. Gezeigt sind repräsentative Banden der 4 Gruppen aus der Cytosol- und Kernfraktionen mit den entsprechenden Referenzproteinen Lamin B2 und GAPDH. Die Proben wurden jeweils auf das Referenzprotein GAPDH oder Lamin B2 und anschließend auf die Kontroll-Tiere normiert. Die Quantifizierung erfolgte mit ImageLab. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte + Standardfehler. n = 5. Ald: Aldosteron, Bach1: *BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 1*, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, K: Kontrolle.

Ein weiterer wichtiger Faktor in der Keap1 unabhängigen Regulation ist die Kinase GSK3 $\beta$ . GSK3 $\beta$  beeinflusst die Aktivität von Nrf2, sowohl im Cytosol als auch im Kern negativ. Des Weiteren kann GSK3 $\beta$  über die Phosphorylierung an Serin 9 (pGSK3 $\beta$ ) inaktiviert werden. Der Nachweis von GSK3 $\beta$  mittels Western Blot zeigte eine signifikant höhere GSK3 $\beta$ -Expression in Mäusen, welche die mittlere und hohe Ald-Dosis erhalten haben. Für die niedrige Ald-Dosis war eine höhere Tendenz zu beobachten (Abbildung 4.26 A). Für pGSK3 $\beta$  konnte kein signifikanter, sondern nur ein tendenzieller Anstieg im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen nachgewiesen werden (Abbildung 4.26 B). Das Verhältnis von pGSK3 $\beta$  zu GSK3 $\beta$  änderte sich jedoch nicht nach einer 28-tägigen Ald-Infusion (Abbildung 4.26 C).



**Abbildung 4.26: Western Blots zum Nachweis von GSK3 $\beta$  und seiner phosphorylierten Form pGSK3 $\beta$  in der Niere von Aldosteron-infundierten Mäusen und Kontroll-Mäusen.** Protein-Expression von GSK3 $\beta$  und pGSK3 $\beta$ . Gezeigt sind repräsentative Banden der 4 Gruppen und die Quantifizierung der Expression von GSK3 $\beta$  (A) und pGSK3 $\beta$  (B), sowie das Verhältnis der an Serin 9 phosphorylierten Form zur nicht-modifizierten Form (C). Die Proben wurden jeweils auf das Referenzprotein GAPDH und anschließend auf die Kontroll-Tiere normiert. Die Quantifizierung erfolgte mit ImageLab. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte + Standardfehler. n = 5. Ald: Aldosteron, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, GSK3 $\beta$ : Glykogensynthase-Kinase  $\beta$ , K: Kontrolle. \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle.

Die Durchführung eines immunhistochemischen Nachweises auf Nierengewebe zeigte eine dosisabhängige Steigerung der GSK3 $\beta$ -positiven Fläche im Cortex nach einer 28-tägigen Ald-Infusion (Abbildung 4.27 A). Im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen nahm die GSK3 $\beta$ -positive Fläche im Cortex der mit 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$  infundierten Mäuse signifikant zu (Abbildung 4.27 C). In der Medulla der Mäuse, welche die mittlere und höhere Ald-Dosis erhielten, war die GSK3 $\beta$ -positive Fläche ebenfalls tendenziell erhöht. 75  $\mu\text{g}/\text{kg}$  infundierte Mäuse wiesen eine tendenziell geringere GSK3 $\beta$ -positive Fläche auf (Abbildung 4.27 B+C). Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass im Cortex hauptsächlich Tubuli über DAB angefärbt wurden, die ein Lumen besaßen, welche für distale Tubuluszellen oder Sammelrohrzellen spricht.



**Abbildung 4.27: Nachweis von GSK3β auf dem Nierengewebe von Aldosteron-infundierten Mäusen und Kontroll-Mäusen.** Paraffinschnitte des Nierengewebes wurden mit einem Antikörper gegen GSK3β immunhistochemisch angefärbt. **A:** Repräsentative Bilder im Nierencortex von Kontroll- und Aldosteron-infundierten Mäusen. GSK3β-positive Flächen sind mit schwarzen Pfeilen markiert. **B:** Repräsentative Bilder in der Nierenmedulla von Kontroll- und Aldosteron-infundierten Mäusen. **C:** GSK3β-positive Fläche im Nierencortex und in der -medulla. Für die Quantifizierung wurden 10 Gesichtsfelder des Nierencortex und 5 Gesichtsfelder der Nierenmedulla pro Tier mit Hilfe von Image J ausgewertet. Die GSK3β-positive Fläche wurde auf die Gesamtgewebefläche des Bildes bezogen. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert + Standardfehler. n = 5. 200x Vergrößerung. Maßstab = 100 µm. Ald: Aldosteron, GSK3β: Glykogensynthase-Kinase 3β, K: Kontrolle. \*p≤0,05 vs. Kontrolle.

Zusammenfassend konnte in diesem Tierversuch gezeigt werden, dass Ald zu einer Veränderung des Blutdrucks führte. Ebenso konnte eine Induktion der Ald-regulierten Gene unabhängig von der infundierten Konzentration nachgewiesen werden. Die Aldosteron-Infusion führte ebenso zu moderaten Nierenschäden gemessen an den verschiedenen Nierenfunktionsparametern Albumin und NGAL sowie der Bestimmung der Schädigungsscores TSI, GSI und MSI. Durch die Behandlungen mit Ald kam es in den Nieren zu inflammatorischen Prozessen, die über eine erhöhte Infiltration von Immunzellen, Kollagendepositionen und eine erhöhte Expression von IL-6 nachgewiesen werden konnten. Auf systemischer Ebene konnte jedoch nicht eindeutig die Induktion inflammatorischer Prozesse über die Zytokine im Serum nachgewiesen werden. Systemischer oxidativer Stress konnte in den Mäusen, die mit 75 und 125 µg/kg Ald infundiert wurden, über den Nachweis von 15-Isoprostan F<sub>2t</sub> gezeigt werden. Auch der tendenzielle Anstieg von 8-OHdG im Urin weist auf systemischen oxidativen Stress hin.

Lokaler oxidativer Stress in der Niere konnte nicht nachgewiesen werden. In den Nieren der Ald-infundierten Mäuse konnte ein signifikanter Anstieg des DNA-Schadensmarkers  $\gamma$ H2AX im Nierencortex der mittleren und hohen Dosisgruppe nachgewiesen werden. Die Basenmodifikation 8-oxodG nahm hingegen nur tendenziell zu. Die Lokalisation des DNA-Schadens zeigte eine unterschiedliche Verteilung der Ald-induzierten DNA-Schäden mit dem größten Anstieg in Calbindin-positiven Zellen und somit im distalen Tubulus. Dieser Effekt war signifikant in allen 3 Dosisgruppen. Eine Untersuchung der Nrf2-Expression mittels Western Blot und auf dem Nierengewebe zeigte nur eine leichte Induktion der Expression nach einer Ald-Infusion. Der Anteil an pNrf2 im Kern nahm jedoch nach der Ald-Exposition zu. Dies konnte sowohl immunhistochemisch in allen drei Dosisgruppen im Cortex als auch in der Kernfraktion nachgewiesen werden. Die Lokalisation von pNrf2 im Nierencortex zeigte nicht nur eine unterschiedliche Verteilung innerhalb der verschiedenen Nierenzellen, sondern auch eine signifikante Steigerung der pNrf2-positiven Kerne nur in Calbindin-positiven Zellen, dort wo auch der höchste Anteil an  $\gamma$ H2AX-positiven Zellkernen nachgewiesen werden konnte. Die nachgewiesene Phosphorylierung von Nrf2 und dessen Translokation in den Kern führte jedoch, sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene, nicht zu einer Induktion der Expression der Zielgene und -proteine. Im Gegenteil, es konnten teilweise signifikant geringere Expressionen der Zielgene und -proteine nachgewiesen werden. Eine weitere Untersuchung der Keap1-unabhängigen Nrf2-Regulation zeigte für MafK und Bach1 keine signifikanten Ergebnisse. Jedoch konnte für die Kinase GSK3 $\beta$  sowohl eine höhere Protein-Expression als auch eine erhöhte positive Fläche im Nierengewebe nachgewiesen werden. Der Anteil an inaktiver GSK3 $\beta$  nahm dabei nur tendenziell zu.

Während bei den Untersuchungen zur den Nierenfunktionsparametern und Nierenmorphologie oft eine leichte Dosisabhängigkeit zu sehen war, war dieser bei den Ald-Zielgenen  *$\alpha$ ENac* und *Nox2* und der Induktion von systemischem oxidativem Stress nicht zu sehen. Bei der Untersuchung von pNrf2 auf dem Gewebe und der Nrf2-Zielgene und -proteine war dies ebenfalls zu beobachten. Jedoch führte erst eine Ald-Dosis von 125  $\mu$ g/kg zu einem Anstieg von pNrf2 in der Kern- und Cytosolfraktion und auch die Induktion der Expression von GSK3 $\beta$  war hier erst sichtbar. In der niedrigsten Ald-Dosis von 75  $\mu$ g/kg kam es gemessen an den Nierenfunktionsparametern, -morphologie und DNA-Schäden zur auch zu geringsten Nierenschädigung. Für den im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Protektionsversuchs wurde die Ald-Konzentration von 125  $\mu$ g/kg gewählt, da diese eine moderate Nierenschädigung hervorrief und die meisten Effekte bezogen auf den Nrf2-Signalweg zeigte.

## 4.2 Protektionsversuch zur Untersuchung der Relevanz der Nrf2-Aktivierung in der Protektion von Aldosteron-induzierten Nierenschäden

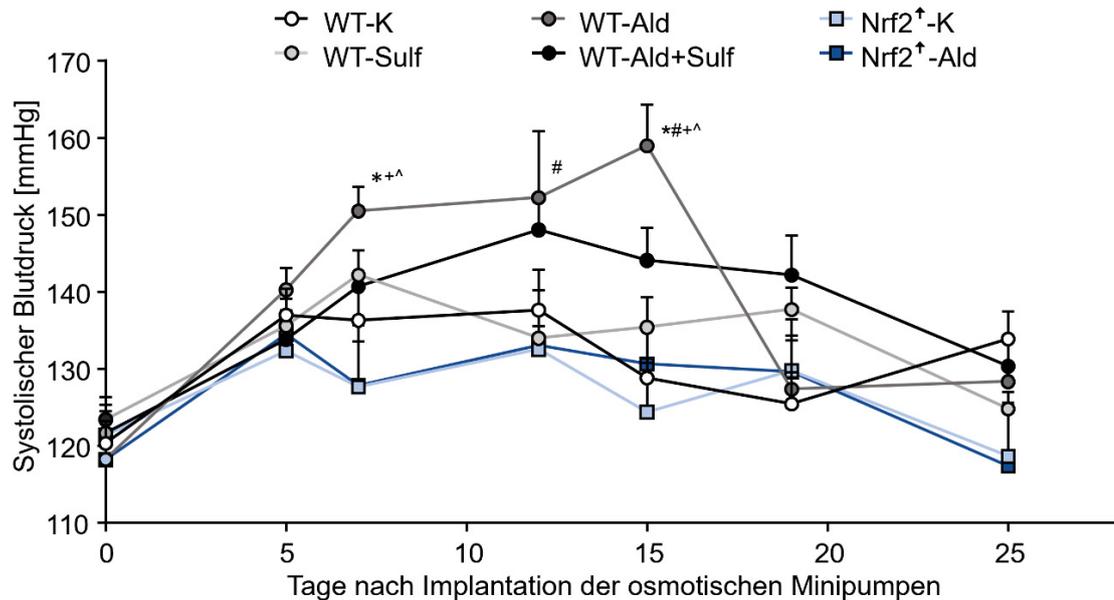
Aus vorangegangenen *in vitro*- und *in vivo*-Studien ist bekannt, dass eine Nrf2-Aktivierung vor Ald-induzierten Schäden in Ratten schützen kann [76]. Im zweiten Teil dieser Dissertation sollte analysiert werden, ob eine dauerhafte Aktivierung des Nrf2-Signalweges zu einer Protektion vor den Ald-induzierten Nierenschäden in der Maus führt. Um dies näher zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Ansätze verwendet. Zum einen wurden transgene Mäuse (Nrf2<sup>↑</sup>-Mäuse) mit Ald infundiert, bei denen das Inhibitorprotein von Nrf2, Keap1, basal in der Niere um 50% reduziert exprimiert wurde, was zu einer dauerhaften Aktivierung des Nrf2-Signalweges führte (siehe 3.1.2) [156]. Die vor Versuchsbeginn durchgeführte Genotypisierung der Nrf2<sup>↑</sup>-Mäuse zeigte, dass alle verwendeten transgenen Mäuse den gewünschten Genotyp Keap1<sup>fllox/fllox</sup>:Alb-Cre negativ aufwiesen. Ein repräsentatives Gelbild ist in Abbildung 3.5 im Abschnitt 3.2.9.4 zu finden. Zum anderen wurden Ald-infundierte Wildtyp-Mäuse (WT-Mäuse) mit dem sekundären Pflanzeninhaltsstoff Sulforaphan (Sulf) behandelt, welcher in der Literatur als indirektes Antioxidans und Nrf2-Aktivator beschrieben wird. Im Rahmen dieses Protektionsversuchs sollte demnach auch überprüft werden, ob die Sulf-Behandlung auch in den Mäusen zu einer Nrf2-Aktivierung führt. Die Ald-Infusion erfolgte erneut über einen Zeitraum von 28 Tagen. Der genaue Versuchsaufbau ist in 3.2.2 beschrieben. Um herauszufinden, ob die verschiedenen Genotypen basal oder die Ald-Behandlung zu Unterschieden führten, wurden die Kontroll-Gruppen der beiden Mausstämme (WT-K und Nrf2<sup>↑</sup>-K), sowie die Ald-infundierten Gruppen (WT-Ald und Nrf2<sup>↑</sup>-Ald) in jedem Experiment zusätzlich mittels des 2-Way-ANOVA analysiert.

Darüber hinaus wurden 8 unbehandelte, gleichaltrige, männliche Nrf2<sup>↑</sup>-Mäuse bei den Experimenten als weitere Kontrolle mitgeführt, um einen Effekt des salzigen Trinkwassers in den Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen auszuschließen. Die Ergebnisse dieser zusätzlichen Gruppe sind ebenfalls im Anhang (10.2) aufgeführt.

### 4.2.1 Einfluss von Nrf2 und Aldosteron auf den Blutdruck

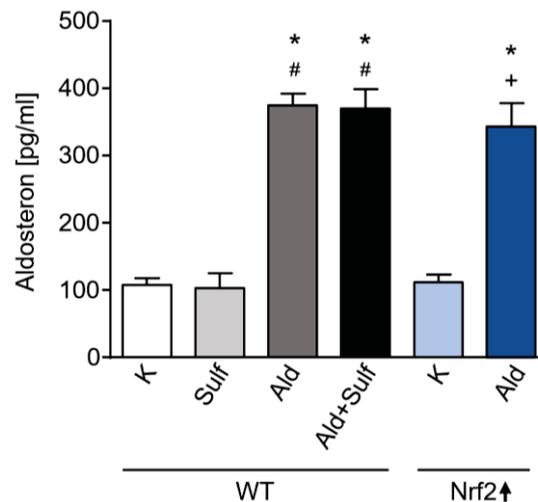
Im Protektionsversuch wurden die WT- und Nrf2<sup>↑</sup>-Mäuse mit 125 µg/kg Ald pro Tag infundiert. Weder die Nrf2<sup>↑</sup>-Kontrolle (Nrf2<sup>↑</sup>-K) noch die Gruppe der Ald-infundierten Nrf2<sup>↑</sup>-Mäuse zeigten zu einem Zeitpunkt einen erhöhten Blutdruck gegenüber der WT-Kontrolle (WT-K). Ebenso führte eine Behandlung mit Sulf im Trinkwasser nicht zu einer Veränderung des Blutdrucks. Eine Ald-Exposition der WT-Mäuse hingegen führte bereits sieben Tage nach Implantation der osmotischen Minipumpen zu einer signifikanten Erhöhung des systolischen Blutdrucks gegenüber der WT-K, Nrf2<sup>↑</sup>-K und Ald-infundierten Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen (Nrf2<sup>↑</sup>-Ald) und blieb bis zum 15ten Tag nach der Implantation bei circa 155 mmHg auf

einem hohen Niveau. Nach diesem Messzeitpunkt sank der Blutdruck jedoch bis zum Ende des Versuches auf das Niveau der WT-K-Gruppe. Bei den Ald-infundierten WT-Mäusen, die zusätzlich mit Sulf im Trinkwasser behandelt wurden, stieg der Blutdruck bis zum zwölften Tag nur langsam an und blieb bis zum vorletzten Messzeitpunkt (Tag 18-19) konstant. Der Blutdruck der mit Ald+Sulf behandelten Mäuse erreichte zu keinem Zeitpunkt eine Signifikanz gegenüber den anderen Behandlungsgruppen (Abbildung 4.28).



**Abbildung 4.28: Entwicklung des systolischen Blutdrucks [mmHg] in Aldosteron-infundierten Wildtyp- und Nrf2<sup>+/+</sup>-Mäusen über einen Zeitraum von 28 Tagen.** Der Blutdruck wurde an sieben verschiedenen Zeitpunkten nach Akklimatisierung an die Prozedur gemessen. Der erste Messzeitpunkt repräsentiert den initialen Blutdruck vor der Pumpenimplantation. Der Blutdruck wurde zweimal die Woche gemessen. Die Blutdruckwerte wurden nicht-invasiv ermittelt. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert + Standardfehler. n = 8. Ald: Aldosteron, K: Kontrolle, Nrf2: *Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2*, Sulf: Sulforaphan, WT: Wildtyp. \*p<0,05 vs. WT-K, #p<0,05 vs. WT-Sulf, +p<0,05 vs. Nrf2<sup>+/+</sup>-K, ^p<0,05 vs. Nrf2<sup>+/+</sup>-Ald.

Zur Überprüfung der Funktionalität der implantierten osmotischen Minipumpen wurde die Ald-Konzentration im Serum nach 28-tägiger Infusion mittels ELISA gemessen. Alle mit Ald behandelten Tiere wiesen einen signifikant höheren Ald-Gehalt im Serum im Vergleich zu ihrer entsprechenden Kontroll-Gruppe auf. Ebenso zeigten alle mit Ald infundierten Tiere vergleichbare Ald-Konzentrationen im Serum. Die mit dem Lösungsmittel infundierten Tiere wiesen eine 3,5-fach niedrigere Ald-Konzentration im Vergleich zu den Ald-infundierten Mäusen auf. Auch zwischen den mit Lösungsmittel exponierten Gruppen ist kein Unterschied im Ald-Gehalt im Serum zu erkennen (Abbildung 4.29)



**Abbildung 4.29: Aldosteron-Konzentration im Serum 28 Tage nach der Pumpenimplantation in Wildtyp- und Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen.** Gezeigt ist jeweils der Mittelwert + Standardfehler. n = 8. Ald: Aldosteron, K: Kontrolle, Nrf2: *Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2*, Sulf: Sulforaphan, WT: Wildtyp. \*p≤0,05 vs. WT-K, #p≤0,05 vs. WT-Sulf, +p≤0,05 vs. Nrf2<sup>↑</sup>-K.

#### 4.2.2 Einfluss der Nrf2-Aktivität und Aldosteron auf Gewichtsparameter

Ein Unterschied im Körpergewicht konnte zwischen den sechs verschiedenen Gruppen nicht nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den WT-Mäusen wiesen die Nrf2<sup>↑</sup>-Mäuse jedoch bereits basal ein höheres Nierengewicht auf. Sowohl die Ald-Infusion in den WT-Mäusen als auch in den Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen führte zu einem signifikanten Anstieg des relativen Nierengewichtes im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen und den Kontrollen des jeweiligen anderen Mausstamms. Die Ald-Behandlung in den Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen führte zu einem noch höheren Anstieg des Nierengewichtes, der sogar signifikant gegenüber den Ald-infundierten WT-Mäusen war. Eine zusätzliche Behandlung der Ald-exponierten WT-Mäuse mit Sulf führte ebenfalls zu einem Anstieg des Nierengewichtes verglichen mit der WT-Kontrolle und der Einzelbehandlung mit Ald. Das relative Herzgewicht der WT- und Nrf2<sup>↑</sup>-K-Mäuse unterschied sich basal nicht. Auch eine Sulf-Behandlung führte nicht zu einem Anstieg des relativen Herzgewichtes. Eine Ald-Infusion führte sowohl in WT als auch in Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen zu einem signifikanten Anstieg des relativen Herzgewichtes verglichen mit der WT-K. Verglichen mit der Nrf2<sup>↑</sup>-K ließ sich nur ein tendenzieller Anstieg nachweisen (Tabelle 4.4).

**Tabelle 4.4: Übersicht der Gewichtsparameter von Wildtyp- und Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen nach 28-tägiger Behandlung.** Gezeigt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. n = 8 Ald: Aldosteron, K: Kontrolle, Nrf2: Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2, Sulf: Sulforaphan, WT: Wildtyp. \*p $\leq$ 0,05 vs. WT-K, #p $\leq$ 0,05 vs. WT-Sulf, °p $\leq$ 0,05 vs. WT-Ald, +p $\leq$ 0,05 vs. Nrf2<sup>+</sup>-K.

Parameter	WT-K	WT-Sulf	WT-Ald	WT-Ald+Sulf	Nrf2 <sup>+</sup> -K	Nrf2 <sup>+</sup> -Ald
Körpergewicht [g]	29,8 $\pm$ 0,5	29,4 $\pm$ 0,5	28,3 $\pm$ 0,5	29,6 $\pm$ 0,9	28,0 $\pm$ 0,5	27,5 $\pm$ 0,5
Relatives Nierengewicht [‰]	5,8 $\pm$ 0,1	5,9 $\pm$ 0,1	8,4 $\pm$ 0,1* # +	8,5 $\pm$ 0,2* #	7,6 $\pm$ 0,2*	10,3 $\pm$ 0,2*°+
Relatives Herzgewicht [‰]	4,9 $\pm$ 0,1	4,8 $\pm$ 0,1	5,4 $\pm$ 0,2* #	5,3 $\pm$ 0,1	5,1 $\pm$ 0,2	5,4 $\pm$ 0,2*

#### 4.2.3 Einfluss von Nrf2-Aktivität und Aldosteron auf Nierenfunktionsparameter

Während der Organentnahme und Isolation der Nieren konnte in den Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen Hydronephrose beobachtet werden. Dabei waren in der Nrf2<sup>+</sup>-K-Gruppe 2 von 8 Mäusen und in der mit Ald-infundierten Nrf2<sup>+</sup>-Gruppe 4 von 8 Mäusen von einer Hydronephrose betroffen.

Um zu untersuchen, ob eine Nrf2-Aktivierung vor den Schäden der Ald-Infusion schützt, wurde die Nierenfunktion näher untersucht. Dafür wurden die Mäuse am Ende der 28-tägigen Behandlung für 20 h in Stoffwechselkäfigen gehalten und die Urin- und Trinkmenge bestimmt. Anschließend wurden für die Evaluierung der Nierenfunktion die Kreatinin-Konzentrationen im Serum sowie die Kreatinin-, Albumin-, NGAL- und KIM-1-Konzentrationen im Urin bestimmt.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 4.5 aufgeführt. Eine Ald-Behandlung führte in allen Gruppen zu einem signifikanten Anstieg der Trink- und Urinmenge verglichen mit den zugehörigen Kontrollen. Ebenso war die Erhöhung der Trinkmenge signifikant gegenüber der Kontrolle des jeweils anderen Mausstammes (WT-K vs. Nrf2<sup>+</sup>-Ald und Nrf2<sup>+</sup>-K vs. WT-Ald). Eine Infusion mit Ald in den WT-Mäusen hatte keinen Einfluss auf die Kreatinin-Clearance. Jedoch führte die Behandlung mit Sulf zu einer signifikant geringeren Kreatinin-Clearance verglichen mit der WT-K und der Kombinationsbehandlung (WT-Ald+Sulf). Ebenso war die Kreatinin-Clearance in den Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen basal tendenziell geringer. Eine Ald-Infusion hatte bei den Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen keinen Einfluss auf die Clearance. Als Marker für den glomerulären Schaden wurde auch in diesem Versuch Albumin verwendet. Als Marker für tubuläre Schäden wurden NGAL und KIM-1 im Urin bestimmt. Um die Verdünnung des Urins herauszurechnen, wurden die nachgewiesenen Mengen auf das im Urin enthaltene Kreatinin bezogen. In den WT-Mäusen führten eine Ald-Infusion und die Kombination mit Sulf zu einem erhöhten Albumin-Kreatinin-Verhältnis im Urin, verglichen mit der WT-K und den mit Sulf behandelten Mäusen. Das Albumin-Kreatinin-Verhältnis im Urin der Kombinationsbehandlung war im Vergleich zu nur mit Ald-infundierten WT-Mäusen tendenziell geringer. Basal war in den Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen kein

erhöhtes Albumin-Kreatinin-Verhältnis vorzufinden. Eine Ald-Infusion führte jedoch zu einem signifikanten Anstieg des Verhältnisses in Relation zur WT- und Nrf2<sup>+</sup>-Kontrolle, welches sogar das der Ald-infundierten WT-Mäuse um das 1,6-fache übertraf. Die Ald-Infusion führte in den WT-Mäusen zu einer Verzehnfachung des KIM-1-Kreatinin-Verhältnisses. Eine Behandlung mit Sulf hatte keinen Einfluss auf die KIM-1-Ausscheidung, während diese in der Kombinationsbehandlung ebenfalls immens anstieg. In den Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen konnte basal ein nicht-signifikant geringeres KIM-1-Kreatinin-Verhältnis im Vergleich zur WT-K nachgewiesen werden. Nach einer Ald-Behandlung sank das Verhältnis in den Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen noch weiter. Eine Ald-Infusion führte wie erwartet in den WT-Mäusen zu einer signifikanten Erhöhung des NGAL-Kreatinin-Verhältnisses verglichen mit der WT-K und den mit Sulf behandelten WT-Mäusen. In der Kombinationsbehandlung kam es ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg. Basal konnte für das NGAL-Kreatinin-Verhältnis kein Unterscheid zwischen den beiden Mausstämmen nachgewiesen werden, jedoch führte eine Ald-Infusion in den Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen nur zu einem signifikanten Anstieg an NGAL verglichen mit der WT-K, aber nicht mit der Nrf2<sup>+</sup>-K.

**Tabelle 4.5: Übersicht der Nierenfunktionsparameter von Aldosteron-infundierten Wildtyp- und Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen nach 28-tägiger Behandlung.** Gezeigt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. n = 7 für die Nrf2<sup>+</sup>-K-Gruppe für die Bestimmung der Parameter Albumin, KIM-1 und NGAL, n = 8 für alle anderen Parameter und Gruppen. Ald: Aldosteron, KIM-1: *Kidney Injury Molecule-1*, K: Kontrolle, NGAL: Neutrophile Gelatinase-assoziiertes Lipocalin, Nrf2: *Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2*, Sulf: Sulforaphan, WT: Wildtyp. \*p $\leq$ 0,05 vs. WT-K, #p $\leq$ 0,05 vs. WT-Sulf, †p $\leq$ 0,05 vs. Nrf2<sup>+</sup>-K, ^p $\leq$ 0,05 vs. Nrf2<sup>+</sup>-Ald.

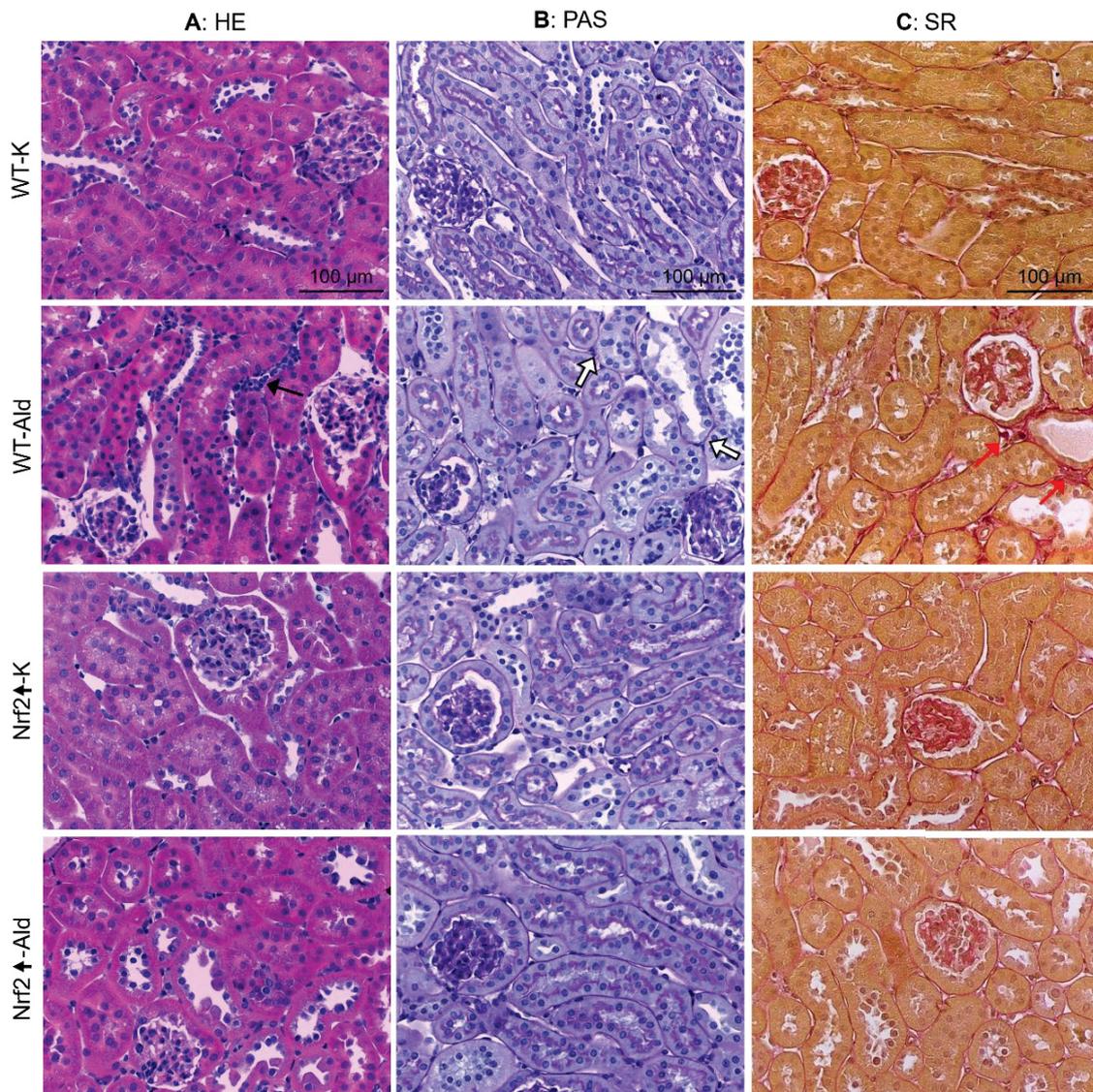
Parameter	WT-K	WT-Sulf	WT-Ald	WT-Ald+Sulf	Nrf2 <sup>+</sup> -K	Nrf2 <sup>+</sup> -Ald
Hydronephrose	0/8	0/8	0/8	0/8	2/8	4/8
Trinkmenge [ml/20h]	6,8 $\pm$ 1,3	5,7 $\pm$ 0,4	24,2 $\pm$ 2,4 <sup>*#†</sup>	20,7 $\pm$ 1,0 <sup>*#</sup>	7,1 $\pm$ 0,8	31,0 $\pm$ 4,9 <sup>**</sup>
Urinmenge [ml/20h]	3,0 $\pm$ 0,6	1,9 $\pm$ 0,3	18,6 $\pm$ 2,6 <sup>*#†</sup>	15,6 $\pm$ 1,5 <sup>*#</sup>	2,6 $\pm$ 0,7	19,8 $\pm$ 5,4 <sup>**</sup>
Kreatinin-Clearance [ml/h]	5,8 $\pm$ 0,5	2,9 $\pm$ 0,5 <sup>*</sup>	5,4 $\pm$ 1,0	5,6 $\pm$ 0,5 <sup>#</sup>	3,4 $\pm$ 0,9	3,5 $\pm$ 0,8
Albumin/Kreatinin [ $\mu$ g/mg]	36 $\pm$ 4	43 $\pm$ 9	198 $\pm$ 41 <sup>*#</sup>	158 $\pm$ 25 <sup>*#</sup>	42 $\pm$ 8	325 $\pm$ 100 <sup>**</sup>
KIM-1/Kreatinin [pg/mg]	409 $\pm$ 102	343 $\pm$ 72	4203 $\pm$ 585 <sup>*#†^</sup>	4055 $\pm$ 643 <sup>*#</sup>	129 $\pm$ 39	76 $\pm$ 37
NGAL/Kreatinin [ $\mu$ g/mg]	40 $\pm$ 3	69 $\pm$ 15	272 $\pm$ 32 <sup>*#†^</sup>	257 $\pm$ 27 <sup>*#</sup>	51 $\pm$ 13	126 $\pm$ 32 <sup>*</sup>

#### 4.2.4 Einfluss der Nrf2-Aktivität und Aldosteron auf die Nierenmorphologie

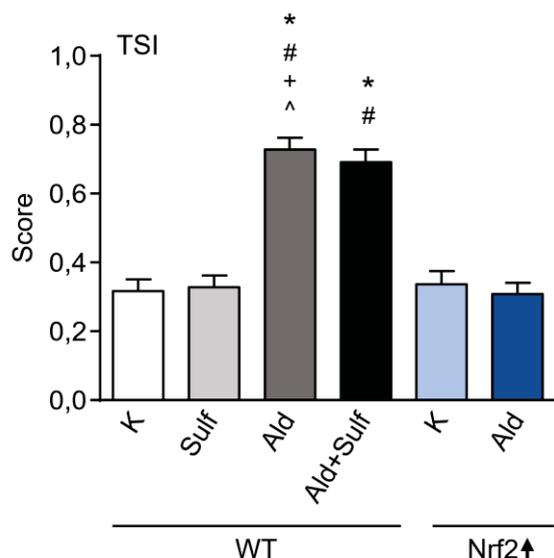
Um zu untersuchen, ob eine pharmakologische oder genetische Nrf2-Aktivierung vor den Ald-induzierten morphologischen Veränderungen in der Nierenrinde schützen kann, wurden verschiedene Schädigungsscores bestimmt. Schäden im Tubulussystem und im Interstitium der Rinde wurden mit Hilfe des TSI bewertet. Dabei wurden interstitielle Entzündungen, Fibrose und tubuläre Atrophie bewertet (siehe 3.2.3.4). Mit Hilfe des GSI und MSI wurden die Glomeruli in Bezug auf die Proliferation und Verdickung der Mesangiumzellen, als auch die Erweiterung der Kapillaren analysiert (siehe 3.2.3.5).

##### 4.2.4.1 TSI

Repräsentative Bilder der drei für die Auswertung benötigten Färbungen (HE-Färbung, PAS-Färbung und SR-Färbung) sind für vier verschiedene Behandlungsgruppen in Abbildung 4.30 dargestellt. Im Anhang sind repräsentative Bilder der übrigen Gruppen zu finden (Abbildung 10.5). Die Auswertung der drei verschiedenen Färbungen und die Kalkulation des TSI ergab für die Mäuse der WT-K und die mit Sulf behandelten WT-Mäuse einen Score von 0,3. Eine Ald-Infusion über 28 Tage führte in den WT-Mäusen und in der Kombinationsbehandlung (Ald+Sulf) zu einer signifikanten Erhöhung des Scores. In der Nrf2<sup>↑</sup>-K wurde basal ebenfalls ein Score von 0,3 kalkuliert. Eine Infusion der Nrf2<sup>↑</sup>-Mäuse mit Ald führte nicht zu einem höheren TSI. Der Anstieg des Scores in den WT-Ald-Mäusen war auch signifikant gegenüber den Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen (Nrf2<sup>↑</sup>-K und Nrf2<sup>↑</sup>-Ald) (Abbildung 4.31).



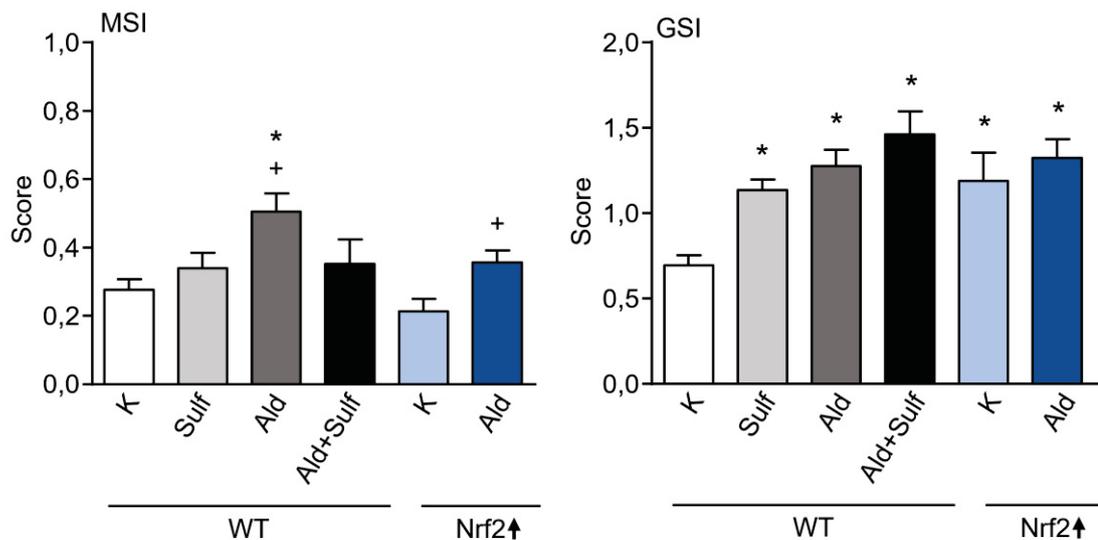
**Abbildung 4.30: Histopathologische Veränderungen im Nierencortex der Aldosteron-infundierten Wildtyp- und  $Nrf2^{-/-}$ -Mäuse.** **A:** Repräsentative Bilder der HE-gefärbten Nieren für die Visualisierung inflammatorischer Regionen. Die schwarzen Pfeile zeigen in das Gewebe migrierte Leukozyten als Marker für eine beginnende Inflammation. **B:** Repräsentative Bilder der PAS-gefärbten Nieren zur Visualisierung der Basalmembran-Atrophie. Weiße Pfeile: Beispiele für eine Atrophie der Basalmembranen. **C:** Repräsentative Bilder der SR-gefärbten Nieren zur Visualisierung von Kollagenablagerungen. Rote Pfeile: Kollagenablagerungen. 200x Vergrößerung. Ald: Aldosteron, HE: Hämatoxylin-Eosin, PAS: Perjodsäure-Schiff, Nrf2: *Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2*, SR: Sirius-Rot, WT: Wildtyp. Maßstab = 100 μm.



**Abbildung 4.31: Semiquantitative Auswertung des TSI auf dem Nierencortex der Aldosteron-infundierten Wildtyp und Nrf2<sup>Δ</sup>-Mäuse.** Die Auswertung erfolgte mit den entsprechenden Färbungen und den verschiedenen Schädigungsscores (3.2.3.4). Gezeigt ist jeweils der Mittelwert + Standardfehler, n = 8. Ald: Aldosteron, K: Kontrolle, Nrf2: *Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2*, Sulf: Sulforaphan, TSI: Tubulointerstieller Schädigungsindex. WT: Wildtyp. \*p≤0,05 vs. WT-K, #p≤0,05 vs. WT-Sulf, +p≤0,05 vs. Nrf2<sup>Δ</sup>-K, ^p≤0,05 vs. Nrf2<sup>Δ</sup>-Ald.

#### 4.2.4.2 GSI/MSI

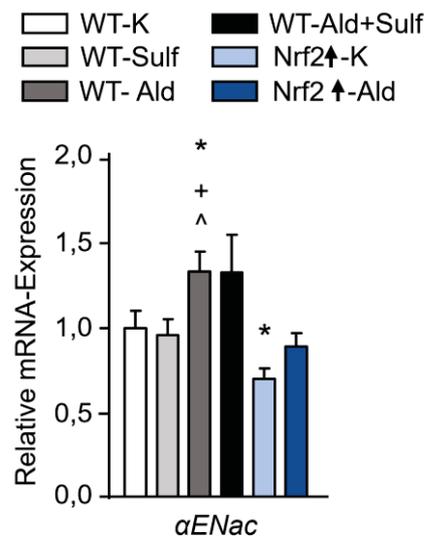
Die Ald-Infusion führte wie erwartet in den WT-Mäusen zu morphologischen Veränderungen der Glomeruli. Sowohl der GSI als auch der MSI waren gegenüber der WT-K signifikant erhöht. Dabei konnte bei beiden Schädigungsscores jeweils eine Verdopplung beobachtet werden. Der MSI war in den mit Sulf behandelten WT-Mäusen und in der Kombinationsbehandlung nicht erhöht. Der GSI hingegen war in diesen beiden Gruppen signifikant erhöht gegenüber der WT-K. In der Nrf2<sup>Δ</sup>-K wurde bezüglich des MSI kein basaler Unterschied im Vergleich mit den WT-Mäusen festgestellt. Eine Ald-Infusion führte zwar zu einem signifikanten Anstieg des MSI, jedoch nicht im gleichen Umfang wie bei den WT-Mäusen. Der GSI war allerdings in der Nrf2<sup>Δ</sup>-K bereits signifikant gegenüber der WT-K erhöht. Eine Ald-Infusion führte nicht zu einer Veränderung des GSI in diesem Mausstamm (Abbildung 4.32).



**Abbildung 4.32: Semiquantitative Auswertung des MSI und GSI auf dem Nierencortex der Aldosteron-infundierten Wildtyp- und Nrf2<sup>+</sup>-Mäuse.** Die Auswertung erfolgte mithilfe der PAS-Färbung und der verschiedenen Schädigungsscores (3.2.3.5). Gezeigt ist jeweils der Mittelwert + Standardfehler, n = 8. Ald: Aldosteron, GSI: Glomeruloskleroseindex, K: Kontrolle, MSI: Mesangiolyseindex, Nrf2: *Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2*, PAS: Perjodsäure-Schiff, Sulf: Sulforaphan, WT: Wildtyp. \*p<0,05 vs. WT-K, \*p<0,05 vs. Nrf2<sup>+</sup>-K.

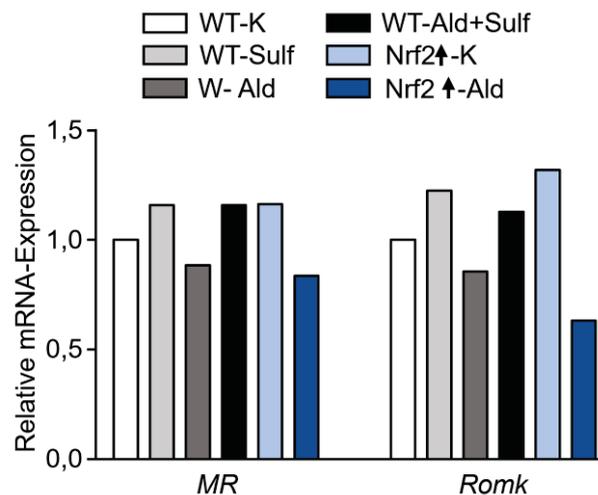
#### 4.2.5 Untersuchung von klassisch Ald-regulierten Genen und Proteinen

Um zu analysieren, ob die verschiedenen Ansätze der Nrf2-Aktivierung einen Einfluss auf die klassisch Ald-regulierten Gene haben, wurde die mRNA-Expression der  $\alpha$ ENaC untersucht. Eine Ald-Behandlung über 28 Tage führte in den WT-Mäusen zu einem signifikanten Anstieg der mRNA-Expression der  $\alpha$ -Untereinheit von *ENaC*. Die Behandlung der Mäuse mit Sulf hatte keinen Einfluss auf die Expression. Ebenso war die mRNA-Expression in der Kombinationsbehandlung tendenziell im gleichen Maß erhöht, wie in den Ald-exponierten WT-Mäuse. Mäuse der Nrf2<sup>+</sup>-K-Gruppe zeigten eine signifikant geringere Expression im Vergleich zu den WT-K-Mäusen. Diese Erniedrigung war auch tendenziell in den Ald-infundierten Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen zu sehen. Die mRNA-Expression von *ENaC* in den Ald-infundierten WT-Mäusen war verglichen mit den beiden Gruppen der Nrf2<sup>+</sup>-Maus (Nrf2<sup>+</sup>-K und Nrf2<sup>+</sup>-Ald) signifikant erhöht (Abbildung 4.33).



**Abbildung 4.33: Expression von ENaC in der Niere von in Aldosteron-infundierten Wildtyp- und Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen.** Die mRNA-Expression von  $\alpha$ ENaC in den Nieren von Mäusen wurde mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Die RNA wurde aus den Nieren der behandelten wildtypischen und transgenen Mäuse isoliert. Die mRNA-Expression wurde auf *Gapdh* und  *$\beta$ -actin* als Referenz-Gene bezogen. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte + Standardfehler. n = 8.  $\alpha$ ENaC:  $\alpha$ -Untereinheit des epithelialen Natriumkanals, Ald: Aldosteron, GAPDH: Glycerinaldehyd 3-Phosphat-Dehydrogenase, K: Kontrolle, Nrf2: *Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2*, Sulf: Sulforaphan, WT: Wildtyp. \* $p \leq 0,05$  vs. Nrf2<sup>↑</sup>-K, ^ $p \leq 0,05$  vs. Nrf2<sup>↑</sup>-Ald.

Um zu untersuchen, ob die reduzierte mRNA-Expression von  $\alpha$ ENaC in den Ald-infundierten Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen über eine geringere MR-Expression erklärt werden kann, wurde zusätzlich eine quantitative RT-PCR des MR mit gepoolten cDNA-Proben durchgeführt. Außerdem wurde die Expression eines weiteren klassisch Ald-induzierten Gens, *Romk*, mitgeführt. Für den MR war kein starker Effekt in der mRNA-Expression sichtbar. Im Vergleich zur WT-K war jedoch tendenziell ein leichter Anstieg in den mit Sulf und mit Ald+Sulf behandelten WT-Mäusen zu sehen. Dieser Trend war auch zu sehen, wenn die Expressionen der Kontroll-Mäuse der verschiedenen Mausstämme verglichen wurden. Nach einer Ald-Infusion sank in beiden Mausstämmen die MR-Expression leicht. Dies ging auch mit einer gesunkenen Expression von *Romk* einher. Ebenso stieg die *Romk*-Expression nach einer Sulf-Behandlung in der Kombinationsbehandlung in den WT-Mäusen an. Basal war in der Nrf2<sup>↑</sup>-K ebenfalls eine höhere *Romk*-Expression als in der WT-K zu beobachten (Abbildung 4.34).

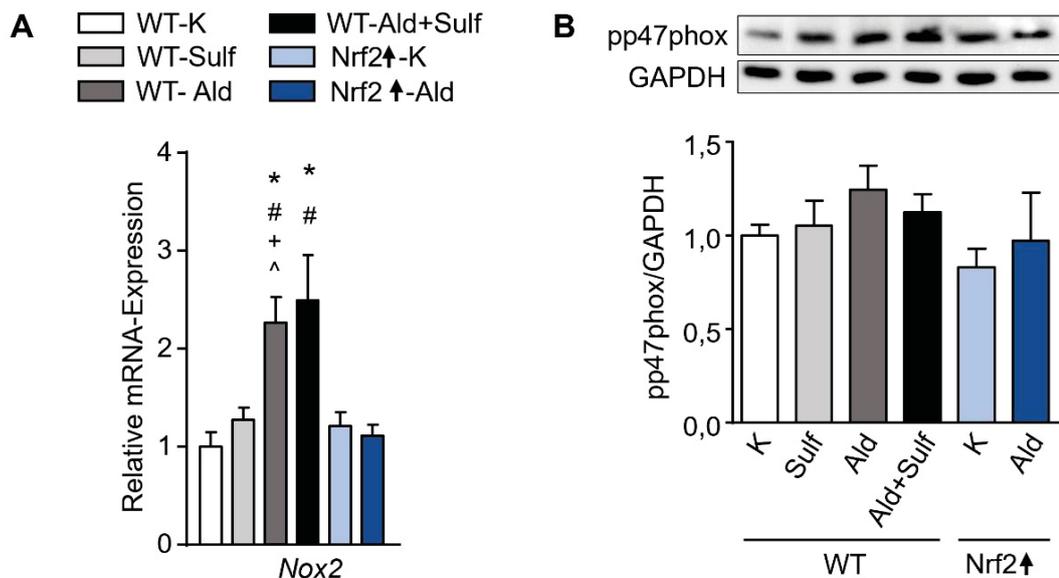


**Abbildung 4.34: Expression von MR und Romk in der Niere von in Aldosteron-infundierten Wildtyp- und Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen.** Die mRNA-Expression von *MR* und *Romk* in den Nieren von Mäusen wurde mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Die RNA wurde aus den Nieren der behandelten wildtypischen und transgenen Mäuse isoliert und die RNA der jeweiligen Gruppen vor der cDNA-Synthese gepoolt. Die mRNA-Werte wurden auf *Gapdh* und *β-actin* als Referenz-Gene bezogen. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte + Standardfehler. n = 8. Ald: Aldosteron, GAPDH: Glycerinaldehyd 3-Phosphat-Dehydrogenase, K: Kontrolle, MR: Mineralkortikoidrezeptor, Nrf2: *Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2*, Sulf: Sulforaphan, Romk: *Renal outer medullary K<sup>+</sup> channel*.

#### 4.2.6 Einfluss von Nrf2-Aktivierung und Aldosteron auf die Produktion von oxidativem Stress

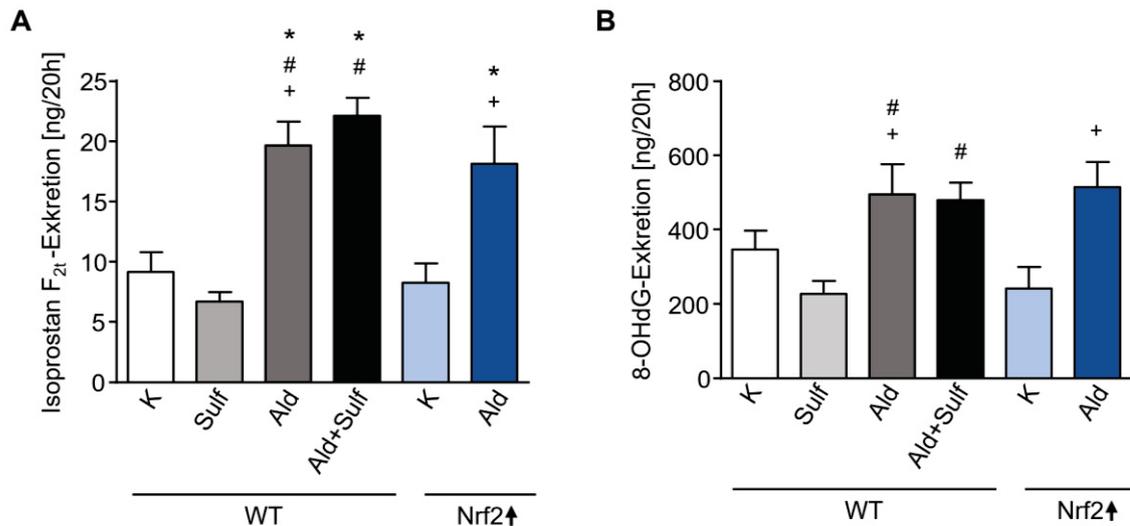
Wie bereits im Dosisversuch gezeigt, führte eine Ald-Infusion zu einer erhöhten Expression von *Nox2* und systemischem oxidativen Stress (siehe 4.1.7). Daher wurde auch in diesem Protektionsversuch die NOX2 über die mRNA-Expression ihrer Untereinheit Nox2 und Aktivierung über die Untereinheit p47phox näher analysiert.

Die Behandlung der WT-Tiere mit Ald führte zu einer signifikanten Erhöhung der *Nox2*-mRNA-Expression unabhängig von der Sulf-Behandlung. Eine Sulf-Behandlung führte nicht zu einer Veränderung der *Nox2*-Expression. In den Kontroll- und Ald-Gruppe der Nrf2<sup>↑</sup>-Mäuse konnte verglichen mit der WT-K kein Effekt auf die *Nox2*-Expression nachgewiesen werden. Jedoch war die *Nox2*-Expression in den wildtypischen Ald-infundierten Tieren (WT-Ald und WT-Ald+Sulf) signifikant erhöht gegenüber den Ald-exponierten Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen (Abbildung 4.35 A). Die Phosphorylierung der NOX2-Untereinheit p47phox war in den WT-Mäusen nach einer Ald-Behandlung nur tendenziell erhöht. Bei den anderen Gruppen konnte kein Unterschied zur WT-K festgestellt werden (Abbildung 4.35 B).



**Abbildung 4.35: Expression und Aktivierung von NOX2 in der Niere von Aldosteron-infundierten Wildtyp- und Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen.** **A:** Die mRNA-Expression von *Nox2*, der Hauptuntereinheit von NOX2, in den Nieren von Mäusen wurde mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Die RNA wurde aus den Nieren der behandelten wildtypischen und transgenen Mäuse isoliert. Die mRNA-Werte wurden auf *Gapdh* und  $\beta$ -*actin* als Referenz-Gene bezogen. **B:** Relative Protein-Expression der phosphorylierten cytosolischen und somit aktiven Untereinheit der NOX2, p47phox. Gezeigt sind repräsentative Protein-Banden der verschiedenen Gruppen. Die Proben wurden jeweils auf das Referenzprotein GAPDH und anschließend auf die wildtypischen Kontroll-Tiere normiert. Die Quantifizierung erfolgte mit dem Programm ImageLab. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte + Standardfehler. n = 8. Ald: Aldosteron, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase. K: Kontrolle, Nox2: NADPH-Oxidase 2, Nrf2: Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2, Sulf: Sulforaphan, WT: Wildtyp. \*p $\leq$ 0,05 vs. WT-K, #p $\leq$ 0,05 vs. WT-Sulf, +p $\leq$ 0,05 vs. Nrf2<sup>+</sup>-K, ^p $\leq$ 0,05 vs. Nrf2<sup>+</sup>-Ald.

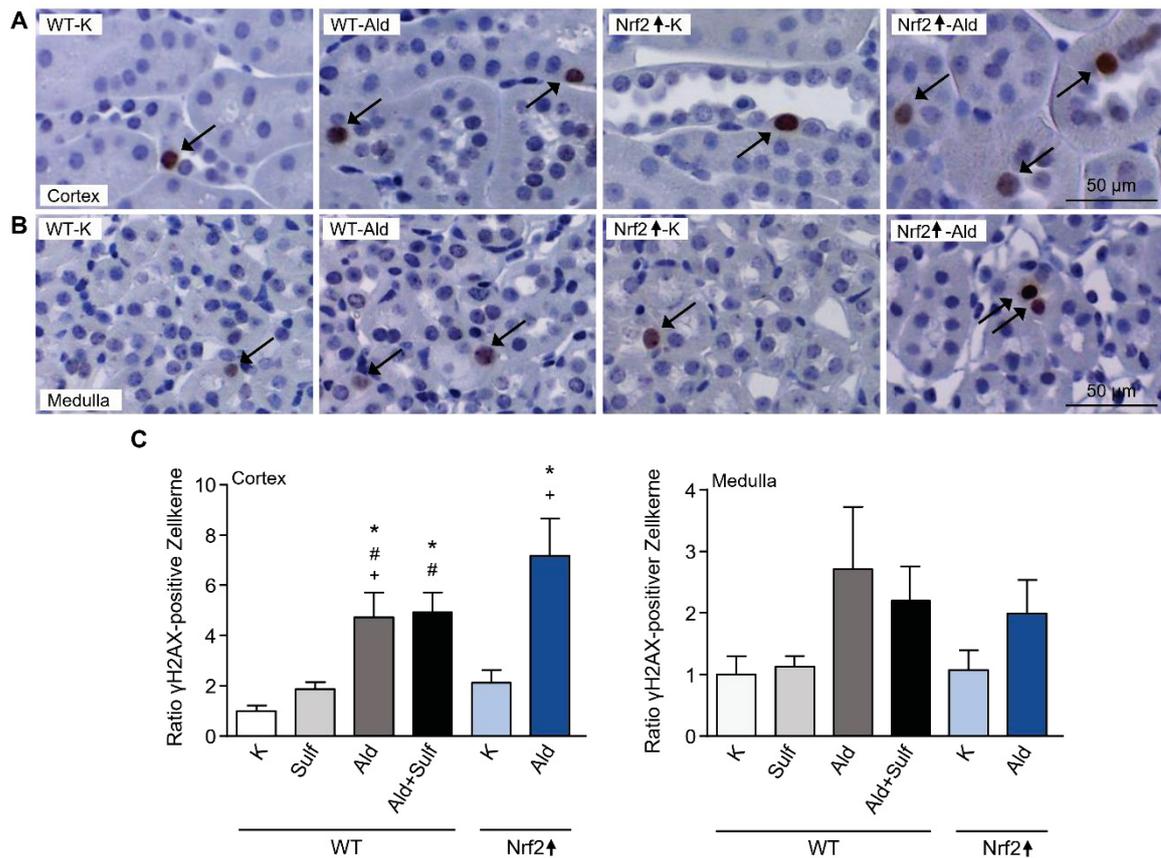
Ob die Sulf-Behandlung oder die geringere Keap1-Expression und die daraus resultierende Aktivierung von Nrf2 vor dem Ald-induzierten oxidativen Stress oder Schäden schützen konnte, wurde im Folgenden untersucht. Hierfür wurde mittels ELISA die Exkretion von Isoprostan F<sub>2t</sub> und 8-OHdG im Sammelurin der Mäuse bestimmt. Isoprostan F<sub>2t</sub> diente als Marker für oxidativen Schaden an Lipiden und 8-OHdG als Marker für oxidative Schäden an Nukleinbasen. Ebenso wird Isoprostan F<sub>2t</sub> für die Bewertung von oxidativem Stress durch Lipidperoxidation verwendet [170]. Eine signifikant erhöhte Isoprostan F<sub>2t</sub>-Exkretion konnte in WT- und Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen, welche mit Ald-infundiert wurden, im Vergleich zu beiden Kontroll-Gruppen nachgewiesen werden. Eine zusätzliche Behandlung mit Sulf führte in den mit Ald-infundierten WT-Mäusen ebenfalls zu einem Anstieg der Exkretion des Markers. Die Nrf2<sup>+</sup>-K-Mäuse zeigten keine erhöhte Isoprostan F<sub>2t</sub>-Exkretion gegenüber der WT-K-Gruppe, wohingegen die Einzelbehandlung mit Sulf in den WT-Mäusen zu einer etwas geringeren Exkretion führte (Abbildung 4.36 A). Die gleichen Effekte waren für die Exkretion der modifizierten Base 8-OHdG vorzufinden. So war die Ausscheidung an 8-OHdG in der WT-Ald und Nrf2<sup>+</sup>-Ald-Gruppen signifikant gegenüber der Nrf2<sup>+</sup>-K gesteigert. Jedoch erreichte keine erhöhte 8-OHdG-Exkretion eine Signifikanz gegenüber der WT-K-Gruppe (Abbildung 4.36 B).



**Abbildung 4.36: Nachweis von oxidativen Stressmarkern im Sammelurin von Aldosteron-infundierten Wildtyp- und Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen nach 28-tägiger Behandlung.** **A:** Menge des durch Lipid-Peroxidation entstandenen 15-Isoprostans F<sub>2t</sub> im Sammelurin **B:** Menge der oxidierten und ausgeschnittenen/eliminierten Base 8-OHdG im Sammelurin. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte + Standardfehler. n=7 für die Nrf2<sup>↑</sup>-K-Gruppe, n=8 für alle anderen Gruppen. 8-OHdG: 8-Hydroxy-2'-Desoxyguanosin, Ald: Aldosteron, K: Kontrolle, Nrf2: *Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2*, Sulf: Sulforaphan WT: Wildtyp. \*p≤0,05 vs. WT K, #p≤0,05 vs. WT Sulf, +p≤0,05 vs. Nrf2<sup>↑</sup> K.

#### 4.2.7 Einfluss von Nrf2-Aktivierung und Aldosteron auf die Induktion von DNA-Schäden

Um zu untersuchen, ob der nachgewiesene systemische oxidative Stress sowie die oxidativen Schäden auch zu DNA-Schäden in der Niere führten, wurde ein immunhistochemischer Nachweis des DNA-Schadensmarkers  $\gamma$ H2AX auf Paraffinschnitten durchgeführt. Repräsentative Bilder von dem Nierencortex und der -medulla der Kontroll- und Ald-infundierten Gruppen sind in Abbildung 4.37 A und B dargestellt. Die repräsentativen Bilder der anderen Gruppen sind im Anhang zu finden (Abbildung 10.6). Im Vergleich zur WT-K-Gruppe waren im Nierencortex der mit Sulf behandelten WT-Mäuse und in der Nrf2<sup>↑</sup>-K-Gruppe in etwa doppelt so viele  $\gamma$ H2AX-positive Zellkerne zu finden. Ald führte in allen drei infundierten Gruppen zu einem signifikanten Anstieg an  $\gamma$ H2AX-positiven Zellkernen im Vergleich zu den jeweiligen K-Gruppen. Während in den WT-Mäusen eine Vervierfachung gefunden wurde, kam es in der Nrf2<sup>↑</sup>-Ald-Gruppe zu einer Versechsfachung der positiven Kerne im Vergleich zur WT-K. In der Medulla hingegen war die Anzahl der positiven Zellkerne in den WT- und Nrf2<sup>↑</sup>-K-Gruppen gleich. Auch eine Behandlung mit Sulf hatte keinen Einfluss. Eine Behandlung mit Ald hingegen führte zu 2 bis 2,5-mal so vielen  $\gamma$ H2AX-positiven Zellkernen (Abbildung 4.37 C).



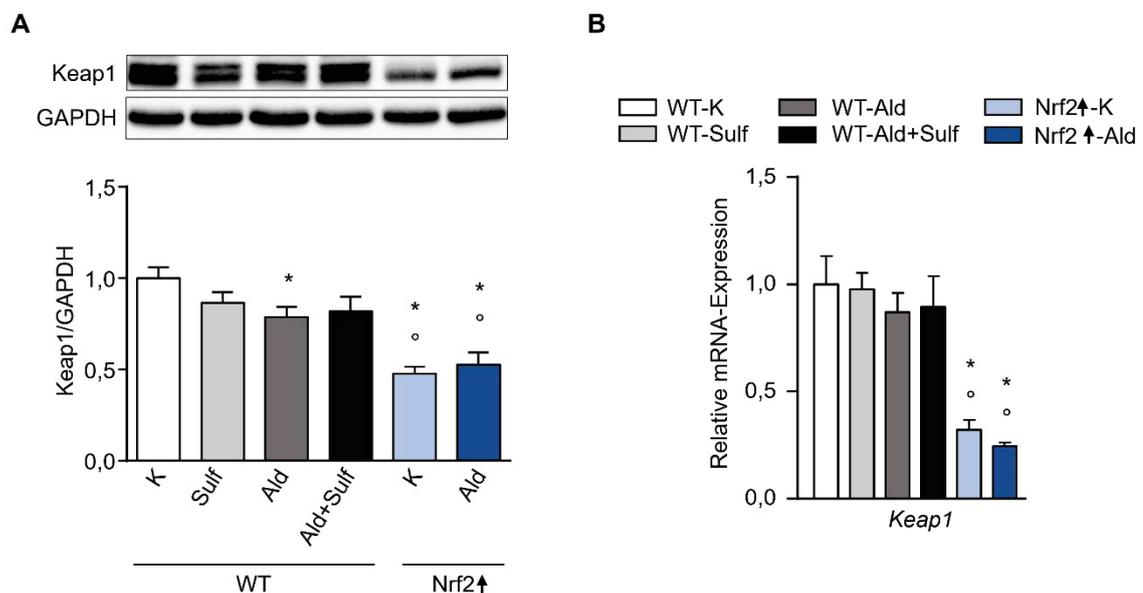
**Abbildung 4.37:  $\gamma$ H2AX-Färbung zum Nachweis von DNA-Schäden in der Niere von Aldosteron-infundierten Wildtyp- und Nrf2<sup>Δ</sup>-Mäusen.** Paraffinschnitte des Nierengewebes wurden mit einem Antikörper gegen  $\gamma$ H2AX, einem Marker für DNA-Schäden, immunhistochemisch angefärbt. **A:** Repräsentative Bilder des Nierencortex von Kontroll- und Aldosteron-infundierten Wildtyp- und Nrf2<sup>Δ</sup>-Mäusen. **B:** Repräsentative Bilder der Nierenmedulla von Kontroll- und Aldosteron-infundierten Wildtyp- und Nrf2<sup>Δ</sup>-Mäusen.  $\gamma$ H2AX-positive Zellkerne sind mit schwarzen Pfeilen markiert. **C:** Ratio der  $\gamma$ H2AX-positiven Zellkerne normiert auf die Wildtyp-Kontrolle. Für die Quantifizierung wurden 10 Gesichtsfelder des Nierencortex und 5 Gesichtsfelder der Nierenmedulla pro Tier mit Hilfe von Image J ausgewertet. Die Anzahl der  $\gamma$ H2AX-positiven Zellkernen wurde auf die Gesamtkernzahl des Bildes bezogen. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert + Standardfehler. n = 8. 200x Vergrößerung. Maßstab = 50  $\mu$ m.  $\gamma$ H2AX: Phosphoryliertes Histon 2AX an Serin 139, Ald: Aldosteron, K: Kontrolle, Nrf2: *Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2*, Sulf: Sulforaphan, WT: Wildtyp. \*p $\leq$ 0.05 vs. WT-K, #p $\leq$ 0,05 vs. WT-Sulf, +p $\leq$ 0.05 vs. Nrf2<sup>Δ</sup>-K.

#### 4.2.8 Untersuchungen zur Keap1-abhängigen Nrf2-Regulation und Aktivierung von Nrf2

Auch in diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Ald zu oxidativem Stress und zu daraus resultierenden DNA-Schäden führt. Jedoch wurden weder die zusätzlich mit Sulf behandelten und Ald-infundierten WT-Mäuse noch die mit Ald-infundierten Nrf2<sup>Δ</sup>-Mäuse vor den Ald-induzierten Schäden vollumfänglich geschützt. Wie bereits beschrieben basiert die Arbeitshypothese auf der Aktivierung des Nrf2-Signalweges. Deshalb wurde weiterführend untersucht, ob es infolge der Schäden zu einer Aktivierung und Translokation des Transkriptionsfaktors Nrf2 kommt. Ebenso wurde analysiert, ob die Behandlung mit Sulf und die geringere Keap1-Expression in den transgenen Mäusen basal zu einer Aktivierung des Signalweges führte.

## 4.2.8.1 Expression von Keap1

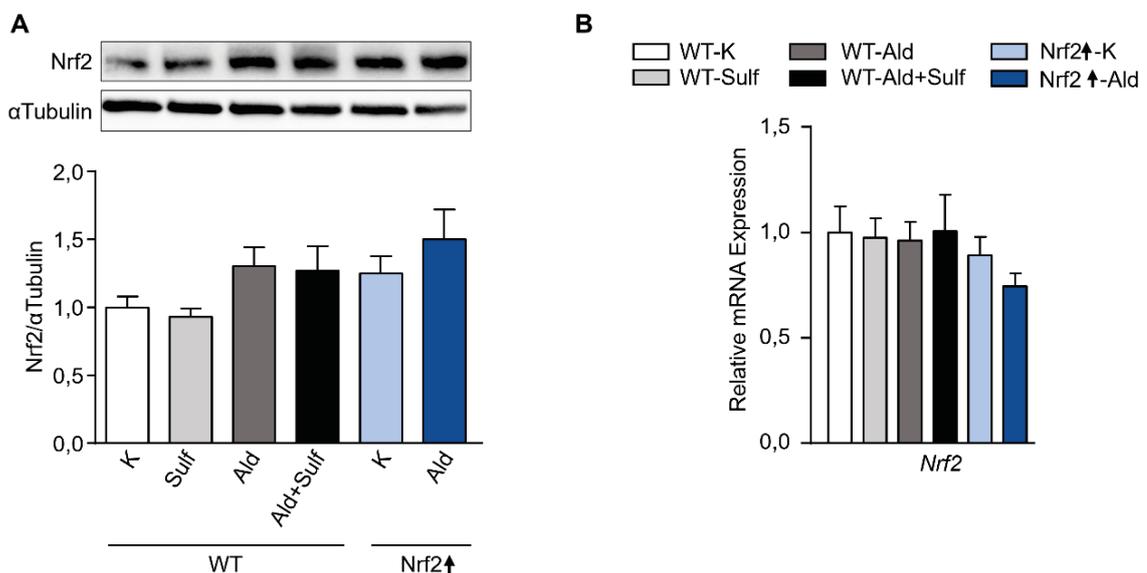
In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass in den Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen Keap1 in der Niere auf Proteinebene basal weniger exprimiert wird [156]. Um dies zu bestätigen und den Einfluss einer Sulf und Ald-Behandlung zu analysieren, wurde die Keap1-Expression sowohl auf Proteinebene als auch auf mRNA-Ebene untersucht. Die Keap1-Expression war auf Proteinebene in der Nrf2<sup>↑</sup>-K-Gruppe um ca. 50 % geringer als in der WT-K-Gruppe. Eine Behandlung mit Ald hatte in den Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen keinen Einfluss auf die Keap1-Proteinexpression. Eine Behandlung mit Ald führte in den WT-Mäusen ebenfalls, jedoch in einem geringeren Maße, zu einer signifikant geringeren Keap1-Expression. Dieser Effekt war als Tendenz auch Kombinationsbehandlung (Ald+Sulf) und in den Sulf-Mäusen verglichen mit der WT-K-Gruppe zu beobachten (Abbildung 4.38 A). Auch auf mRNA-Ebene konnte eine signifikant geringere *Keap1*-Expression in den Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen verglichen mit den WT-K und WT-Ald-Mäusen nachgewiesen werden. Für Mäuse der WT-Ald und WT-Ald+Sulf-Gruppe konnte auch eine geringfügig niedrigere mRNA-Expression in Relation zur WT-Kontrolle beobachtet werden (Abbildung 4.38 B).



**Abbildung 4.38: Expression von Keap1 in der Niere von Aldosteron-infundierten Wildtyp- und Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen.** **A:** Relative Protein-Expression von Keap1. Gezeigt sind repräsentative Protein-Banden der verschiedenen Gruppen. Die Proben wurden jeweils auf das Referenzprotein GAPDH und anschließend auf die wildtypischen Kontroll-Mäuse normiert. Die Quantifizierung erfolgte mit dem Programm ImageLab. **B:** Die mRNA-Expression von *Keap1* in den Nieren von Mäusen wurde mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Die RNA wurde aus den Nieren der behandelten wildtypischen und transgenen Mäuse isoliert. Die mRNA-Werte wurden auf *Gapdh* und *β-actin* als Referenz-Gene bezogen. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte + Standardfehler. n = 8. Ald: Aldosteron, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, Keap1: Kelch-ähnliches ECH-assoziiertes Protein 1, K: Kontrolle, Nrf2: *Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2*, Sulf: Sulforaphan, WT: Wildtyp. \*p≤0,05 vs. WT-K, °p≤0,05 vs. WT-Ald.

## 4.2.8.2 Expression und Anwesenheit von Nrf2

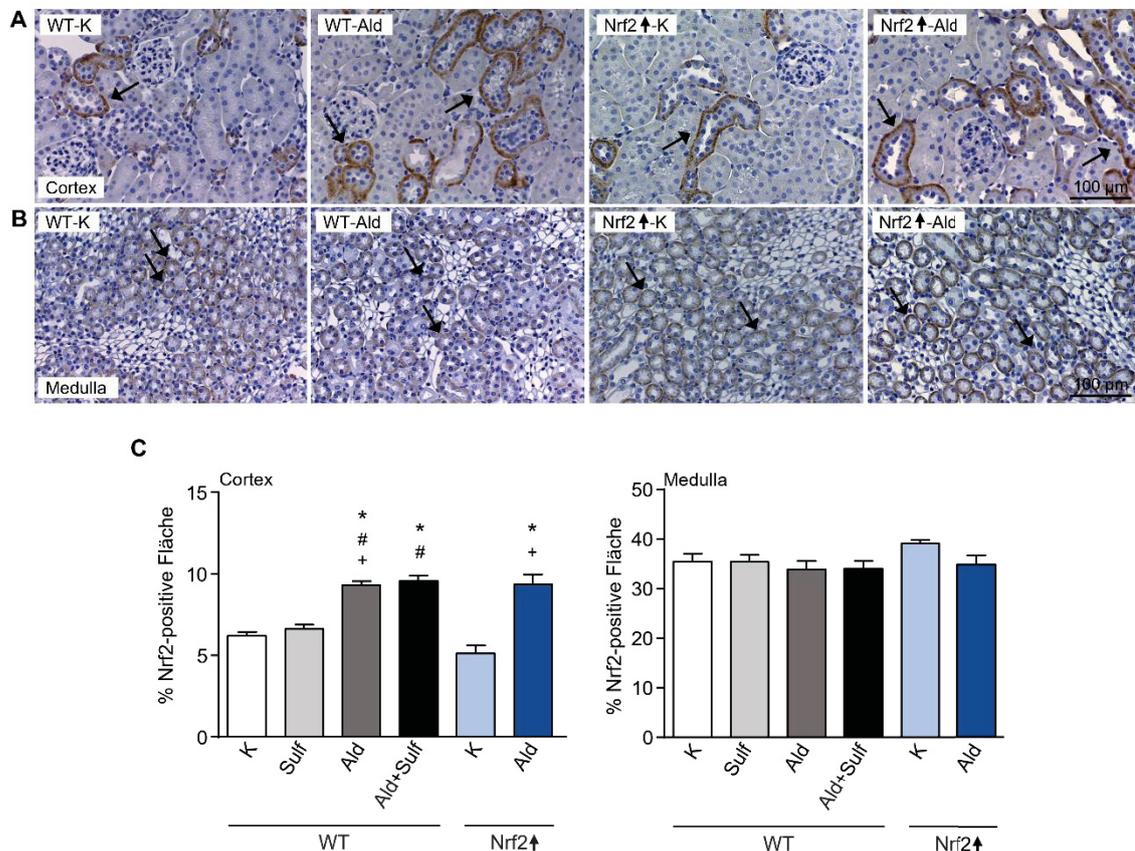
Nachdem bestätigt werden konnte, dass in den transgenen Mäusen Keap1 herunterreguliert ist, wurde untersucht, welchen Einfluss dies und die Behandlung mit Sulf auf die Nrf2-Expression oder -Stabilität haben. Die Behandlung der WT-Mäuse mit Sulf hatte keinen Einfluss auf den Nrf2-Gehalt in der Niere (Abbildung 4.39 A). Die Ald-Infusion führte jedoch zu einer tendenziell erhöhten Expression. Dieser Effekt wurde durch eine zusätzliche Behandlung mit Sulf im Trinkwasser nicht verstärkt. In der Nrf2<sup>↑</sup>-K-Gruppe konnte dies ebenfalls im gleichen Umfang nachgewiesen werden. Eine Ald-Behandlung führte zu einer circa 1,5-fach höheren Menge an Nrf2 verglichen mit der WT-K. Eine Exposition der WT-Mäuse mit Ald oder Sulf oder der Mausstamm selbst hatten keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von *Nrf2*. Für Ald-infundierte Nrf2<sup>↑</sup>-Mäuse konnte eine tendenziell geringere mRNA-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 4.39 B).



**Abbildung 4.39: Expression von Nrf2 in der Niere von Aldosteron-infundierten Wildtyp- und Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen.** **A:** Relative Protein-Expression von Nrf2. Gezeigt sind repräsentative Protein-Banden der verschiedenen Gruppen. Die Proben wurden jeweils auf das Referenzprotein  $\alpha$ Tubulin und anschließend auf die wildtypischen Kontroll-Tiere normiert. Die Quantifizierung erfolgte mit dem Programm ImageLab. **B:** Die mRNA-Expression von *Nrf2* in den Nieren der Mäuse wurde mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Die RNA wurde aus den Nieren der behandelten wildtypischen und transgenen Mäuse isoliert. Die mRNA-Werte wurden auf *Gapdh* und  $\beta$ -actin als Referenz-Gene bezogen. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte + Standardfehler. n = 8. \*p $\leq$ 0,05 vs. WT-K. Ald: Aldosteron, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, K: Kontrolle, Nrf2: Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2, Sulf: Sulforaphan, WT: Wildtyp.

Um die Ergebnisse weiter zu bestätigen, wurde zusätzlich ein immunhistochemischer Nachweis von Nrf2 auf Paraffinschnitten der Niere durchgeführt. Beispielbilder der Färbung für die Kontroll-Gruppen und mit Ald-infundierten Mäuse sind in Abbildung 4.40 A und B abgebildet. Beispielbilder der weiteren Gruppen sind im Anhang aufgeführt (Abbildung 10.7). Der immunhistochemische Nachweis von Nrf2 zeigte im Cortex, dass die Nrf2-positive Fläche sich zwischen den Gruppen der WT-K, WT-Sulf und Nrf2<sup>↑</sup>-K nicht unterschied. Eine Ald-Infusion führte in allen Gruppen zu einem signifikanten Anstieg der

Nrf2-positive Fläche im Cortex verglichen mit den Kontrollen. Die Nrf2-positive Fläche in der Medulla unterschied sich zwischen den Gruppen nicht. Nur in der Kontrolle der Nrf2<sup>+</sup>-Mäuse war tendenziell ein höherer Anteil an Nrf2-positiver Fläche sichtbar (Abbildung 4.40 C).

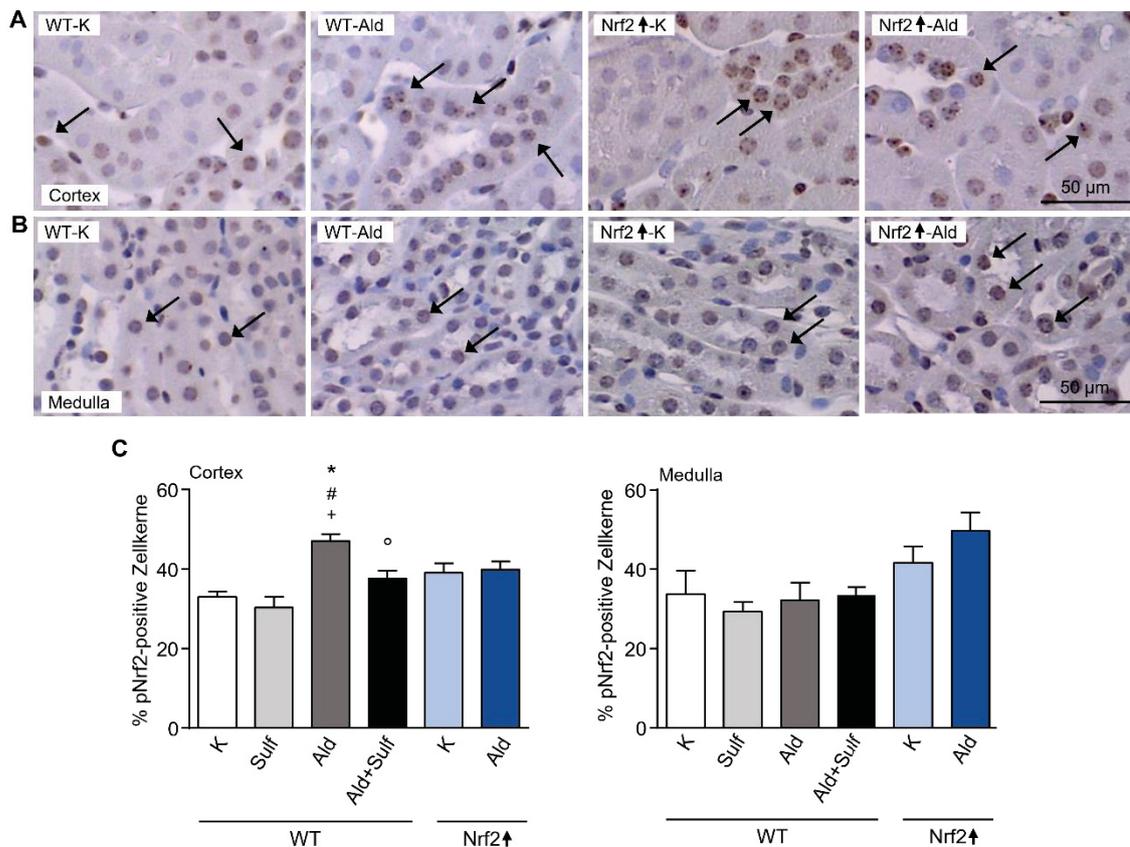


**Abbildung 4.40: Nachweis von Nrf2 auf Nierengewebe von Aldosteron-infundierten Wildtyp und Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen.** Paraffinschnitte des Nierengewebes wurden mit einem Antikörper gegen Nrf2 immunhistochemisch angefärbt. **A:** Repräsentative Bilder des Nierencortex von Kontroll- und Aldosteron-infundierten Wildtyp und Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen. **B:** Repräsentative Bilder der Nierenmedulla von Kontroll- und Aldosteron-infundierten Wildtyp und Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen. Beispiele für Nrf2-positive Flächen sind mit schwarzen Pfeilen markiert. **C:** Prozentualer Anteil der Nrf2-positiven Fläche in Bezug auf die Gesamtfläche. Für die Quantifizierung wurden 10 Gesichtsfelder des Nierencortex und 5 Gesichtsfelder der Nierenmedulla pro Tier mit Hilfe von Image J ausgewertet. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert + Standardfehler. n = 8. 200x Vergrößerung. Maßstab = 100 µm. Ald: Aldosteron, K: Kontrolle, Nrf2: *Nuclear factor-erythroid-2-related factor*, Sulf: Sulforaphan, WT: Wildtyp. \*p≤0,05 vs. WT-K, #p≤0,05 vs. WT-Sulf, +p≤0,05 vs. Nrf2<sup>+</sup>-K.

#### 4.2.8.3 Phosphorylierung und Translokation von Nrf2

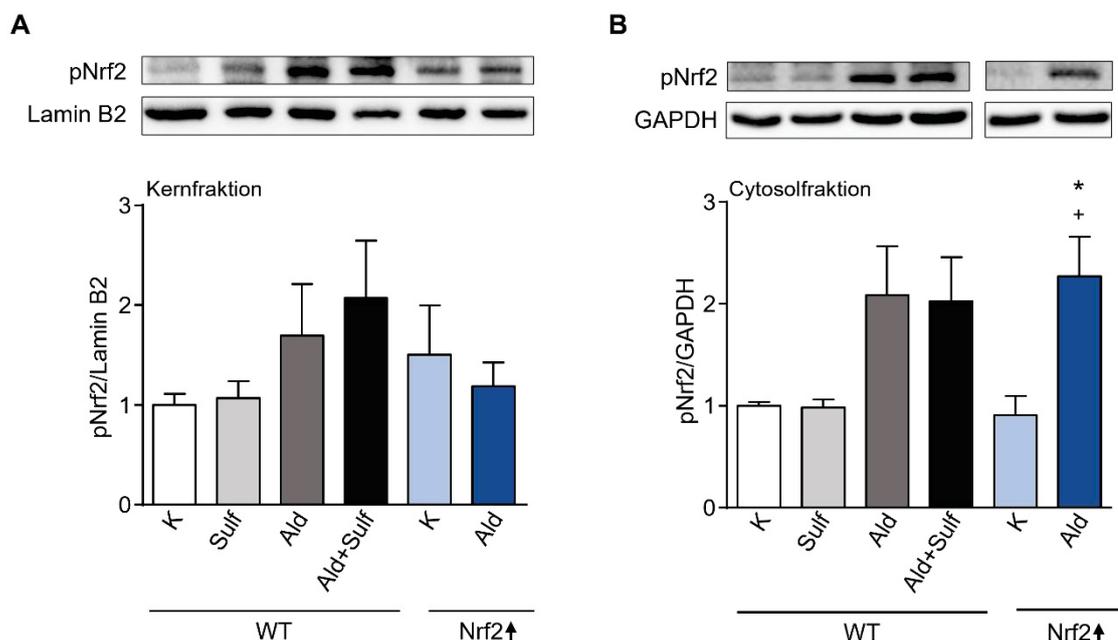
Da im Dosisversuch gezeigt werden konnte, dass es nach einer Ald-Infusion zu einer Phosphorylierung und Translokation von Nrf2 in den Zellkern kommt (siehe 4.1.10.2), wurde dies auch in diesem Protektionsversuch überprüft. Repräsentative Bilder der Färbung sind in Abbildung 4.41 A, B und im Anhang in Abbildung 10.8 dargestellt. Der immunhistochemische Nachweis des phosphorylierten und somit aktivierten Nrf2-Protein (pNrf2) bestätigten den im vorherigen Versuch nachgewiesenen Effekt. Auch hier konnte im Cortex ein signifikant höherer Anteil an pNrf2-positiven Zellkernen in den Ald-

infundierten WT-Mäusen verglichen mit den beiden Kontroll-Gruppen nachgewiesen werden. Ebenso war in diesem Versuch in allen Gruppen nur eine Anfärbung der Zellkerne zu sehen, was die Translokation von pNrf2 nach der Phosphorylierung erneut bestätigte. Jedoch zeigten sich WT-Sulf-Gruppe keine Effekte, während in den Nrf2-Mäusen und in der Kombinationsbehandlung der WT-Mäuse ein leichter Anstieg im Nierencortex zu sehen war. In der Medulla war innerhalb der WT-Gruppen kein höherer Anteil an pNrf2-positiven Zellkernen nachweisbar. Jedoch waren tendenziell mehr positive Zellkerne in den Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen aufzufinden. Dieser Effekt verstärkte sich bei diesem Stamm unter der Infusion mit Ald (Abbildung 4.41 C).



**Abbildung 4.41: pNrf2-Färbung zum Nachweis von dessen Aktivierung und Akkumulation in der Niere von Aldosteron-infundierten Wildtyp- und Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen.** Paraffinschnitte des Nierengewebes wurden mit einem Antikörper gegen an Serin 40 phosphoryliertes Nrf2 immunhistochemisch angefärbt. **A:** Repräsentative Bilder des Nierencortex von Kontroll- und Aldosteron-infundierten Wildtyp- und Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen. **B:** Repräsentative Bilder der Nierenmedulla von Kontroll- und Aldosteron-infundierten Wildtyp- und Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen. Beispiele für pNrf2-positive Zellkerne sind mit schwarzen Pfeilen markiert. **C:** Prozentualer Anteil der pNrf2-positiven Zellkerne in Bezug auf die gesamte Anzahl der Zellkerne. Für die Quantifizierung wurden 10 Gesichtsfelder des Nierencortex und 5 Gesichtsfelder der Nierenmedulla pro Tier mit Hilfe von Image J ausgewertet. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert + Standardfehler. n = 8. 200x Vergrößerung. Maßstab = 50 µm. Ald: Aldosteron, K: Kontrolle, Nrf2: *Nuclear factor-erythroid-2-related factor*, pNrf2: Nrf2 phosphoryliert an Serin 40, Sulf: Sulforaphan, WT: Wildtyp. \*p≤0.05 vs. WT-K, #p≤0,05 vs. WT-Sulf, °p≤0,05 vs. WT-Ald, °p≤0,05 vs. Nrf2<sup>+</sup>-K.

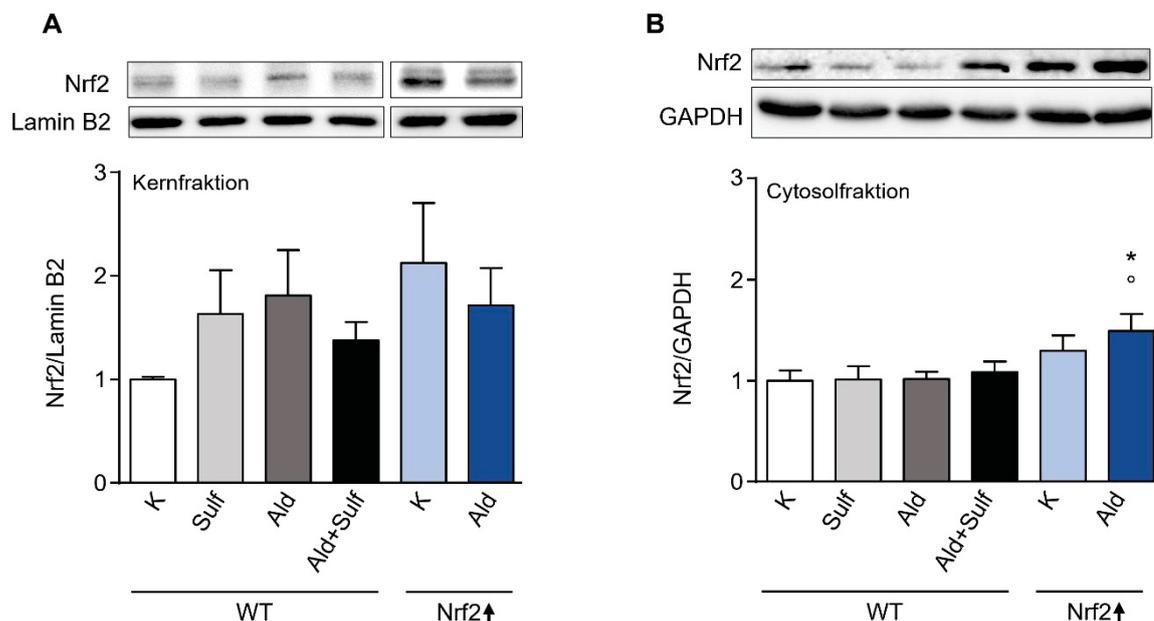
Für die weitere Untersuchung der Translokation des phosphorylierten Nrf2 in den Zellkernen wurde aus Nierenhomogenaten Cytosol- und Kernfraktionen gewonnen. Die Sulf-Behandlung hatte keinen Einfluss auf die Anwesenheit von pNrf2 in Kern und Cytosol. Die Ald-Infusion führte in den WT-Mäusen zu einer erhöhten Menge von pNrf2 im Kern und im Cytosol. Ein leicht erhöhter Gehalt an pNrf2 konnte in der Kernfraktion von Nrf2<sup>+</sup>-K-Mäusen nachgewiesen werden. Im Cytosol war kein Unterschied verglichen mit den WT-K-Mäusen zu beobachten. Die Ald-Behandlung der Nrf2<sup>+</sup>-Mäuse führte zu einem signifikanten Anstieg an pNrf2 im Cytosol verglichen mit den Kontrollen beider Mausstämmen. Dieser Effekt konnte jedoch nicht in der Kernfraktion nachgewiesen werden (Abbildung 4.42).



**Abbildung 4.42: Western Blots zum Nachweis von pNrf2 in der Kern- und Cytosolfraction aus Nierenhomogenaten von Aldosteron-infundierten Wildtyp- und Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen.** Für eine genauere Untersuchung der pNrf2-Lokalisation wurden Kern- und Cytosolfractionen aus Nierenhomogenaten gewonnen. **A:** Gezeigt sind repräsentative Protein-Banden der jeweiligen Kernfraktion aus den verschiedenen Gruppen, sowie die relative Quantifizierung von pNrf2. **B:** Gezeigt sind repräsentative Protein-Banden der jeweiligen Cytosolfraction aus den verschiedenen Gruppen, sowie die relative Quantifizierung von pNrf2. Die Proben wurden jeweils auf das Referenzprotein GAPDH oder Lamin B2 und anschließend auf die Kontroll-Tiere normiert. Die Quantifizierung erfolgte mit ImageLab. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte + Standardfehler. n=7 für Kernfraktion der Nrf2<sup>+</sup>-K, alle anderen Gruppen n = 8. Ald: Aldosteron, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, K: Kontrolle, pNrf2: *Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2* phosphoryliert an Ser40, Sulf: Sulforaphan, WT: Wildtyp. \*p≤0,05 vs. WT-K, \*p≤0,05 vs. Nrf2<sup>+</sup>-K.

Da in diesem Versuch auch ein Effekt auf das nicht phosphorylierte Nrf2 beobachtet werden konnte (vgl. Abbildung 4.40) und die Phosphorylierung von Nrf2 nicht essenziell für die Translokation in den Zellkern ist [171], wurde der Gehalt an nicht-phosphoryliertem Nrf2 ebenfalls in der Kern- und Cytosolfraction mittels Western Blot analysiert. In der Kernfraktion konnte eine tendenziell höhere Menge an Nrf2 in den Gruppen WT-Sulf, WT-Ald, Nrf2<sup>+</sup>-K und Nrf2<sup>+</sup>-Ald verglichen mit der WT-K beobachtet werden (Abbildung 4.43 A). Im Cytosol konnte hingegen nur ein leichter Anstieg von Nrf2 in der Kontrolle der Nrf2<sup>+</sup>-

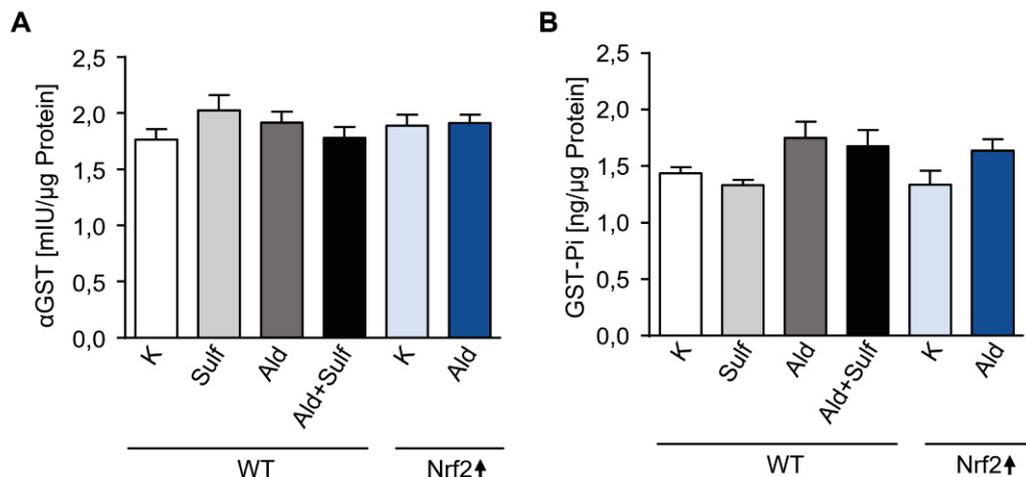
Mäuse gezeigt werden, welcher in den Ald-infundierten Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen jeoch weiter zunahm und signifikant wurde (Abbildung 4.43 B).



**Abbildung 4.43: Western Blots zum Nachweis von nicht-phosphoryliertem Nrf2 in der Kern- und Cytosolfraction aus Nierenhomogenaten von Aldosteron-infundierten Wildtyp- und Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen.** Für eine genauere Untersuchung der Nrf2 Lokalisation wurden Kern- und Cytosolfractionen aus Nierenhomogenaten gewonnen. **A:** Gezeigt sind repräsentative Protein-Banden der jeweiligen Kernfraktion aus den verschiedenen Gruppen, sowie die relative Quantifizierung von Nrf2. **B:** Gezeigt sind repräsentative Protein-Banden der jeweiligen Cytosolfraction aus den verschiedenen Gruppen, sowie die relative Quantifizierung von Nrf2. Die Proben wurden jeweils auf das Referenzprotein GAPDH oder Lamin B2 und anschließend auf die Kontroll-Tiere normiert. Die Quantifizierung erfolgte mit ImageLab. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte + Standardfehler. n = 7 für Kernfraktion der Nrf2<sup>↑</sup>-K, alle anderen Gruppen n = 8. Ald: Aldosteron, GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, K: Kontrolle, Nrf2: Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2, Sulf: Sulforaphan, WT: Wildtyp.

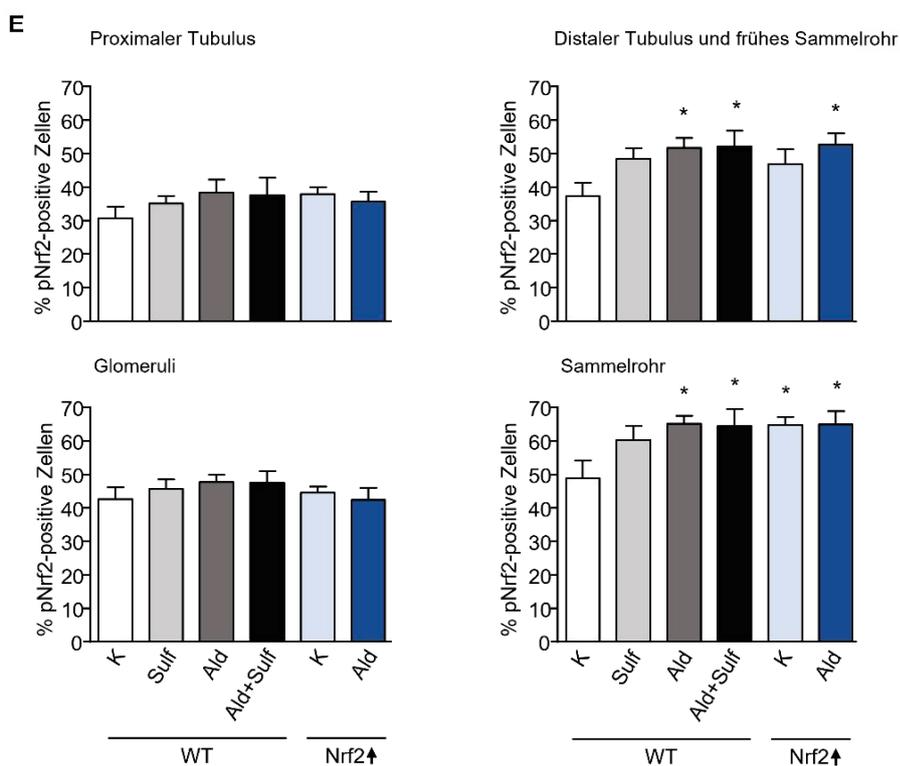
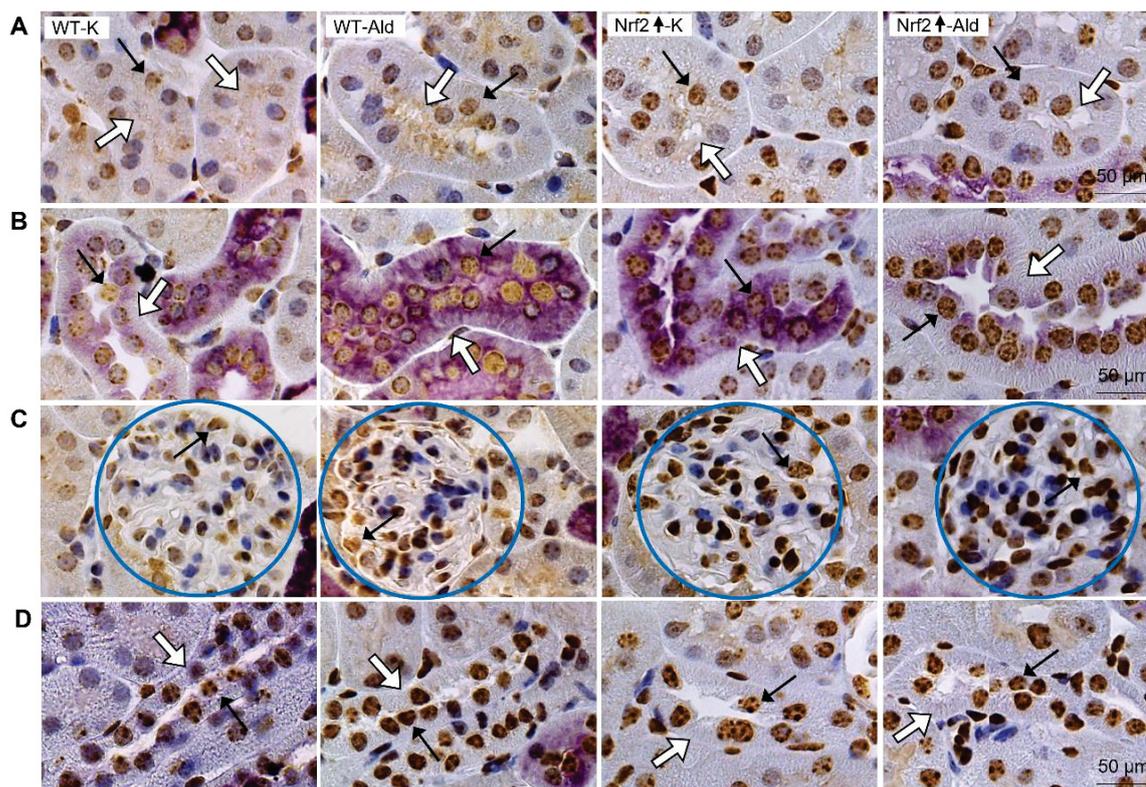
#### 4.2.9 Lokalisation der Ald-induzierten Schädigung und Nrf2-Akkumulierung

Nachdem ein signifikant erhöhter pNrf2-Gehalt in den WT-Ald Mäusen und eine erhöhte Tendenz in den Nrf2<sup>↑</sup>-K und Nrf2<sup>↑</sup>-Ald Mäusen im Cortex nachgewiesen werden konnte, wurde versucht, sowohl die Ald-induzierten Schäden als auch die Nrf2-Aktivierung und Akkumulierung zu lokalisieren. Hierfür wurden zunächst zwei ELISAs durchgeführt, welche spezifisch αGST oder GST-Pi in den Gesamtproteinisolaten aus den Nieren der Mäuse nachweisen können. Dabei wird die erhöhte Expression oder Ausscheidung GST als Marker für tubuläre Schädigung verwendet und kann im Urin oder im Gewebe nachgewiesen werden. αGST wird im proximalen und GST-Pi im distalen Tubulus exprimiert [172]. Weder für αGST noch für GST-Pi konnte ein signifikant höherer Gehalt in den Nieren der Ald-infundierten WT-Mäuse oder der Nrf2<sup>↑</sup>-Mäuse nachgewiesen werden. Für GST-Pi jedoch ließ sich in den WT-Ald und WT-Ald+Sulf-Mäusen sowie in den Nrf2<sup>↑</sup>-Ald Mäusen eine tendenziell erhöhte GST-Pi-Konzentration verglichen mit den jeweiligen Kontrollen der Mausstämme.



**Abbildung 4.44: Nachweis von  $\alpha$ GST und GST-Pi in den Nierenhomogenaten von Aldosteron-infundierten Wildtyp- und Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen.** Die Konzentrationen von  $\alpha$ GST(A) und GST-Pi (B) in den Nieren der verwendeten Mäuse wurden über zwei spezifischen ELISAs bestimmt. Hierfür wurden Nierenhomogenate verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardfehler. n = 8. Ald: Aldosteron, ELISA: *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*,  $\alpha$ GST:  $\alpha$ -Glutathion-S-Transferase, GST-Pi: Glutathion-S-Transferase Pi, K: Kontrolle, Nrf2: *Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2*, Sulf: Sulforaphan, WT: Wildtyp.

Da keine signifikanten, aber dennoch tendenzielle Effekte beobachtet werden konnten, wurde erneut eine immunhistochemische Doppelfärbung von pNrf2 und Calbindin durchgeführt, um die Nrf2-Aktivierung und Akkumulierung im Nierencortex genauer zu lokalisieren. Zellen des distalen und frühen Sammelrohres wurden über Calbindin violett angefärbt (Abbildung 4.45 A), während die proximalen Tubuli anhand ihres Bürstensaumes (Abbildung 4.45 B) und die Sammelrohre anhand einer Kombination aus fehlender Calbindin-Färbung und fehlendem Bürstensaum identifiziert (Abbildung 4.45 D) wurden. Die Glomeruli konnten anhand ihrer markanten Knäuel-Struktur analysiert werden (Abbildung 4.45 C). Bilder der weiteren Mausgruppen sind im Anhang zu finden (Abbildung 10.10). Die Untersuchung der Verteilung von pNrf2 zeigte zunächst eine unterschiedliche basale Verteilung in den Zellkernen innerhalb der im Cortex gelegenen Tubulusabschnitte (Glomeruli, proximale Tubuli, distale Tubuli und Sammelrohre). Während der Gehalt an pNrf2-positiven Kernen im proximalen Tubulus basal bei ca. 30 % lag, war der Gehalt demgegenüber in den Calbindin-positiven Zellen und in den Glomeruli um 10 % und in den Sammelrohren um ca. 20 % erhöht. Während im proximalen Tubulus und in den Glomeruli keine erhöhte Anzahl an pNrf2-positiven Zellkernen nach der Behandlung mit Ald und/oder Sulf vorzufinden war und auch die genetische Nrf2-Aktivierung keinen Einfluss auf die Anwesenheit von pNrf2 in den Kernen hatte, konnten in den Calbindin-positiven und in den Sammelrohrzellen Effekte beobachtet werden. Der Gehalt an pNrf2-positiven Zellkernen in Calbindin-positiven und in den Sammelrohrzellen war im Vergleich zur WT-K in allen anderen Gruppen erhöht. Dieser Nachweis war in den Gruppen WT-Ald, WT-Ald+Sulf und Nrf2<sup>+</sup>-Ald signifikant verglichen mit der Kontrolle. Im Sammelrohr war zusätzlich auch die Nrf2<sup>+</sup>-K Gruppe signifikant erhöht (Abbildung 4.45 E).



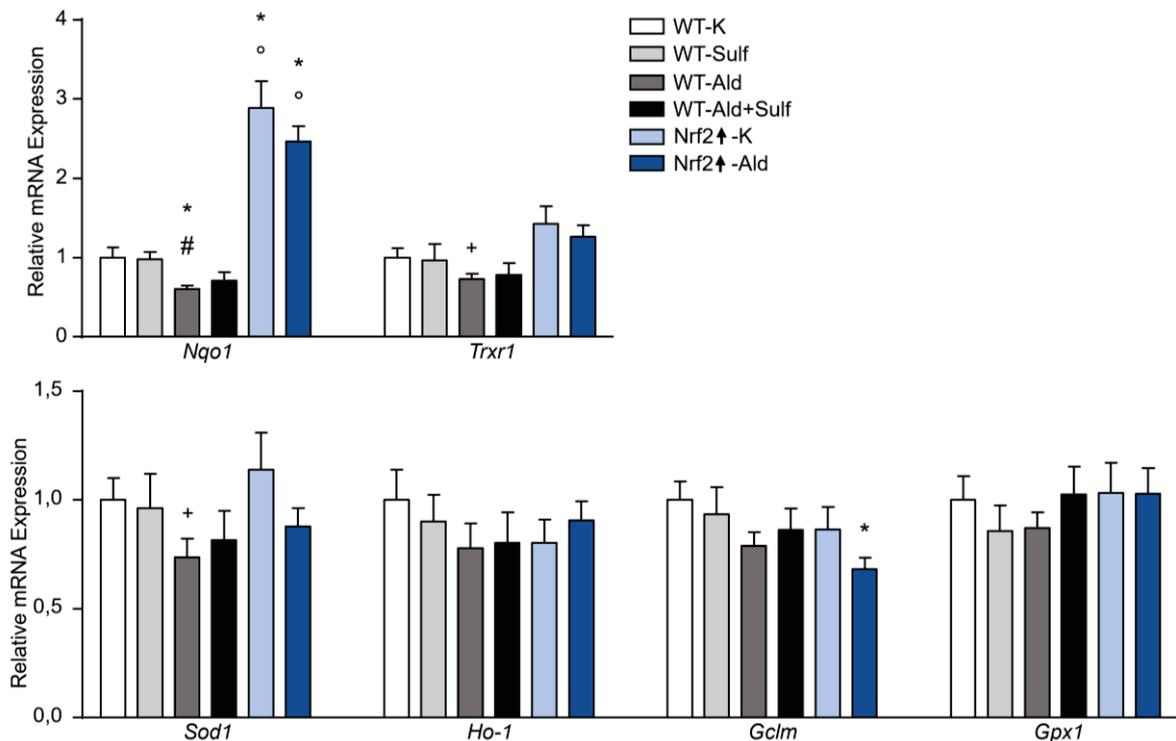
**Abbildung 4.45: Lokalisierung der Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 in der Niere von Aldosteron-infundierten Wildtyp- und Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen.** A-D: Repräsentative Bilder der Lokalisation von pNrf2 in den Nierenstrukturen. Die Doppelfärbungen wurden auf Paraffinschnitten der Nieren von Wildtyp- und Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen nach 28-tägiger Ald-Behandlung durchgeführt. Für die Doppelfärbungen wurden Antikörper verwendet, die dem an Serin 40 phosphoryliertem und somit aktiviertem Nrf2 (pNrf2) (braune Färbung) und an Calbindin (violette Färbung), einem Marker für distale Tubuluszellen und Zellen des oberen Sammelrohres binden, verwendet. Die weißen Pfeile zeigen auf den jeweilig identifizierten Tubulusabschnitt und die schwarzen Pfeile auf pNrf2-positive Zellkerne. A: pNrf2 in proximalen Tubuli, identifiziert anhand ihres Bürstensaums. B: pNrf2 in distale Tubuli und Zellen des oberen Sammelrohres, identifiziert über die Calbindin-Färbung. C: pNrf2 in den Glomeruli, identifiziert über ihre Struktur und mit blauen Kreisen gekennzeichnet.

**Weiterführung der Abbildungsbeschriftung 4.45: D:** pNrf2 in den Sammelrohren, identifiziert anhand ihres Lumens und der fehlenden Calbindin-Färbung. **E:** Die Quantifizierung der Doppelfärbungen zeigt das Verhältnis der pNrf2-positiven Zellkernen zu der Menge der gesamten Zellkerne in der jeweiligen Nierenstruktur. Für die Quantifizierung der pNrf2-positiven Zellkerne wurden 10 Sichtfelder des Nierenkortex analysiert. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert + Standardfehler. n = 8. 400x Vergrößerung. Maßstab = 50 µm. Ald: Aldosteron, K: Kontrolle, Nrf2: *Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2*, pNrf2: phosphoryliert an Ser40, Sulf: Sulforaphan, WT: Wildtyp. \*p≤0.05 vs. WT-K.

#### 4.2.10 Untersuchungen zur Expression von Nrf2-regulierten Zielgenen und -proteinen

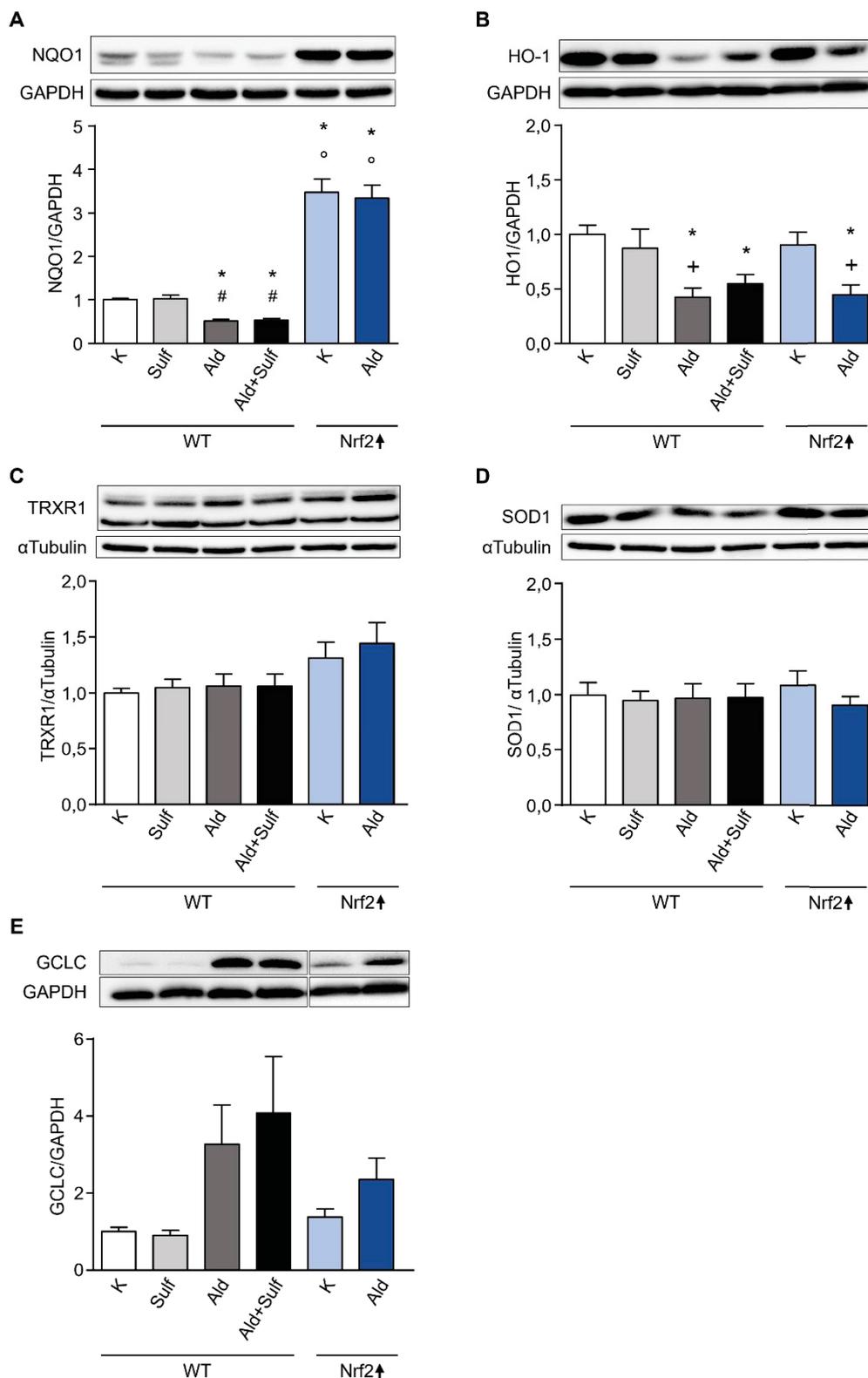
Im Folgenden wurde untersucht, ob die Nrf2-Aktivierung und die Ald-Infusion zu einer erhöhten Expression der Nrf2-regulierten Zielproteine und -gene führten.

Mittels quantitativer RT-PCR wurde die mRNA-Expression von sechs verschiedenen Nrf2-Zielgenen untersucht. Die Sulf-Behandlung hatte auf die mRNA-Expression in den WT-Mäusen keinen Einfluss. Die Ald-Infusion in WT-Mäusen führte tendenziell in allen untersuchten Zielgenen eher zu einer geringeren Expression und so war für *Nqo1* die mRNA-Expression signifikant erniedrigt im Vergleich zur WT-K und für *Trxr1* und *Sod1* im Vergleich zur Nrf2<sup>↑</sup>-K. Die mRNA-Expression von *Nqo1* war in den Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen signifikant erhöht gegenüber den WT-Mäusen unabhängig von der Ald-Infusion. Dies ließ sich ebenfalls tendenziell für die mRNA-Expression von *Trxr1* nachweisen. Für *Sod1* war ebenfalls eine Tendenz in der Nrf2<sup>↑</sup>-Kontrolle zusehen. Die drei weiteren Zielgene *Ho1*, *Gclm* und *Gpx1* zeigten für die Nrf2<sup>↑</sup>-K-Mäuse keine weiteren Effekte verglichen zur WT-Kontrolle. Eine signifikant niedrigere mRNA-Expression im Vergleich zur WT-Kontrolle zeigte sich für *Gclm* in den Ald-infundierten Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen (Abbildung 4.46).



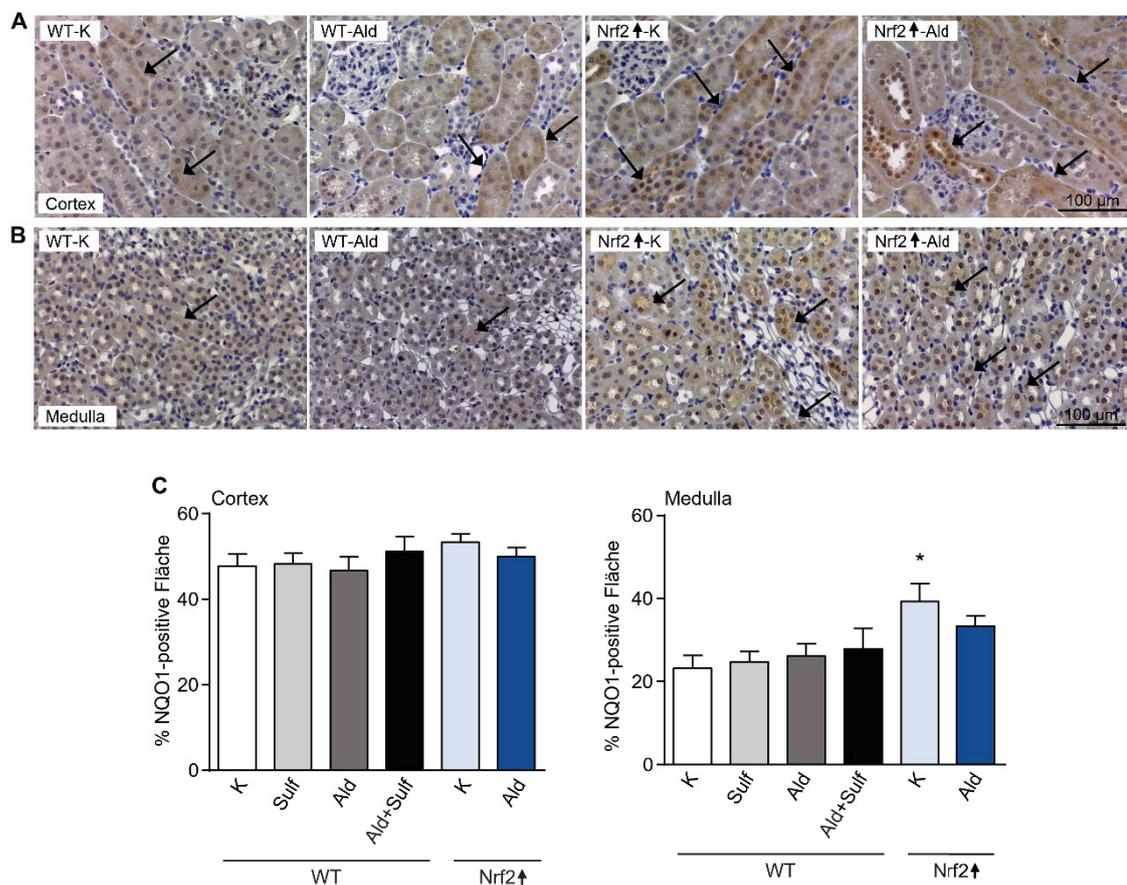
**Abbildung 4.46: mRNA-Expression von Nrf2-regulierten Genen in Aldosteron-infundierten Wildtyp- und Nrf2<sup>Δ</sup>-Mäusen.** Die mRNA-Expression von *Nqo1*, *Trxr1*, *Sod1*, *Ho1*, *Gclm*, und *Gpx1* in den Nieren von Mäusen wurde mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Die RNA wurde aus den Nieren von Wildtyp- und Nrf2<sup>Δ</sup>-Mäusen, isoliert. Die mRNA-Werte wurden auf *Gapdh* und *β-actin* als Referenz-Gene bezogen und anschließend auf die Wildtyp-Kontrolle normiert. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte + Standardfehler, n=8. Ald: Aldosteron, Gapdh: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, Gclm: Glutamat-Cysteinylgase regulatorische Untereinheit, Gpx1: Glutathionperoxidase 1, Ho1: Hämoxigenase 1, K: Kontrolle, Nqo1: NAD(P)H-(Chinone) Dehydrogenase 1, Nrf2: Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2, Sod1: Superoxiddismutase 1, Sulf: Sulforaphan, Trxr1: Thioredoxinreduktase 1, WT: Wildtyp. \*p≤0,05 vs. WT-K, #p≤0,05 vs. WT-Sulf, °p≤0,05 vs. WT-Ald, +p≤0,05 vs. Nrf2<sup>Δ</sup>-K.

Mittels Western Blot wurde die Menge der Zielproteine NQO1, HO1, TRXR1, SOD1 und GCLC analysiert. Die Behandlung mit Sulf hatte keinen Einfluss auf die Protein-Expression der fünf untersuchten Proteine. Die Ald-Infusion in den Wildtyp-Mäusen führt bei zwei von fünf Zielproteinen (NQO1 und HO1) zu einer signifikant geringeren Proteinmenge. Dieser Effekt wurde durch die zusätzliche Behandlung mit Sulf nicht beeinflusst. Der Gehalt der zwei weiteren Proteine TRXR1 und SOD1 war in den WT-Mäusen nicht verändert. In den Nrf2<sup>Δ</sup>-Mäusen hingegen konnte eine vierfach höhere Menge an NQO1 nachgewiesen werden. Diese war signifikant erhöht sowohl gegenüber der WT-K als auch den WT-Ald-Mäusen. Ebenso konnte eine tendenziell höhere Proteinmenge für TRXR1 beobachtet werden, die unter Ald-Infusion weiter zunahm. Für HO1 wurde in den Ald-infundierten Nrf2<sup>Δ</sup>-Mäusen eine signifikant geringere Proteinmenge verglichen mit beiden Kontrollgruppen nachgewiesen. Die Expression von GCLC war in beiden Mausstämmen nach der Ald-Exposition erhöht. Jedoch stieg die Proteinexpression in den WT-Mäusen deutlich höher – auf das 3,5 bis 4-fache im Vergleich zur Kontrolle – an (Abbildung 4.47).



**Abbildung 4.47: Western Blots zum Nachweis von Nrf2-regulierten Proteinen in der Niere von Aldosteron-infundierten Wildtyp- und Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen.** Expression der Proteine NQO1 (A), HO1 (B), TRXR1 (C), SOD1 (D) und GCLC (E). Gezeigt sind repräsentative Protein-Banden der verschiedenen Gruppen. Die Proben wurden jeweils auf das Referenzprotein GAPDH und anschließend auf die Kontroll-Tiere normiert. Die Quantifizierung erfolgte mit ImageLab. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte + Standardfehler. n = 8. Ald: Aldosteron, Gapdh: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, GCLC: Glutamat-Cysteinyligase katalytische Untereinheit, HO-1: Hämoxigenase 1, K: Kontrolle, NQO1: NAD(P)H-(Chinone) Dehydrogenase 1, Nrf2: Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2, Sod1: Superoxiddismutase 1, Sulf: Sulforaphan, TRXR1: Thioredoxinreduktase 1, WT: Wildtyp. \*p $\leq$ 0,05 vs. WT K, #p $\leq$ 0,05 vs. WT-Sulf, <sup>o</sup>p $\leq$ 0,05 vs. WT-Ald, <sup>a</sup>p $\leq$ 0,05 vs. WT-Ald+Sulf, <sup>a</sup>p $\leq$ 0,05 vs. Nrf2<sup>+</sup>-K.

Der immunhistochemische Nachweis des Nrf2-regulierten Proteins NQO1 zeigte auf dem Nierengewebe Ald-infundierter WT- und Nrf2<sup>↑</sup>-Mäuse im Cortex keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen. Auch die Kontrollen der Mausstämme unterschieden sich nicht signifikant. Jedoch wird bei einer genaueren Betrachtung der Färbung in Abbildung 4.48 A+C deutlich, dass die NQO1-positiven Flächen im Gewebe der Nrf2<sup>↑</sup>-Mäuse eine intensivere braune Färbung haben. In der Medulla jedoch konnte ein signifikanter Anstieg der NQO1-positiven Fläche in den Nrf2<sup>↑</sup>-K-Mäusen verglichen mit den WT-K-Mäusen beobachtet werden. Dieser Effekt war auch tendenziell in den Ald-infundierten Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen zu sehen. Weitere repräsentative Bilder der Färbung sind in Abbildung 10.10 im Anhang gezeigt.

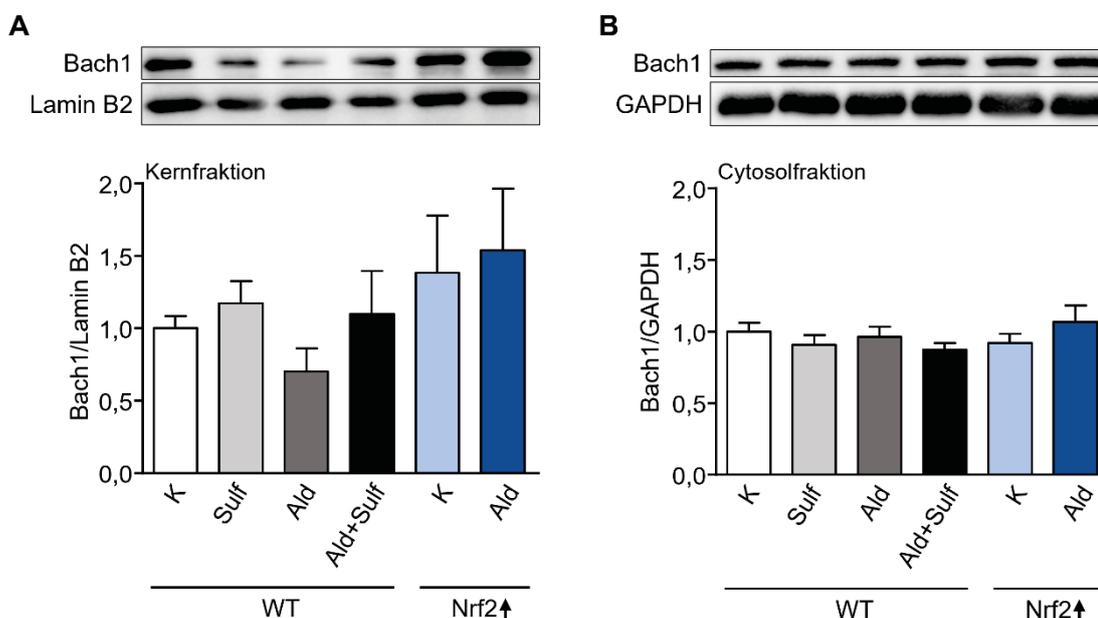


**Abbildung 4.48: Immunhistochemischer Nachweis von NQO1 im Nierengewebe von Aldosteron-infundierten Wildtyp- und Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen.** Paraffinschnitte des Nierengewebes wurden mit einem Antikörper gegen NQO1 immunhistochemisch angefärbt. **A:** Repräsentative Bilder des Nierencortex von Kontroll- und Aldosteron-infundierten Wildtyp- und Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen. **B:** Repräsentative Bilder der Nierenmedulla von Kontroll- und Aldosteron-infundierten Wildtyp- und Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen. Beispiele für NQO1-positive Flächen sind mit schwarzen Pfeilen markiert. **C:** Prozentualer Anteil der Nrf2-positiven Fläche in Bezug auf die Gesamtfläche. Für die Quantifizierung wurden 10 Gesichtsfelder des Nierencortex und 5 Gesichtsfelder der Nierenmedulla pro Tier mit Hilfe von Image J ausgewertet. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert + Standardfehler. n = 8. 200x Vergrößerung. Maßstab = 100 µm. Ald: Aldosteron, K: Kontrolle, NQO1: NAD(P)H-(Chinone) Dehydrogenase 1, Nrf2: *nuclear factor-erythroid-2-related factor*, Sulf: Sulforaphan, WT: Wildtyp. \*p ≤ 0.05 vs. WT-K.

#### 4.2.11 Untersuchungen zur Keap1-unabhängigen Nrf2-Regulation

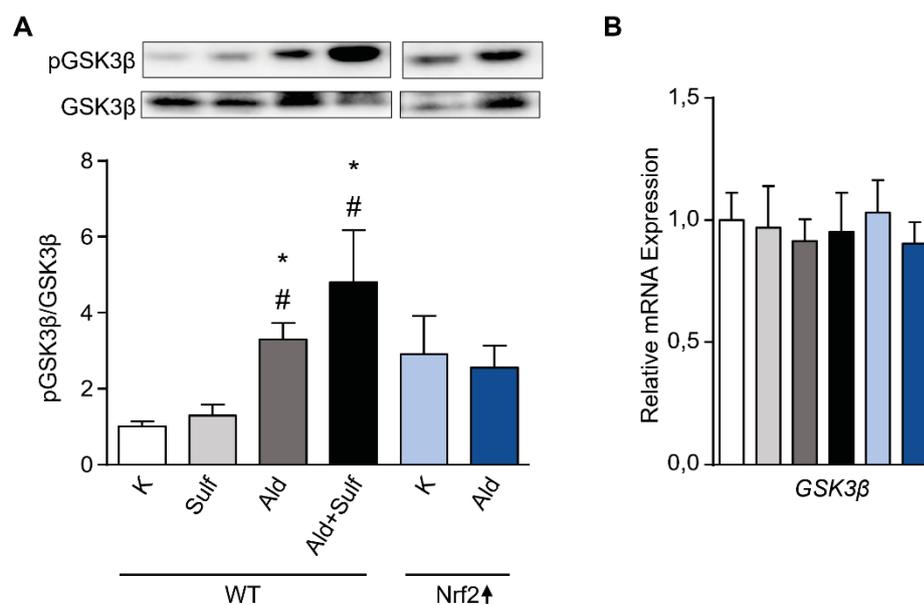
Im folgenden Abschnitt wurde der Effekt der verschiedenen Behandlungen auf die Keap1 unabhängige Nrf2-Regulation in Bezug auf die zwei verschiedenen Mausmodelle näher untersucht, da die nachgewiesene Translokation nur bedingt zu einer erhöhten Expression der Nrf2-Zielgene führte.

Wie bereits in 1.7.1 beschrieben, bildet das Transkriptionsregulator-Protein Bach1 ebenfalls im Kern Heterodimere mit sMaf-Proteinen. Anschließend bindet das Heterodimer als Repressor an das ARE und inhibiert so die Expression Nrf2-regulierter Gene. Aufgrund dessen wurde die Akkumulation von Bach1 im Kern und Cytosol in den behandelten WT- und Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen untersucht. Ein signifikanter Anstieg oder Abfall der Bach1-Menge war in keiner Gruppe verglichen mit den Kontrollen zu beobachten. Die Behandlung der WT-Mäuse mit Ald über 28 Tage führte aber zu einem tendenziell geringeren Proteingehalt von Bach1 im Kern. In den Nrf2<sup>↑</sup>-K und Nrf2<sup>↑</sup>-Ald-Mäusen hingegen war eine tendenziell höhere Akkumulation von Bach1 im Kern zu beobachten (Abbildung 4.49 A). Im Cytosol änderte sich die Anwesenheit von Bach1 weder in Abhängigkeit vom Mausstamm, noch von der Behandlung (Abbildung 4.49 B).



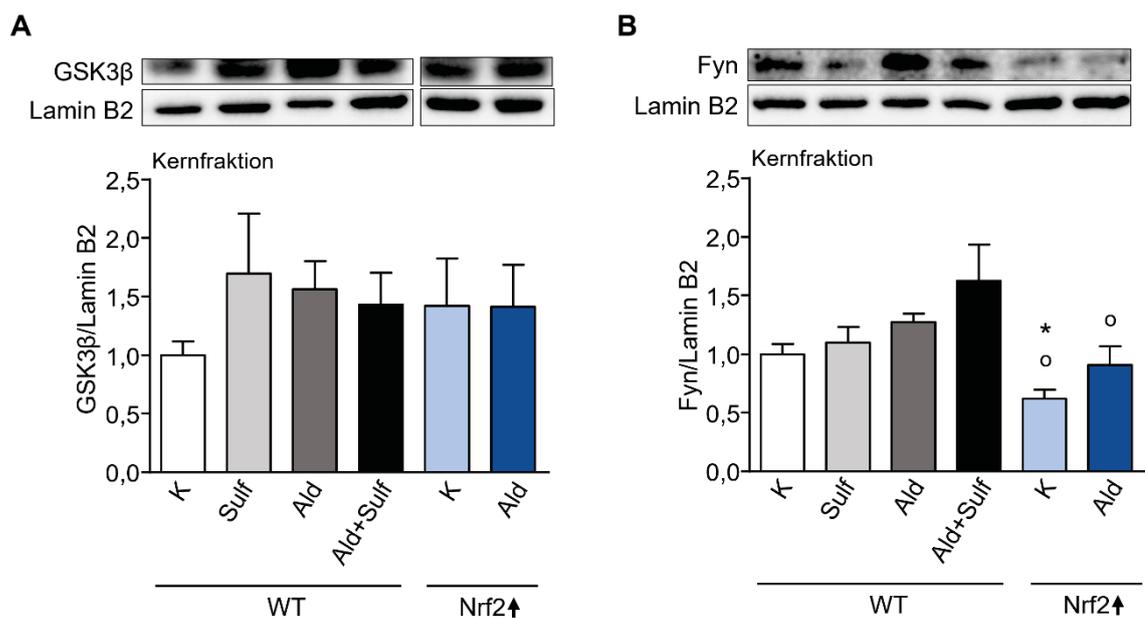
**Abbildung 4.49: Western Blots zum Nachweis von Bach1 in Kern- und Cytosolfractionen der Niere von Aldosteron-infundierten Wildtyp- und Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen.** Für eine genauere Untersuchung der Bach1-Akkumulation wurden Kern- und Cytosolfractionen aus Nierenhomogenaten gewonnen. **A:** Gezeigt sind repräsentative Protein-Banden der jeweiligen Kernfraktion aus den verschiedenen Gruppen, sowie die relative Quantifizierung von Bach1. **B:** Gezeigt sind repräsentative Protein-Banden der jeweiligen Cytosolfraction aus den verschiedenen Gruppen, sowie die relative Quantifizierung von Bach1. Die Proben wurden jeweils auf die Referenzproteine GAPDH oder Lamin B2 und anschließend auf die wildtypischen Kontroll-Mäuse normiert. Die Quantifizierung erfolgte mit ImageLab. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte + Standardfehler. n = 7 für Kernfraktion der Nrf2<sup>↑</sup>-K, alle anderen Gruppen n = 8. Ald: Aldosteron, Bach1: *BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 1*, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, K: Kontrolle, Nrf2: *Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2*, Sulf: Sulforaphan. WT: Wildtyp.

Es ist bekannt, dass die Kinase GSK3 $\beta$  eine Rolle in der Keap1 unabhängigen Regulation übernimmt (vgl. 1.7.1). Aufgrund dessen und des bereits im Dosisversuch nachgewiesenen Effektes von Ald auf GSK3 $\beta$  (siehe 4.1.12), wurde die Expression und Phosphorylierung von GSK3 $\beta$  auch in diesem Versuch analysiert. Während sich der GSK3 $\beta$ -Proteingehalt in den Nieren der behandelten WT- und Nrf2<sup>+</sup>-Mäuse nicht änderte, war ein großer Unterschied in der posttranslationalen Phosphorylierung der Kinase an Serin 9 zu beobachten. In den Ald-infundierten WT-Mäusen ließ sich ein signifikanter Anstieg an pGSK3 $\beta$  nachweisen. Die zusätzliche Behandlung mit Sulf steigerte den Anteil an pGSK3 $\beta$  zu GSK3 $\beta$  noch einmal. In den Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen war bereits in der Kontrolle ein größerer Anteil an pGSK3 $\beta$  nachzuweisen. Das Verhältnis von pGSK3 $\beta$  zu GSK3 $\beta$  änderte sich in den Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen nach der Ald-Behandlung in Relation zur Nrf2<sup>+</sup>-Kontrolle nicht (Abbildung 4.50 A). Die mittels Western Blot gezeigte unveränderte Proteinexpression von GSK3 $\beta$  konnte auf mRNA-Ebene mittels quantitativer RT-PCR bestätigt werden (Abbildung 4.50 B).



**Abbildung 4.50: Expression und Phosphorylierung von GSK3 $\beta$  in der Niere von mit Aldosteron-infundierten Wildtyp- und Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen.** **A:** Protein-Expression von pGSK3 $\beta$  in Relation zur Protein-Expression von GSK3 $\beta$ . Gezeigt sind repräsentative Protein-Banden der verschiedenen Gruppen. Die Quantifizierung erfolgte mit dem Programm ImageLab. Für die Auswertung wurde das Verhältnis von der phosphorylierten Form an Serin 9 zur nicht modifizierten Form ausgewertet und anschließend auf die wildtypischen Kontroll-Tiere normiert. Die Quantifizierung erfolgte mit dem Programm ImageLab. **B:** Die mRNA-Expression von *Gsk3 $\beta$*  in den Nieren von Mäusen wurde mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Die RNA wurde aus den Nieren der behandelten wildtypischen und transgenen Mäuse isoliert. Die mRNA-Werte wurden auf *Gapdh* und  *$\beta$ -actin* als Referenz-Gene bezogen. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte + Standardfehler. n = 7-8. Ald: Aldosteron, GAPDH: Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, GSK3 $\beta$ : Glykogensynthase-Kinase 3 $\beta$ , K: Kontrolle, Nrf2: *Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2*, Sulf: Sulforaphan, WT: Wildtyp. \*p < 0,05 vs. WT K, #p < 0,05 vs. WT-Sulf.

Um herauszufinden, ob die Phosphorylierung und somit Inaktivierung von GSK3 $\beta$  zu einer geringeren Akkumulation dieser Kinase im Kern führte, wurde im Western Blot die Kernfraktion der Nierenhomogenate analysiert. Zusätzlich wurde die Anwesenheit der Kinase Fyn im Kern untersucht. Die Kinase Fyn wird über GSK3 $\beta$  aktiviert. Eine Phosphorylierung von Nrf2 über Fyn führt zu einer Nrf2-Inaktivierung [128]. In allen Gruppen war tendenziell eine höhere GSK3 $\beta$  Akkumulation im Zellkern im Vergleich zu den WT-K-Mäusen zu beobachten (Abbildung 4.51 A). Eine erhöhte Anwesenheit von Fyn konnte nach einer Ald-Infusion der WT-Mäuse im Vergleich zur den WT-K und Nrf2 $^{\uparrow}$ -Mäusen tendenziell gezeigt werden. Dieser Effekt zeigte jedoch keine Signifikanz. Diese Beobachtung war auch in der Kombinationsbehandlung zu sehen. Eine alleinige Behandlung mit Sulf führte nicht zu einer Akkumulation von Fyn im Zellkern. In den Nrf2 $^{\uparrow}$ -Mäusen wurde eine signifikant niedrigere Akkumulation im Zellkern im Vergleich zur Kontrolle der WT-Mäuse gefunden. Die Akkumulation von Fyn im Kern in den Nrf2 $^{\uparrow}$ -K-Mäusen und Ald-infundierten Nrf2 $^{\uparrow}$ -Mäusen war ebenfalls signifikant geringer verglichen mit den Ald-infundierten WT-Mäusen (Abbildung 4.51 B).



**Abbildung 4.51: Western Blots zum Nachweis der Akkumulation von GSK3 $\beta$  und Fyn in der Kernfraktion der Nierenhomogenate von Aldosteron-infundierten Wildtyp- und Nrf2 $^{\uparrow}$ -Mäusen.** A: Gezeigt sind repräsentative Protein-Banden der jeweiligen Kernfraktion aus den verschiedenen Gruppen, sowie die relative Quantifizierung von GSK3 $\beta$ . B: Gezeigt sind repräsentative Protein-Banden der jeweiligen Kernfraktion aus den verschiedenen Gruppen, sowie die relative Quantifizierung von Fyn. Die Proben wurden jeweils auf das Referenzprotein Lamin B2 und anschließend auf die wildtypischen Kontroll-Mäuse normiert. Die Quantifizierung erfolgte mit ImageLab. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte + Standardfehler. n = 7 für die Nrf2 $^{\uparrow}$ -K-Gruppe, alle anderen Gruppen n = 8. Ald: Aldosteron, GSK3 $\beta$ : Glykogensynthase-Kinase 3 $\beta$ , K: Kontrolle, pNrf2: *Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2*, Sulf: Sulforaphan, WT: Wildtyp. \*p<0,05 vs. WT K, °p<0,05 vs. WT-Ald.

Insgesamt konnten die Ergebnisse des Dosisversuches in den mit Ald-infundiert WT-Mäusen bestätigt werden.

Eine Behandlung der WT-Mäuse mit Sulf führte zu einer geringeren Kreatinin-Clearance und einem erhöhten GSI. Weitere negative Effekte der Sulf-Behandlung waren nicht zu beobachten. Zu einer Aktivierung des Nrf2-Signalweges kam es jedoch nicht.

In der Kombinationsbehandlung mit Ald konnte Sulf nicht vor Ald-induzierten Schäden schützen. Weiterhin konnte in dieser Gruppe ebenfalls eine verschlechterte Nierenfunktion, veränderte Nierenmorphologie sowie oxidative und DNA-Schäden nachgewiesen werden. Jedoch kam es in den Mäusen mit Kombinationsbehandlung zu einer erhöhten Expression von Nrf2 und einer tendenziellen Akkumulation von Nrf2 im Kern, während es wie bei den WT-Ald-Mäusen, außer für die GCLC, nicht zu einer vermehrten Expression der Nrf2-Zielgene kam. Auch hier war die Expression tendenziell eher geringer verglichen mit der WT-K. Wie in den Ald-infundierten WT-Mäusen kam es auch in der WT-Ald+Sulf-Gruppe zu einer vermehrten Phosphorylierung von GSK3 $\beta$ , mit tendenziell erhöhter Akkumulation der nicht phosphorylierten Form im Kern.

Die transgenen Nrf2<sup>+</sup>-K-Mäuse zeigten bereits basale Unterschiede zum WT. So konnten in 2 von 8 Mäusen Hydronephrose beobachtet werden. Außerdem war das relative Nierengewicht bereits erhöht und die Kreatinin-Clearance tendenziell erniedrigt. Ebenso war der GSI basal signifikant erhöht. Marker für tubuläre Schäden, wie der TSI, NGAL oder KIM, zeigten keinen Unterschied zur WT-K. Des Weiteren konnte in den Nrf2<sup>+</sup>-K-Mäusen wie erwartet eine geringere Keap1-Expression nachgewiesen werden. Dies führte jedoch nur tendenziell zu einer erhöhten Nrf2-Expression und Translokation in den Kern. Dennoch konnte eine erhöhte Expression von NQO1 nachgewiesen werden. Für jeweils zwei weitere Zielgene und -proteine konnte eine gesteigerte Tendenz gezeigt werden. Eine weitere Analyse der Keap1-unabhängigen Regulation von Nrf2 zeigte zwar keine signifikanten Effekte, aber eine tendenziell erhöhte Anwesenheit von Bach1 und GSK3 $\beta$  im Kern, ebenso wie eine tendenziell erhöhte Phosphorylierung von GSK3 $\beta$ . Allerdings war die geringere Akkumulation von Fyn im Kern signifikant gegenüber den WT-K-Mäusen.

Eine Ald-Infusion der Nrf2<sup>+</sup>-Mäuse führte zu einer erhöhten Anzahl an Hydronephrose sowie einem gesteigerten Nierengewicht, jedoch nicht zu einem Anstieg des Blutdrucks. In der Nrf2<sup>+</sup>-Ald-Gruppe war die Kreatinin-Clearance ebenfalls geringer und es kam zu einem starken Anstieg des glomerulären Markers Albumin. Auch stieg der GSI signifikant zur WT-K an. Jedoch schienen die Nrf2<sup>+</sup>-Mäuse gegen die Ald-induzierten tubulären Schäden geschützt zu sein. So kam es weder zu einem Anstieg von NGAL oder KIM-1 im Urin noch zu einer Erhöhung des TSI. Vor den Ald-induzierten oxidativen und DNA-Schäden waren die transgenen Mäuse jedoch nicht geschützt, obwohl in den Nrf2<sup>+</sup>-Ald-Mäusen sowohl eine erhöhte Nrf2-Expression als auch eine tendenzielle Akkumulation im Kern nachgewiesen

werden konnte. Wie schon die Kontrolle dieses Mausstammes zeigten auch die mit Ald behandelten Nrf2<sup>+</sup>-Tiere eine Induktion der NQO1-Expression. Weiterhin wurden auf Proteinebene noch zwei weitere Nrf2-Zielproteine tendenziell höher exprimiert. Im Gegensatz dazu kam es bei HO1 auf Proteinebene und Gpx1 auf Genebene zu einer signifikant geringeren Expression. Eine weitere Untersuchung der Keap1-unabhängigen Nrf2-Expression zeigte ähnliche Effekte wie sie in der zugehörigen Kontrolle des transgenen Mausstammes beobachtet wurden.

## 5. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Rolle der Nrf2-Aktivierung bei Ald-induzierten Nierenschäden untersucht. Diese Arbeit sollte dazu beitragen, die Ald-induzierten Schäden und die Aktivierung von Nrf2 genauer zu lokalisieren und zu charakterisieren. Weiterhin sollte der Einfluss einer zusätzlichen Stimulation von Nrf2 auf die nachgewiesenen Nierenschäden untersucht werden.

### 5.1 Erhöhte Ald-Konzentrationen führen zu moderaten Nierenschäden

Ald ist ein Hormon des RAAS und trägt so zur Regulation des Blutdrucks und des Wasser- und Elektrolythaushaltes bei [61]. In erhöhten Konzentrationen führt Ald jedoch zu einer Entwicklung und Progression von Nierenschäden über die Induktion von oxidativem Stress und den daraus resultierenden Schäden [55]. Eine mögliche Rolle in der Protektion vor diesen induzierten Schäden, spielt der Transkriptionsfaktor Nrf2, der als Regulator der antioxidativen Abwehr fungiert, da gezeigt wurde, dass in CKD-Patienten oxidativer Stress zwar erhöht ist, die Nrf2-Funktion jedoch gestört ist [142, 143]. In hypertensiven Ratten und in kultivierten Nierenzellen konnte unsere Arbeitsgruppe bereits nachweisen, dass die Ald-induzierten Schäden zu einer Aktivierung von Nrf2 führen [76].

Im Dosisversuch sollte eine Konzentration von Aldosteron gefunden werden, die moderate Nierenschäden und eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 in Mäusen verursacht. Zusätzlich war Ziel dieses Versuches die Nrf2-Aktivierung und Ald-induzierte Schäden in der Niere zu lokalisieren. Hierfür wurden C57BL/6-Mäusen osmotische Minipumpen implantiert, welche über einen Zeitraum von 28 Tagen 75, 125, 250 µg/kg x Tag Ald oder Lösungsmittel abgaben. Weiterhin erhielten alle Tiere 1 % NaCl als Trinkwasser.

#### 5.1.1 Erhöhte Ald-Konzentrationen induzieren keine konstante Hypertonie in Wildtyp-Mäusen

Die Infusion mit Ald führte über einen Zeitraum von 28 Tagen in keiner der verwendeten drei Konzentrationen zu einer konstanten und signifikanten Erhöhung des Blutdrucks. Während der systolische Blutdruck zunächst in allen Dosisgruppen innerhalb von zwei Wochen anstieg, schien in den letzten zwei Wochen der Behandlung ein Anpassungsprozess eingesetzt zu haben, der den Blutdruck am Ende der 28 Tage wieder auf Kontrollniveau senkte. Zusätzlich konnte ein leichter Anstieg des Blutdrucks der Kontroll-Gruppe beobachtet werden. In Studien mit WT-Mäusen ist die Spanne der verwendeten Ald-Konzentration mit 7-1000 µg/kg x Tag sehr groß [90, 166-169]. Jedoch führten auch in diesen Berichten die eingesetzten Konzentrationen von 7-1000 µg/kg x Tag nur zu einer signifikanten Erhöhung des Blutdrucks, wenn die Mäuse eine hohe Salzzufuhr (8 % NaCl) bekamen oder einer Uninephrektomie unterzogen wurden [166, 167]. In Ratten hingegen führte eine Infusion von 18 oder 1000 µg/kg x Tag zu einem signifikanten Anstieg des systolischen Blutdrucks [76, 77, 168]. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass es sich

hierbei um einen Spezies-abhängigen Effekt handeln könnte. Da die Ald-Konzentrationen im Serum am Ende des Versuches Dosis-abhängig bis um das 4-fache zur Kontrolle zunahm, kann ein Defekt der Minipumpen ausgeschlossen werden. Weiterhin spricht die nachgewiesene signifikant erhöhte *αENac*-Expression in allen Behandlungsgruppen für eine Aktivierung des MR über Ald bis zum Ende der Behandlung. Ein Auftreten von Hypertonie in Ald-infundierten Mäusen (100 µg/kg x Tag) unter einer sehr salzhaltigen Diät [166], könnte dafür sprechen, dass ein höherer Salzgehalt nötig wäre, um die Aktivierung des RAAS und die damit zusätzlich verbundenen Effekte von Ang II in Mäusen herbeizuführen. Im Gegensatz zu Ratten, sind Mäuse polymorph für die Anzahl an *Renin*-Genloki (*Ren*). Einige Inzucht-Stämme, wie der hier verwendete Stamm C57BL/6J, besitzen nur eine Kopie des *Renin*-Lokus *Ren-1*, während andere Stämme den zusätzlichen Locus *Ren-2* besitzen [173, 174]. Dass dieser Polymorphismus einen Einfluss auf Ald/Salz-induzierte Hypertonie haben kann, konnte in einer Studie gezeigt werden, bei der Mäuse mit Desoxycorticosteronacetat (DOCA), einem Vorläufermolekül von Ald, infundiert wurden und zusätzlich 1 % NaCl im Trinkwasser erhielten [175]. So entwickelten nur Mäuse die beide Loci besaßen eine Hypertonie, während Mäuse mit ausschließlich dem *Ren-1*-Lokus keine Hypertonie entwickelten. Dass die induzierte Hypertonie abhängig von der Aktivität des RAAS, bzw. Ang II war, konnte mit Hilfe eines AT1R-Blockers demonstriert werden [175].

Die im Rahmen dieses Tierversuches auftretenden Effekte von Ald sind also unabhängig vom Bluthochdruck aufgetreten. Dass Hypertonie nur einen geringen Einfluss auf die Ald-induzierten Effekte hat, zeigten zum einen die Studien an Ald-infundierten Mäusen ohne ein Auftreten von Bluthochdruck [90, 166-169], zum anderen eine in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Studie in Ald-infundierten Ratten [77]. In diesem Versuch wurden die Ratten zusätzlich mit dem Vasodilator Hydralazin behandelt und trotz der so unterbundenen Hypertonie traten die Ald-induzierten Nierenschäden auf [77]. In dieser Studie wurden außerdem zwei Kontroll-Gruppen mitgeführt, die entweder normales Trinkwasser oder 1 % NaCl bekamen, um so Effekte durch die erhöhte Salzzufuhr auszuschließen. In den gängigen Hypertonie-Tiermodellen mit Ald oder dem Vorläufer DOCA wird zusätzlich 1 % NaCl in das Trinkwasser geben, um Effekte über die Ionenkanäle zu verstärken. Eine Zufuhr von 1 % NaCl führte in diesem Versuch zu einem leichten Anstieg des Blutdrucks in der Kontroll-Gruppe. Dies konnte auch bereits in Ratten beobachtet werden, hier zeigten diese aber im Vergleich zu den völlig unbehandelten Ratten keine Nierenschäden auf [77]. Die leichte Erhöhung des Blutdrucks könnte auf eine leichte Aktivierung des RAAS hindeuten, auch wenn eine erhöhte Salzzufuhr die RAAS-Aktivität unter physiologisch gesunden Bedingungen inhibiert. Jedoch konnte in einer klinischen Studie und in Salz-sensitiven Ratten eine Aktivierung des RAAS nach hoher Salzzufuhr beobachtet werden

[176, 177]. Weiterhin ist eine chronisch erhöhte Salzzufuhr bekanntermaßen mit einem höheren Risiko für die Entwicklung von Hypertonie und somit auch kardiovaskulären und renalen Krankheiten verbunden [178]. Im vorliegenden Versuch kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die folgend diskutierten Schäden Ald-induziert und nicht von der Salzzufuhr allein verursacht worden sind.

### **5.1.2 Eine Ald-Infusion führt zu einer moderaten Schädigung der Nierenfunktion und pathologischen Veränderungen in der Niere**

Während keine der gewählten Ald-Konzentrationen zu einer konstanten Hypertonie in den Mäusen führte, konnten dennoch in allen Ald-infundierten Gruppen pathologische Veränderungen und eine verschlechterte Nierenfunktion nachgewiesen werden. Weiterhin war bei einigen untersuchten Parametern eine Dosisabhängigkeit vorzufinden.

Die geringste Dosis von Ald führte bereits zu einem signifikanten Anstieg von Albumin im Urin. Eine erhöhte Albuminausscheidung wird mit der Progression von CKD in Zusammenhang gebracht und ist auch ein wichtiger Parameter zur Beurteilung der Nierenfunktion [5, 6]. Eine gestiegene Konzentration von Albumin im Urin ist ein Hinweis für eine defekte Filtrationsbarriere im Glomerulus oder eine gestörte Reabsorption im Tubulussystem [179]. Des Weiteren konnten über die Bestimmung des GSI und MSI auch histopathologische Veränderungen des Glomerulus nachgewiesen werden [179]. Diese beiden Parameter wiesen jedoch keine Dosisabhängigkeit auf. Die pathologischen Veränderungen im Glomerulus könnten auch die gesteigerte Albumin-Exkretion erklärt werden. In anderen tierexperimentellen Studien konnte bereits eine erhöhte Albuminausscheidung oder histopathologische Veränderungen der Glomeruli nach einer Ald-Infusion nachgewiesen werden [77, 169, 180]. Die Schäden traten in den Mäusen auch ohne eine Erhöhung des Blutdrucks auf. Weiterhin wurde beobachtet, dass erhöhte Ald-Konzentrationen mit einem Verlust der Podozyten-Marker Podocin und Nephrin einhergehen. Als Ursache für diese Podozytenschädigung konnten inflammatorische Prozesse nachgewiesen werden, welche unter anderem über die Kinase Sgk-1 ausgelöst werden können [108]. Ein Einfluss von Ald auf die Kreatinin-Clearance wurde in dieser Arbeit bei keiner der verwendeten Dosen beobachtet. Auch in anderen Studien an Mäusen oder Ratten hatte Ald keinen signifikanten Einfluss auf diesen Parameter [77, 166]. Ein Nachweis von Kreatinin im Blut oder Urin über die hier verwendete Jaffé-Reaktion hat Defizite, da es im Serum auch zu Reaktionen mit anderen Chromogenen kommen kann und die Kreatinin-Konzentration im Serum daher oft überschätzt wird [181]. Eine tubuläre Schädigung nach einer Ald-Infusion über 28 Tage konnte über die vermehrte Exkretion von NGAL und den TSI nachgewiesen werden. Eine detailliertere Betrachtung der im TSI bestimmten Parameter zeigte einen dosisabhängigen Anstieg an infiltrierten Immunzellen, eine Atrophie der Basalmembran und Kollagenablagerungen, als Hinweise auf induzierte

inflammatorische und fibrotische Prozesse, welche auch schon in weiteren Studien beobachtet wurden [98, 169]. Wie bereits in 1.5.2 beschrieben verursacht Ald Inflammation und Fibrose. Dies wird vor allem über die Aktivierung von Sgk1 und NF- $\kappa$ B und die damit verbundene Ausschüttung von Zytokinen und Rekrutierung von Immunzellen induziert [101]. Eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B nach einer Ald-Behandlung konnte bereits *in vivo* und *in vitro* demonstriert werden [55, 77]. Ein weiterer Mechanismus für die Induktion von Entzündungsreaktionen in der Niere ist die Aktivierung von Inflammasomen. Inflammasome sind Multiproteinkomplexe der angeborenen Immunantwort und führen zur proteolytischen Spaltung und Sekretion proinflammatorischer Zytokine. Eine besondere Rolle wird hierüber dem NLRP3 (*NLR family pyrin domain containing 3*)-Inflammasom zuteil, welches über die proteolytische Spaltung von Procaspase-1 zu Caspase-1 die Sekretion und Prozessierung von pro-IL-1 $\beta$  und pro-IL-18 steuert [182]. Bai und Kollegen konnten in Glomeruli von Ald-behandelten Mäusen und in kultivierten Podozyten nach einer Ald-Behandlung eine erhöhte Expression von NLRP3, Caspase 1 und IL-18 nachweisen. Dies ging mit einem Verlust von Podozytenmarkern einher. Der beobachtete Phänotyp konnte über einen KO gerettet werden und unterstreicht die mögliche wichtige Rolle von NLRP3 in der glomerulären Schädigung [183]. Inflammatorische Prozesse spielen außerdem in der Progression und in der Therapie von CKD eine wichtige Rolle [95]. Hierbei ist der anhaltende Zytokin-Spiegel und oxidativer Stress von Bedeutung, die zu einer kontinuierlichen Rekrutierung und Infiltration der Immunzellen und schließlich zu einer Fibrose führen [184]. Im Rahmen dieser Arbeit konnten nach der Ald-Infusion keine zirkulierenden Zytokine im Serum nachgewiesen werden, wohingegen die Expression von IL-6 in der Niere zunahm. Das signifikant höhere Herzgewicht in der mittleren und hohen Dosisgruppe lässt jedoch vermuten, dass Ald auch Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System hatte. Das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen ist nicht nur bei CKD, sondern auch in hypertensiven Patienten erhöht [96]. Zusammenfassend konnte jede verwendete Ald-Konzentration einen Verlust der Nierenfunktion unabhängig von einer Blutdruckerhöhung induzieren. Die Ald-Infusion verursachte darüber hinaus eine lokale Inflammation in der Niere, welche zu interstitiellen Kollagen-Ablagerungen und histopathologischen Veränderungen in den Glomeruli führten.

### **5.1.3 Ald verursacht systemischen oxidativen Stress und lokale oxidative Schäden in der Niere**

Oxidativer Stress ist eine kritische Komponente in der Entwicklung und Progression von CKD [88] und auch in der Pathophysiologie der Hypertonie wird dem oxidativen Stress eine bedeutende Rolle zugetragen [185]. CKD ist nicht nur eine häufige Ursache für Bluthochdruck, sondern auch eine Komplikation bei unkontrolliertem Bluthochdruck [186]. Bereits durchgeführte Versuche mit dem hypertensiven Ald/Salz-Rattenmodell, konnten die essenzielle Rolle von oxidativem Stress bei Ald-induzierten Nierenschäden zeigen. So

konnte der Radikalfänger Tempol vor den Ald-verursachten oxidativen Schäden in der Niere und der Leber schützen [54, 77].

In dieser Arbeit wurde systemischer oxidativer Stress über eine signifikant höhere Ausscheidung des oxidierten Lipides 15-Isoprostan  $F_{2t}$  im Urin der niedrigen und mittleren Dosisgruppe nachgewiesen. Auch die oxidierte Base 8-OHdG nahm im Sammelurin dieser Gruppen zu und unterstützt diese Aussage. Ein signifikanter Anstieg an lokalem oxidativem Stress in der Niere konnte auf Nierengewebe weder mit dem Redox-sensitiven Farbstoff DHE, noch über eine immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen 8-OxidG gezeigt werden. Hier ließen sich generell nur tendenzielle Steigerungen beobachten. In vorangegangenen Arbeiten wurden über eine Infusion von Ald oder Ang II, *in vitro* und *in vivo*, ROS und oxidativer Stress bereits nachgewiesen [55, 77, 187, 188]. Diese Befunde konnten auch in anderen tierexperimentellen Studien beobachtet werden [58, 108]. In diesen Studien wurden lokale oxidative Schäden in Form der oxidierten Base 8-oxidG, der nitrierten Aminosäure 3-Nitrotyrosin oder dem oxidierten Lipid TBARS (*Thiobarbituric acid reactive substances*) in den Nieren von Ald-infundierten Ratten analysiert [58, 77]. Erhöhter systemischer oxidativer Stress konnte auch über die Messung oxidativer Schäden im Plasma von CKD-Patienten in fortgeschrittenen Stadien nachgewiesen werden [140]. Weiterhin konnte eine erhöhte ROS-Produktion auch bereits in den frühen Stadien des CKD-Krankheitsbildes nachgewiesen werden, was die Rolle von oxidativem Stress in der Progression noch einmal verdeutlicht [189]. Ald induziert die Produktion von ROS indirekt über sekundäre Botenstoffe, welche die Aktivierung der NOX hervorrufen. Weiterhin induziert der Ald/MR-Komplex auch direkt die Expression der NOX-Untereinheiten [33]. Auch in diesem Versuch konnte eine signifikant gesteigerte mRNA-Expression von *Nox2* nach der Ald-Infusion Dosis-unabhängig in der Niere der Mäuse nachgewiesen werden. Die Proteinmenge der phosphorylierten und somit aktivierten Untereinheit der NOX2, p47phox, nahm nur tendenziell zu. Eine mögliche Erklärung für den nur tendenziell gestiegenen lokalen oxidativen Stress im Rahmen des durchgeführten Versuches ist die Varianz innerhalb der Gruppen. So kann die verwendete Zahl von fünf Tieren pro Gruppe zu gering gewesen sein, um die Varianz innerhalb dieser auszugleichen. Für weitere Experimente sollte daher eine erhöhte Gruppengröße in Betracht gezogen werden. Auch die Analyse der Expression weiterer Untereinheiten oder NOX-Isoformen könnten Aufschluss geben, da Ald auch die Expression weiterer Untereinheiten induziert [58].

Da auf dem Nierengewebe direkt keine ROS oder oxidative Schäden beobachtet werden konnten, wurde der strukturelle DNA-Schadensmarker  $\gamma$ H2AX als weiterer Biomarker für Schäden nach oxidativem Stress hinzugezogen. Der immunhistochemische Nachweis von  $\gamma$ H2AX zeigte einen signifikanten Anstieg positiver Kerne im Nierengewebe. Eine Akkumulation von  $\gamma$ H2AX im Nierengewebe konnten in Ald-infundierten [76, 77] und in mit

dem Ald-Vorläufer DOCA behandelten [190] Ratten zeigt werden. Während in den Ratten kein Unterscheid oder mehr DNA-Schäden in der Medulla nachgewiesen wurden [76, 77], schien in dieser Studie an Mäusen der Cortex mehr betroffen zu sein. Weiterhin war bei der Untersuchung der Nierenfunktion und -histologie teilweise eine Dosisabhängigkeit zu beobachten, für den Nachweis von oxidativem Stress oder Schäden war dies jedoch nicht der Fall. Dies spricht für eine Sättigung des MR bereits bei der niedrigsten Ald-Dosis. Im Gegensatz dazu konnte im Ang II -induzierten Hypertonie-Modell in der Maus eine Dosisabhängigkeit gezeigt werden [187]. Dass der induzierte oxidative Stress von dem MR abhängig ist, wurde bereits in vielen Studien über die Verwendung von MR-Antagonisten demonstriert [77, 190]. Nur in der höchsten Ald-Dosis im Cortex konnte eine erhöhte Anzahl von apoptotischen Zellen nachgewiesen werden, bei den anderen Dosen und in der Medulla steig die Zahl der apoptotischen Zellen, trotz oxidativem Stress und daraus resultierenden DNA-Schäden nicht an. Der gleiche Effekt konnte bereits in Ald-infundierten Ratten von unserer Arbeitsgruppe beobachtet werden [191]. In dieser Ratten-Studie wurde außerdem eine Aktivierung von ERK1/2 und STAT3 nachgewiesen, was zu einer Induktion der Proliferation und von Überlebenssignalen in der Zelle führen könnte. Eine Analyse von an der DNA-Reparatur oder Proliferation beteiligten Proteinen in diesem Teil der Arbeit zeigte teilweise eine Induktion von deren Expression. Für eine genauere Aussage, ob über die nachgewiesenen Ald-induzierten Schäden die DNA-Reparatur oder Proliferation aktiviert wurde und diese so zu einem Überleben beitragen, müsste dies noch weiter untersucht werden.

Zusammenfassend konnte in diesem Versuch systemischer oxidativer Stress und lokale ROS induzierte Schäden in der Niere unabhängig von der verwendeten Ald-Dosis nachgewiesen werden.

#### **5.1.4 Erhöhte Ald-Konzentrationen führen nicht zu einer vollständigen Aktivierung des Nrf2-Signalwegs**

ROS verursachen oxidative Schäden an wichtigen Makromolekülen der Zelle, wie der DNA, Proteinen oder Lipiden. Um sich vor oxidativen Schäden zu schützen hat die Zelle endogene Abwehrmechanismen entwickelt. Einer der wichtigsten ist hierbei der Nrf2-Signalweg. Nrf2 ist ein Transkriptionsfaktor, welcher als Hauptregulator der endogenen antioxidativen Abwehr gilt und die Expression von Genen der antioxidativen Batterie vermittelt. Die induzierten Proteine tragen zu einer Neutralisierung und Eliminierung der ROS bei und die Zelle wird geschützt, bzw. ihr Überleben wird gefördert [113].

Da nach der Ald-Infusion ROS induzierte Schäden systemisch und in der Niere, nachgewiesen werden konnten, wurde anschließend die Aktivierung des Nrf2-Signalwegs untersucht. Ald führte in den Mäusen tendenziell zu einem erhöhten Proteingehalt von Nrf2 in der Niere. Die immunhistochemische Färbung zeigte außerdem nur eine Anfärbung des

Cytosols und somit keine Translokation von Nrf2 in den Kern. In vorangegangenen Arbeiten konnte hingegen nach Ald oder Ang II-Infusion mit demselben Antikörper gegen Nrf2 eine signifikante Translokation von Nrf2 in den Zellkern immunhistochemisch nachgewiesen werden [76, 192]. Nrf2 wird unter physiologischen Bedingungen über Keap1 im Cytosol gehalten und degradiert. Bei einer Exposition gegenüber ROS oder Elektrophilen kommt es zu einer Konformationsänderung von Keap1 und Nrf2 wird nicht mehr abgebaut. So kann es zu einer Akkumulation, Stabilisierung und Translokation von Nrf2 kommen [115, 123]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Nrf2 über die PKC an Serin40 in Antwort auf oxidativen Stress phosphoryliert wird [125]. Diese Phosphorylierung trägt zu einer Stabilisierung, Akkumulierung und anschließender Translokation von Nrf2 in den Kern bei [171]. Aufgrund dessen wurde auch die Akkumulation und Translokation von pNrf2 in den Zellkern untersucht. Im Nierencortex der Ald-infundierten Mäuse konnte in allen Dosen ein signifikanter Anstieg an pNrf2 im Kern gezeigt werden. In der Medulla wurde eine tendenziell eine gesteigerte Akkumulation von pNrf2 im Kern sichtbar. Untersuchungen der Kern- und Cytosolfraktion der Nierenproteine zeigten eine Akkumulation von pNrf2, welche jedoch nur in der mittleren Dosis signifikant war.

Eine Analyse der Expression verschiedener Nrf2-Zielgene auf mRNA- und Proteinebene zeigte überraschenderweise keine Induktion ihrer Expression. Im Gegenteil war eher eine Inhibition sichtbar, die für drei von fünf Proteinen (NQO1, HO1 und GCLC) sogar signifikant war. In vorherigen Studien führte die nachgewiesene Nrf2-Akkumulation bisher immer zu einer erhöhten Expression von mindestens einem Nrf2-Zielgen [76, 192]. Jedoch reichte auch in diesen Studien die Nrf2-Aktivierung nicht aus, um vor den induzierten Schäden zu schützen. Es ist allerdings bekannt, dass Nrf2 und seine Zielgene in der Progression der CKD herunterreguliert sind [142, 193]. Zusätzlich konnte dies auch in Tiermodellen für CKD beobachtet werden [147]. Die Phosphorylierung und Translokation von Nrf2 in den Zellkern sind Hinweise für dessen Aktivierung. Das Ausbleiben der Induktion seiner Zielgene legt jedoch die Vermutung nahe, dass Nrf2 im Zellkern nicht als Transkriptionsfaktor funktionsfähig war. Für die Bindung von Nrf2 an seine Promotorsequenz ist eine Komplexbildung mit verschiedenen Proteinen notwendig [115]. So ist beispielsweise die Bildung eines Heterodimers mit sMaf essenziell für die Bindung an das ARE [127]. Allerdings können sMaf-Proteine auch Homo- oder Heterodimere miteinander oder mit anderen bZIP-Proteinen, wie Bach1, bilden, was die Transkription von ARE-regulierten Genen inhibiert [126, 131, 194]. Nguyen *et al.* konnten zeigen, dass eine Überexpression von MafK dosis-abhängig die Expression der ARE-abhängigen Katalase reprimiert [195]. Die Analyse der MafK-Proteinexpression in der Niere der Ald-infundierten Mäuse im Teil dieser Arbeit, zeigte jedoch nur eine tendenzielle Induktion in der niedrigen und mittleren Dosisgruppe. Ob die hier tendenziell höhere MafK Expression einen positiven oder

negativen Einfluss auf die Bindung von Nrf2 an das ARE hatte, kann jedoch nicht genau beurteilt werden. Für eine genauere Schlussfolgerung könnten beispielsweise noch die weiteren sMaf-Proteine MafF und MafG analysiert werden. Für Bach1 wurde in der Kernfraktion eine tendenziell geringere Akkumulation im Kern in diesen Dosisgruppen nachgewiesen. Eine geringere Bach1 Expression sollte daher durch seine Funktion Repressor eher einen positiven Einfluss, auf die Expression der Nrf2-Zielgene haben. GSK3 $\beta$  ist eine Kinase, welche Nrf2 ebenfalls phosphorylieren kann. Eine Phosphorylierung von Nrf2 über GSK3 $\beta$  führt zwar zu einer Stabilisierung von Nrf2, jedoch auch zu einer Degradation im Cytosol über  $\beta$ -TrCP [128, 130]. Weiterhin aktiviert GSK3 $\beta$  die Kinase Fyn, welche Nrf2 im Kern phosphoryliert, was wiederum zum Export von Nrf2 aus dem Kern führt [128]. Eine signifikant höhere Anwesenheit von GSK3 $\beta$  konnte in Ald-infundierten Mäusen der mittleren und hohen Dosis nachgewiesen werden. Immunhistochemisch waren die signifikanten Effekte auf den Cortex beschränkt. Die erhöhte GSK3 $\beta$ -Expression könnte ein weiterer Anhaltspunkt sein, warum es nicht zu einer gestiegenen Transkription der Nrf2-Zielgene kam, da GSK3 $\beta$  als Keap1-unabhängiger negativer Regulator, die Nrf2-Aktivität beeinflussen kann. Das Verhältnis zur phosphorylierten und damit inaktiven Form von GSK3 $\beta$  änderte sich in der Niere nach der Ald-Infusion jedoch nicht. Eine höhere Expression von GSK3 $\beta$  konnte auch in einem Folsäure-induzierten CKD-Modell in Mäusen nach vier Wochen beobachtet werden [196]. Dies ging einher mit erhöhtem oxidativem Stress in der Niere, jedoch niedrigerer Nrf2-Akkumulation im Zellkern und verminderter HO-1-Expression, was in diesem Teil der Arbeit nicht beobachtet werden konnte. Diese Studie konnte außerdem zeigen, dass nach initialer Schädigung der Niere der Nrf2-Signalweg aktiviert wurde, diese Aktivierung aber im Laufe der nächsten vier Wochen immer weiter abnahm, gepaart mit einer Zunahme der Proteinmenge von GSK3 $\beta$  [196]. Lu *et al.* konnten diese nach vier Wochen beschriebenen Effekte, auch an renalen Biopsien von CKD-Patienten zeigen. Die möglicherweise wichtige Rolle der GSK3 $\beta$  wird außerdem gestützt durch eine Studie, in der eine Inhibition von GSK3 $\beta$  vor Ald-induzierter Inflammation und Fibrose in der Niere und im Herzen schützen konnte [197].

Zusammenfassend konnte in diesem Teil der Arbeit gezeigt werden, dass eine Ald-Infusion zwar zu einer Translokation und Akkumulation von pNrf2 im Kern führte, jedoch nicht zu einer erhöhten Expression von Nrf2-Zielgenen und -proteinen, sondern tendenziell eher zu einer Inhibierung. Diese Beobachtung könnte über eine erhöhte Proteinmenge des negativen Nrf2-Regulators GSK3 $\beta$  erklärt werden (Abbildung 5.1).



Glomerulus maximal eine Verdopplung beobachtet werden. Weiterhin wurde in einer zweiten Doppelfärbung eine signifikante Akkumulation von pNrf2 in den Calbindin-positiven Zellen nachgewiesen. Da in diesen Zellen auch die höchste Quote an DNA-Schäden gezeigt wurde, stellte sich die Frage, ob die Akkumulation von pNrf2 im Zellkern nicht ausreichte, um vor den Ald-induzierten Schäden zu schützen oder Nrf2 nicht funktionsfähig war. Die unterschiedlich basale Verteilung von pNrf2 zeigte außerdem, dass die verschiedenen Zellarten in der Niere unterschiedliche antioxidative Kapazitäten besitzen könnten. Eine geringere basale Expression von Nrf2 im proximalen Tubulus im Vergleich zum distalen Tubulus konnte auch bereits in einer weiteren Studie an Mäusen demonstriert werden [200]. Eine Lokalisation der Nrf2-Zielproteine auf dem Nierengewebe über weitere Färbungen, könnte einen weiteren Hinweis auf die funktionelle Aktivität nach einer Schädigung, aber auch Aufschluss über die basale Nrf2-Aktivität und basale antioxidative Kapazität innerhalb der verschiedenen Nephronsegmente geben. Eine unterschiedliche basale antioxidative Kapazität konnte in Nieren von Ratten durch Gewinner *et al.* nachgewiesen werden [63]. Sie fanden eine höhere Expression und Aktivität von SOD, CAT und GPX in dem proximalen Tubulus im Vergleich zum Glomerulus. Dies ging einher mit einer erhöhten Anwesenheit an Superoxid-Anionen im Glomerulus [201]. Auch weitere Studien beschreiben eine unterschiedliche Verteilung von Komponenten des antioxidativen Abwehrsystems innerhalb der verschiedenen Nephronsegmente nach einer oxidativen Schädigung oder Verwendung von unterschiedlichen Stimulantien [202-205]. So konnte beispielsweise *in vitro* und *in vivo* beobachtet werden, dass Nierenzellen verschieden in einem Modell für diabetische Nephropathie auf den induzierten oxidativen Stress reagierten. Hier wurde eine verminderte Aktivität des Trx-basierten Systems im distalen Tubulus und Sammelrohr gezeigt [205].

Eine mögliche Erklärung für die ausbleibende Funktionalität von Nrf2 könnte außerdem die Verteilung von GSK3 $\beta$  auf dem Nierengewebe sein, da GSK3 $\beta$  zum größten Teil im Sammelrohr und distalen Tubulus vorzufinden war. Einen genaueren Aufschluss darüber könnte eine erneute Doppelfärbung von GSK3 $\beta$  zusammen mit den Nierenmarkern geben. Aufgrund der nachgewiesenen unterschiedlichen Reaktionen der Nierenzellen auf die Ald-Infusion sollte bei der Interpretation von Ergebnissen mit Isolaten aus der gesamten Niere, wie diese z.B. beim Western Blot oder bei der qPCR eingesetzt werden, immer berücksichtigt werden, dass die vielen verschiedenen Zellarten unterschiedlich auf Stimuli reagieren können und so Effekte über die Gesamtheit der Niere nicht mehr signifikant sind oder gar nicht mehr zu beobachten sind. Eine zusätzliche Durchführung immunhistochemischer Färbungen kann daher als Kontrolle für einen Ausschluss oder eine Bestätigung der unterschiedlichen Effekte genutzt werden.

Die bis hier diskutierten Ergebnisse zeigen, dass nicht nur die Interaktion mit Keap1 oder die Translokation in den Zellkern eine wichtige Rolle in der Regulation der antioxidativen Abwehr durch Nrf2 spielen, sondern auch die tatsächliche Funktionalität von Nrf2 als Transkriptionsfaktor. Auch die Notwendigkeit eines besseren Verständnisses der Nrf2-Effekte in Tiermodellen für Hypertonie oder CKD wird durch die Ergebnisse Dosisversuches verdeutlicht.

## **5.2 Relevanz einer Nrf2-Aktivierung in der Protektion vor Ald-induzierten Nierenschäden**

Im Dosisversuch der Arbeit konnte gezeigt werden, dass es in Antwort auf die Ald-induzierten Nierenschäden nicht zu einer vollständigen Aktivierung des Nrf2-Signalwegs kam, sondern eher zu einer Inhibierung. In den bisher von unserer Gruppe durchgeführten Arbeiten an Ald-infundierten Ratten [76], Ang II-infundierten Mäusen [192] und in kultivierten Nierenzellen [76] kam es dagegen immer zu einer Aktivierung des Nrf2-Signalweges. Jedoch konnte eine nachgewiesene Aktivierung nicht vor den Ald- und Ang II-induzierten Schäden schützen. Eine zusätzliche Behandlung mit dem Nrf2-Aktivator Sulf führte im hypertensiven Ald-Rattenmodell, zu einer verbesserten Nierenfunktion und Histopathologie [76]. Sulf ist ein Isothiocyanat und entsteht über Hydrolyse aus dem Senfölglykosid Glucoraphanin. Der Pflanzenstoff kommt vor allem in Kreuzblütengewächsen wie Brokkoli oder Kohl vor [206, 207]. Nach der Aufnahme von Sulf in die Zelle wirkt es als sekundäres Antioxidans, da es mit den Cysteinresten von Keap1 reagiert [207]. Dies führt, wie bereits beschrieben, zu einer Konformationsänderung von Keap1 und damit zu einer Stabilisierung und Akkumulation von Nrf2. Da oxidativer Stress an der Progression von Nierenschäden in der CKD [88] und Hypertonie [185] beteiligt ist und der Nrf2-Signalweg in CKD Patienten gehemmt ist [142, 193], ist ein besseres Verständnis über die Regulation von Nrf2 von großem Interesse.

Im weiterführenden Teil dieser Dissertation sollte herausgefunden werden, ob eine konstitutive genetische Nrf2-Aktivierung in der Niere ähnliche protektive Eigenschaften hat, wie sie für die pharmakologische Nrf2-Aktivierung durch Sulf in vorhergehenden Experimenten in Ratten gezeigt werden konnte. Hierfür wurden die transgenen Nrf2<sup>↑</sup>-Mäuse verwendet, die hypomorph für den Nrf2-Repressor Keap1 sind. Bei diesen Mäusen wird Keap1 basal geringer exprimiert und es kommt so zu einer konstitutiven Aktivierung von Nrf2 [156]. Diesen und WT-Mäusen wurden osmotische Minipumpen implantiert, die für 28 Tage 125 µg/kg x Tag Ald abgaben. Zusätzlich wurden wildtypische Ald-infundierte Mäuse mit Sulf behandelt um zu untersuchen, ob die Sulf-Behandlung auch in Mäusen zu einer Nrf2-Aktivierung führt und um die Effekte beider Ansätze zu vergleichen.

### 5.2.1 Eine geringere Keap1-Expression führt zu einer Aktivierung des Nrf2-Signalweges

Wie bereits im Dosisversuch gezeigt, führte die Ald-Infusion in WT-Mäusen nicht zu einer vollständigen Aktivierung des Nrf2-Signalweges. Daher wurde in diesem Protektionsversuch der Einfluss einer zusätzlichen Stimulierung des Nrf2-Signalweges untersucht. In vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe konnte zwar eine Nrf2-Aktivierung nach einer Ald- oder Ang II-Behandlung *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen werden, diese schützte jedoch nicht vor den induzierten Schäden [76, 192].

In Tabelle 5.1 sind für eine bessere Übersicht der folgend diskutierten Ergebnisse der zu Keap1 und Nrf2 durchgeführten Analysen zusammengefasst.

**Tabelle 5.1: Zusammenfassung der zu Keap1 und Nrf2 untersuchten Parameter in den Aldosteron-infundierten Wildtyp und Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen.** Dargestellt ist eine vereinfachte Zusammenfassung der Parameter. Dabei werden die Parameter immer mit den Werten der WT-K verglichen. Sind die Pfeile nicht umklammert, handelt es sich um signifikante Effekte. Bei umklammerten Pfeilen war der Effekt zu sehen, jedoch nicht signifikant. ↑: höhere Werte vs. WT-K, ↓: niedrigere Werte vs. WT-K., -: kein Effekt. Ald: Aldosteron, Keap1: Kelch-ähnliches ECH-assoziiertes Protein 1, Nrf2: *Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2*, Sulf: Sulforaphan, WT: Wildtyp.

Parameter	WT-K	WT-Sulf	WT-Ald	WT-Ald+Sulf	Nrf2 <sup>+</sup> -K	Nrf2 <sup>+</sup> -Ald
Keap1-Expression	-	(↓)	↓	(↓)	↓	↓
Nrf2-Expression	-	-	↑	↑	(↑)	↑
pNrf2-Akkumulation im Kern	-	-	↑	(↑)	(↑)	(↑)
Nrf2-Akkumulation im Kern	-	(↑)	(↑)	(↑)	(↑)	(↑)

Eine Untersuchung der Keap1-Expression in den Nieren der Nrf2<sup>+</sup>-Mäuse zeigte wie erwartet eine Reduktion um mehr als 50 %. Dies bestätigt den bereits in der Literatur für diesen Mausstamm beschriebenen *knockdown* von Keap1 (Keap1-KD) in der Niere und in weiteren untersuchten Organen [156, 208]. Der Keap1-KD entstand über die Insertion von LoxP-Stellen in das Keap1-Allel, durchgeführt von Okawa *et al.* [157]. Ziel dieser Studie war eine Entwicklung einer konditionalen Keap1-knockout-(Keap1-KO) Maus über das Cre-LoxP-System, um die embryonale Letalität eines vollständigen Keap1-KO zu umgehen. Die Insertion der LoxP-Stellen führte aber bereits zu einem Keap1-KD, der die Letalität umgehen konnte [156]. Als mögliche Erklärung für die bereits geringere Keap1-Expression diskutierten Taguchi *et al.* eine Insertion der LoxP-Stellen in den Promotorbereich des Keap1-Locus. Das Cre-LoxP-System ist eine weit verbreitete Methode für das Manipulieren von Genen in Säugetieren. Dieses System wird meist für die Exzision eines zu untersuchenden Gens verwendet. Die hier verwendete Cre-Rekombinase erkennt sich wiederholende LoxP-Stellen. Von LoxP-Stellen flankierte DNA (gefloxte DNA) wird dann von der Cre-Rekombinase herausgeschnitten. So können Gene inaktiviert und die Auswirkungen des Verlustes untersucht werden. Mit der Verknüpfung der Cre-Expression

an einen bestimmten Promotor kann außerdem eine Exzision nur in ausgewählten Zellen erfolgen. Bei der Verwendung des Systems *in vivo* wird ein Cre-Stamm mit dem Stamm gekreuzt, in dem das gewünschte Gen gefloxt ist [209].

Die Behandlung mit Sulf oder Ald führte zu einer geringeren Keap1-Proteinexpression in den WT-Mäusen, jedoch nicht im gleichen Umfang wie bei den Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen. Bei der Reaktion des Isothiocyanates Sulf mit Keap1 ist der Cysteinrest C151 in der BTB-Domäne von Keap1 von wichtiger Bedeutung. So verhindert eine Modifizierung an dieser Stelle eine Interaktion von Keap1 und Cullin3 und die Nrf2-Degradation wird unterbunden [210]. Zusätzlich zu C151 kann Sulf auch weitere Cysteinreste modifizieren, jedoch ist C151 das reaktivste Cystein in Bezug auf Sulf [211].

Rein hypothetisch sollte sowohl der Keap1-KD als auch eine Behandlung mit Sulf zu einer Stabilisierung und Akkumulation von Nrf2 führen. Bei der Analyse von Nierenprotein aus der gesamten Niere, zeigte sich ein tendenziell höherer Gehalt an Nrf2-Protein in den Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen im Vergleich zur WT-Kontrolle, während die mRNA-Expression sich nicht änderte, bzw. unter Ald-Infusion etwas abnahm. Dass die Gen-Expression in den Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen sich im Vergleich zum WT nicht unterscheidet, konnte auch schon von einer weiteren Arbeitsgruppe beobachtet werden [208]. Da jedoch die Keap1-Nrf2-Interaktion posttranslational Nrf2-reguliert, ist ein ausbleibender Effekt in der mRNA-Expression für die Aktivierung von Nrf2 nicht essenziell. In beiden Mausstämmen stieg die Nrf2-positive Fläche mit der Ald-Infusion. Sulf hingegen hatte keinen Einfluss auf die Anwesenheit von Nrf2 in der Niere. Demnach führte die Ald-Infusion zu einer Stabilisierung und Akkumulation von Nrf2.

Jedoch ist für die Funktion als Transkriptionsfaktor die Translokation in den Zellkern essenziell. Eine positive Färbung der Zellkerne konnte für Nrf2 auf dem Nierengewebe für keine Gruppe beobachtet werden. Im hypertensiven Ald-Rattenmodell hingegen konnten vermehrt Nrf2-positive Zellkerne auf dem Nierengewebe nach einer Ald-Infusion oder Sulf-Behandlung gezeigt werden [76]. Um dennoch Aufschluss über eine mögliche Änderung der Lokalisation von Nrf2 zu erhalten, wurde Nrf2 in der Kern- und Cytosolfraction untersucht. In der Kernfraction konnte ein tendenzieller Anstieg an Nrf2 in den WT-Mäusen nach Sulf und Ald beobachtet werden, dies zeigte sich auch in den Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen unabhängig von der Behandlung. Da bekannt ist, dass Nrf2 bei oxidativem Stress z.B. durch PKC phosphoryliert wird [125] und dies im Dosisversuch auch beobachtet werden konnte, wurde zusätzlich pNrf2 analysiert. Allerdings sollte bei der Interpretation der Ergebnisse beachtet werden, dass diese Phosphorylierung für eine Translokation in den Kern nicht essentiell ist [171]. Eine Inhibition der PKC führte jedoch unter Ald-Behandlung *in vitro* in proximalen Nierenzellen zu einer geringeren DNA-Bindung von Nrf2 [76]. Dies könnte jedoch auch auf eine andere Funktion der PKC hindeuten, sie ist für die Aktivierung und

Rekrutierung der NOX-Untereinheit p47phox notwendig und somit für den Ald-induzierten oxidativen Stress von Bedeutung, wird sie also inhibiert, könnte eine geringere Nrf2-Aktivierung auch auf geringeren oxidativen Stress hindeuten [46]. Der immunhistochemische Nachweis von pNrf2 zeigte, wie im Dosisversuch, eine Färbung primär im Zellkern. Weiterhin konnte erneut eine Translokation in den Zellkern nach Ald-Infusion in den WT-Mäusen nachgewiesen werden. Dies war ebenso tendenziell in den Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen zu sehen. Die Behandlung mit Sulf hatte keinen Einfluss auf die Lokalisation von pNrf2. Zusammenfassend konnte eine Translokation von Nrf2 oder pNrf2 in den Kern nach Ald-Infusion nachgewiesen werden. Auch führte die geringere Keap1-Expression zu einer Translokation in den Zellkern. Die Ald-Infusion in den transgenen Mäusen verstärkte tendenziell die Expression von Nrf2. Ein Einfluss von Sulf auf die Lokalisation von Nrf2 konnte nicht eindeutig gezeigt werden.

Die Untersuchung der Nrf2-Zielgene und Proteine zeigte keine Induktion ihrer Expression nach einer Ald-Infusion in WT-Mäusen, sondern eine tendenzielle oder sogar signifikante Inhibition und bestätigte somit erneut die Ergebnisse des Dosisversuches. Nur für GCLC war diesmal allerdings eine höhere Expression auf Proteinebene nachweisbar. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse zu den Untersuchungen der Nrf2-Zielgene und -proteine ist in Tabelle 5.2 dargestellt.

**Tabelle 5.2: Übersicht der untersuchten Nrf2-Zielgene und Proteine in den Aldosteron-infundierten Wildtyp und Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen.** Dargestellt ist eine vereinfachte Zusammenfassung der mRNA- und Protein-Expressionen. Dabei werden die Parameter immer mit den Werten der WT-K verglichen. Sind die Pfeile nicht umklammert, handelt es sich um signifikante Effekte. Bei umklammerten Pfeilen war der Effekt zu sehen, jedoch nicht signifikant. ↑: höhere Werte vs. WT-K, ↓: niedrigere Werte vs. WT-K., -: kein Effekt. Ald: Aldosteron, Gapdh: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, GCLC: Glutamat-Cysteinyltransferase katalytische Untereinheit, Gclm: Glutamat-Cysteinyltransferase regulatorische Untereinheit, Gpx1: Glutathionperoxidase 1, HO-1: Hämoxigenase 1, K: Kontrolle, NQO1: NAD(P)H-(Chinone) Dehydrogenase 1, Nrf2: *Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2*, Sod1: Superoxiddismutase 1, Sulf: Sulforaphan, TRXR1: Thioredoxinreduktase, WT: Wildtyp

Parameter	WT-K	WT-Sulf	WT-Ald	WT-Ald+Sulf	Nrf2 <sup>+</sup> -K	Nrf2 <sup>+</sup> -Ald
NQO1 Protein-Expression	-	-	↓	↓	↑	↑
<i>Nqo1</i> mRNA-Expression	-	-	↓	(↓)	↑	↑
TRXR1 Protein-Expression	-	-	-	-	(↑)	(↑)
<i>Trxr1</i> mRNA-Expression	-	-	(↓)	(↓)	(↑)	(↑)
HO-1 Protein-Expression	-	-	↓	↓	-	↓
<i>Ho-1</i> mRNA-Expression	-	-	(↓)	(↓)	(↓)	-
SOD1 Protein-Expression	-	-	-	-	-	-
<i>Sod1</i> mRNA-Expression	-	-	(↓)	(↓)	(↑)	-
GCLC Protein-Expression	-	-	(↑)	(↑)	-	(↑)
<i>Gclm</i> mRNA-Expression	-	-	(↓)	(↓)	(↓)	↓
<i>Gpx1</i> mRNA Expression]	-	(↓)	(↓)	-	-	(↓)

Die Sulf-Behandlung mit 5 mg/kg x Tag über vier Wochen nicht zu einer Aktivierung des Nrf2-Signalweges in der Niere. Eine Sulf-Behandlung mit 15 mg/kg x Tag führte hingegen in Ratten zu einer Translokation von Nrf2 [76], jedoch wurde die Expression von Nrf2-Zielgenen in dieser Ratten-Studie nicht weiter untersucht. Weiterhin steigerte die Kombinations-Behandlung mit Ald in den Ratten noch einmal die Translokation von Nrf2 in den Zellkern, auch dies war trotz höherer Dosis von 20 mg/kg x Tag in der Kombinations-Behandlung dieser Arbeit in den WT-Mäusen nicht zu sehen. Weiterhin konnte die zusätzliche Sulf-Behandlung die Verringerung der Nrf2-Aktivität induziert durch Ald nicht umkehren. Ein direkter Vergleich der in dieser Arbeit verwendeten Sulf-Konzentration mit anderen Studien ist im Folgenden oft nur teilweise möglich, da meist verschiedene Administrationswege verwendet wurden. Eine Fütterungsstudie in Ratten konnte jedoch zeigen, dass ca. 80 % des oral verabreichten Sulf bioverfügbar sind [212]. In WT-Mäusen war nach einer Behandlung mit 0,5 mg/kg Sulf (subkutan) über drei Monate ebenfalls keine Aktivierung des Nrf2-Signalweges sichtbar. Nur in diabetischen Mäusen führte die Sulf-Gabe zu einer erhöhten Expression der Nrf2-Zielgene verglichen mit der diabetischen Kontroll-Gruppe, in der die Nrf2-Aktivität basal niedriger war zur unbehandelten WT-Kontrolle [213]. Dies konnte auch im gleichen diabetischen Modell bei einer Gabe von 12,5 mg/kg Sulf (intraperitoneal) beobachtet werden [214]. Xin *et al.* konnten nach einer dreimonatigen Gabe von 0,5 mg/kg Sulf (subkutan) im Herz eine Induktion des Nrf2-Signalweges in WT-Mäusen nachweisen [215]. CDDO-Me und Bardoxolon-Imidazol (CDDO-Im) sind Nrf2-Aktivatoren, die ebenfalls mit den Cysteinresten von Keap1 reagieren und schon in klinischen Studien für die Behandlung von CKD Anwendung fanden [150, 151]. Während eine Ang II-Infusion in WT-Mäusen in der Studie von Rush *et al.* nicht zu einer Expression von *Nqo1* oder *Gstm1* (Glutathion-Transferase Mu 1) führte, war eine signifikante Induktion nach einer zusätzlichen Behandlung mit CDDO-Im sichtbar [216]. In einem Rattenmodell für CKD hingegen wurde ebenfalls eine verminderte Nrf2-Aktivität nachgewiesen. In dieser Studie wurde CDDO-Me zusätzlich in zwei verschiedenen Dosen (2 und 10 mg/kg) gegeben. Während die niedrigere Dosis die Nrf2-Aktivität induzierte, hatte die höhere Dosis keinen Effekt [217]. Das Ausbleiben der Nrf2-Aktivierung bei höheren Dosen von CDDO-Me der konnte in diabetischen Mäusen nicht beobachtet werden. In dieser Studie stieg die mRNA-Expression von *Gpx1*, *Gst* und *Noq1* bei Dosen von 10 und 20 mg/kg CDDO-Me [218]. Ein genaues Fazit, ob die in diesem Versuch verwendeten Konzentrationen von 5 und 20 mg/kg zu hoch oder zu niedrig waren, kann aus der Literaturrecherche nicht gezogen werden. Klar wird jedoch, dass die verwendeten Konzentrationen je nach Krankheitsmodell und Zielorgan unterschiedlich sein können. Der Keap1-KD hingegen führte in den Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen zu einer Aktivierung des Nrf2-Signalweges. So konnte für die Mäuse der Nrf2<sup>↑</sup>-Kontrolle eine signifikante Induktion von

NQO1 und eine tendenziell höhere Protein-Expression für TRXR1 und GCLC im Vergleich zur WT-Kontrolle beobachtet werden. Gleiches konnte für die mRNA-Expression von *Nqo1* und *Trxr1* gezeigt werden. Die Ald-Infusion in den Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen führte zu einer Steigerung der GCLC-Proteinmenge, jedoch auch zu einer geringeren mRNA-Expression von *Gclm* im Vergleich zur WT- K-Gruppe und einer geringeren HO-1-Proteinmenge im Vergleich zu den Kontrollen beider Mausstämmen. In weiteren Studien, in denen die Nrf2<sup>+</sup>-Mäuse verwendet wurden, konnte immer eine Induktion von NQO1 auf Protein- oder mRNA-Ebene gezeigt werden, was für eine dauerhafte Aktivierung des Nrf2-Signalweges in der Niere spricht [156, 208, 216, 219]. Weiterhin konnte in drei von diesen Studien eine Induktion der Genexpression von *Gstm1* beobachtet werden [208, 216, 219]. Eine Mikroarray-Analyse von Nezu *et al.* zeigte zusätzlich, dass die Gen-Expression der meisten Nrf2-Zielgene bereits basal erhöht ist, im Vergleich zu den WT-Mäusen, dazu zählten auch die in dieser Arbeit untersuchten Gene *Nqo1*, *Trxr1*, *Gclc* und *Ho1* [219]. Eine zusätzliche Behandlung der transgenen Mäuse mit dem Nrf2-Aktivator CDDO-Im führte zu einer noch höheren Expression der Zielgene *Nqo1* und *Gstm1* [216]. Jedoch muss bei der Interpretation der Nrf2-Zielgene immer in Betracht gezogen werden, dass diese auch von anderen Transkriptionsfaktoren reguliert werden können. So kann die *Ho-1*-Expression beispielsweise auch von den Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B, Aktivator-Protein 1 (AP-1) oder Mitgliedern der *Heat Shock Faktor*-Familie beeinflusst werden [220].

Weiterhin konnte im Dosisversuch gezeigt werden, dass die Zellen der Niere unterschiedlich auf eine Ald-Infusion reagieren. Die auch in diesem Teil der Arbeit durchgeführte Doppelfärbung mit pNrf2 zeigte dies ebenfalls für eine Beeinflussung der Nrf2-Aktivität über Sulf oder den Keap-KD. In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass der Keap1-KD bereits basal zu einer höheren Akkumulation von pNrf2 im distalen Tubulus und Sammelrohr, nicht aber im proximalen Tubulus oder Glomerulus. Dies konnte auch tendenziell für Sulf gezeigt werden. Da in dieser Arbeit und in den zitierten Studien [156, 208, 216, 219] immer nur die RNA oder Proteine aus der gesamten Niere analysiert wurden, könnten Effekte einzelner Zellen, wie bereits in 5.1.4 diskutiert, verloren gehen. Dass der Keap1-KD in Organen einen unterschiedlichen Einfluss auf die Keap1- und NQO1-Expression hat zeigten bereits Taguchi *et al.*, während im Gehirn die Keap1-Expression auf 22 % im Vergleich zu den WT- Mäusen sank, sank die Keap1-Expression in der Lunge nur auf 44 % [156].

Auch wird die Aktivität von Nrf2, wie bereits in 1.7.1 aufgeführt, nicht nur von Keap1, sondern weiteren Faktoren beeinflusst. Die im folgenden diskutierten Ergebnisse der Keap1-unabhängigen Nrf2-Regulation sind in Tabelle 5.3 zu einer Übersicht zusammengefasst.

**Tabelle 5.3: Zusammenfassung der zur Keap1-unabhängigen Regulation von Nrf2 untersuchten Parameter in den Aldosteron-infundierten Wildtyp und Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen.** Dargestellt ist eine vereinfachte Zusammenfassung der Parameter. Dabei werden die Parameter immer mit den Werten der WT-K verglichen. Sind die Pfeile nicht umklammert, handelt es sich um signifikante Effekte. Bei umklammerten Pfeilen war der Effekt zu sehen, jedoch nicht signifikant. ↑: höhere Werte vs. WT-K, ↓: niedrigere Werte vs. WT-K., -: kein Effekt. Ald: Aldosteron, Bach1: *BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 1*, GSK3β: Glykogensynthase-Kinase 3β, Nrf2: *Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2*, Sulf: Sulforaphan, WT: Wildtyp.

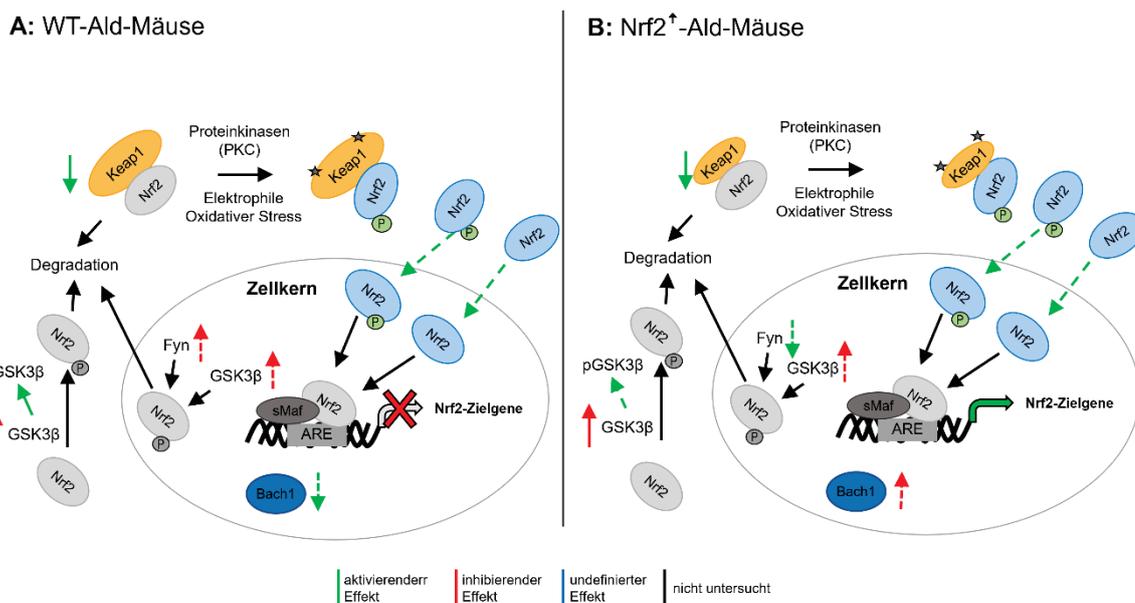
Parameter	WT-K	WT-Sulf	WT-Ald	WT-Ald+Sulf	Nrf2 <sup>+</sup> -K	Nrf2 <sup>+</sup> -Ald
Bach1-Akkumulation im Kern	-	-	(↓)	-	(↑)	(↑)
pGSK3β/GSK3β	-	-	↑	↑	(↑)	(↑)
GSK3β-Akkumulation im Kern	-	(↑)	(↑)	(↑)	(↑)	(↑)
Fyn-Akkumulation im Kern	-	-	-	(↑)	↓	(↓)

Eine weiterführende Analyse von Proteinen, welche an der Keap1-unabhängigen Nrf2-Regulation beteiligt sind, zeigte für den Repressor Bach1 in den Ald-infundierten WT-Mäusen eine tendenziell geringere Akkumulation im Kern und in den Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen unabhängig von der Ald-Infusion eine tendenziell höhere Akkumulation im Kern. Jyrkkanen *et al.* konnten *in vitro* zeigen, dass eine Nrf2-Überexpression oder eine Induktion mit Nrf2-Aktivatoren zu einer gesteigerten Expression von Bach1 führen kann. Diese Induktion erfolgt über Nrf2 selbst, da im Bach1-Promotor ein ARE nachgewiesen werden konnte [221]. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die erhöhte Bach1-Akkumulation bei der Sulf-Behandlung und in den transgenen Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen sein. Weiterhin inhibiert Bach1 nicht die Transkription aller Nrf2-Zielgene, so ist die Transkription von *Trxr1 in vitro* in humanen Keratinozyten über Nrf2, aber nicht Bach1 reguliert, während für die Induktion von *Ho1* der Export von Bach1 aus dem Kern notwendig ist [222]. Zusätzlich wird die Aktivität von Bach1 über die Häm-Konzentration in der Zelle reguliert. So hemmen hohe Häm-Konzentrationen die Bindung von Bach1 an die DNA und fördern seinen nukleären Export und die Degradation [223, 224]. Dies führt zu einer Expression von HO1 und somit auch einem Abbau von Häm zu Eisen, CO und Biliverdin [136]. Die Bach1/HO1-Achse trägt so zu einer Häm-Homöostase während oxidativem Stress bei [223, 224]. Eine niedrige Häm-Konzentration könnte also auch zu einer niedrigen HO1-Expression in den Ald-infundierten Mäusen geführt haben.

Wie bereits in 5.1.5 diskutiert konnte in einem *in vivo*-Modell für CKD eine mögliche Rolle von GSK3β in der Inhibierung des Nrf2-Signalweges während der Progression der CKD nachgewiesen werden [196]. Während tendenziell erhöhte Anwesenheit von GSK3β im Kern in den WT-Gruppen mit dem Ausbleiben eines Effektes oder einer Inhibition der Nrf2-Zielgenexpression einherging (außer für GCLC), war in den Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen trotz signifikant geringerer Fyn-Akkumulation im Kern eine Induktion einiger Nrf2-Zielgene und -proteine zu sehen. Dies könnte die induzierte Expression der Nrf2-Zielgene in diesem transgenen

Mausstamm erklären, da weniger Nrf2 im Kern über Fyn phosphoryliert und anschließend aus dem Kern exportiert wird. Weiterhin könnte die induzierte Expression der Nrf2-Zielgene mit dem Keap1-KD in den Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen erklärt werden. Nrf2 wird kontinuierlich exprimiert und über den durch den Keap1-KD verringerten Nrf2-Abbau kann basal mehr Nrf2 in den Zellkern translozieren. In den WT-Mäusen kann die Nrf2-Aktivität im Zellkern vermutlich noch über vermehrte Anwesenheit von GSK3 $\beta$ , Fyn oder Bach1 ausgeglichen oder inhibiert werden, in den Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen jedoch nicht. Weiterhin war eine signifikant gesteigerte Phosphorylierung von GSK3 $\beta$  in Ald-infundierten WT-Mäusen nachweisbar, welche nicht mit einer gesteigerten Expression von GSK3 $\beta$  einher ging. Der Effekt wurde durch zusätzliche Behandlung mit Sulf weiter verstärkt. Eine Inaktivierung von GSK3 $\beta$  über seine Phosphorylierung konnte auch in Herzen von Sulf-behandelten Mäuse beobachtet werden [215] und ebenso konnte in diabetischen Ratten gezeigt werden, dass Sulf einen negativen Einfluss auf die GSK3 $\beta$ -Aktivität hat [225]. Wie auch in dieser Arbeit war dieser Effekt nur in geschädigten (diabetischen) Gruppen und nicht in den Kontrollen zu sehen. Allerdings führte die verwendete Menge an 5 mg/kg Sulf (interperitoneal) über drei Monate zu einer Aktivierung des Nrf2-Signalweges. Dies zeigt, dass Sulf nicht nur einen Einfluss auf die Keap1-Nrf2 Interaktion hat, sondern auch die Nrf2-Regulation über die Deaktivierung der Kinase GSK3 $\beta$  beeinflussen kann. Die Ergebnisse und Literaturrecherche zeigen, dass die Nrf2-Regulation je nach Tiermodell, Gewebe und Stimulus ein anderes Muster aufweisen kann und unterstreicht die Komplexität dieses Systems.

Eine Zusammenfassung der in diesem Versuch nachgewiesenen Effekte in Bezug auf die Nrf2-Regulation für die Ald-infundierten WT-Mäuse und Nrf2<sup>↑</sup>-Mäuse ist in Abbildung 5.2 schematisch dargestellt. Weiterhin konnte auch im zweiten Tierexperiment gezeigt werden, dass eine Ald-Infusion in WT-Mäusen nicht zu einer vollständigen Aktivierung des Nrf2-Signalweges führte. Weiterhin hatte Sulf keinen Einfluss auf die Expression Nrf2-regulierter Gene, sowohl in gesunden als auch in geschädigten WT-Mäusen, wobei ein Effekt auf einzelne Zelltypen der Niere nicht ausgeschlossen werden kann. Ein Keap1-KD hingegen führt wie erwartet zu einer Aktivierung des Nrf2-Signalweges.



**Abbildung 5.2: Einfluss der Aldosteron-Infusion auf den Nrf2-Signalweg in Wildtyp-Mäusen und transgenen Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen.** Schematisch dargestellt jeweils die Nrf2-Regulation. Untersuchte Effekte in Bezug auf die Nrf2-Regulation sind in Farbe dargestellt, im Vergleich zu der WT-Kontroll-Gruppe. Durchgehende Pfeile: signifikanter Effekt, gestrichelte Pfeile: tendenzieller Effekt, grüner Pfeil: Aktivierend auf die Aktivität des Nrf2-Signalweges, roter Pfeil: Inhibierend auf die Aktivität des Nrf2-Signalweges, blauer Pfeil: Undefinierter Effekt. **A:** Einfluss einer Ald-Infusion in den Wildtyp-Mäusen auf Bestandteile des Nrf2-Signalweges. **B:** Einfluss einer Ald-Infusion auf Bestandteile des Nrf2-Signalweges in Keap1 hypomorphen Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen. Die Infusion von Ald führte in beiden Stämmen zu einer geringeren Expression von Keap1, einer vermehrten Akkumulation von Nrf2 im Cytosol, sowie einer Phosphorylierung von Nrf2 an Serin40 (pNrf2). Weiterhin konnte tendenziell eine Translokation und Akkumulation von Nrf2 und pNrf2 in den Zellkern nachgewiesen werden. Während in den WT-Mäusen für die Nrf2-Zielgene eine Inhibierung beobachtet wurde, nahm die Expression der nrf2-Zielgene in den Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen zu. Weitere Untersuchungen zeigten für Bach1 in den WT-Mäusen eine tendenziell geringere, für die Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen eine tendenziell höhere Akkumulation im Kern. Für die negativen Nrf2-Regulatoren GSK3β und Fyn konnte in den WT-Mäusen eine tendenziell höhere Anwesenheit im Zellkern gezeigt werden. In den Ald-infundierten Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen hingegen, wurde eine höhere Anwesenheit von Fyn im Kern beobachtet. Ebenso führte die Ald-Behandlung in den transgenen Stämmen zu einer gesteigerten Anwesenheit an GSK3β und seiner an Serin 9 phosphorylierten und somit inaktiven Form (pGSK3β). ARE: Antioxidatives Response-Element, Bach1: *basic leucine zipper transcription factor 1*, GSK3β: Glykogensynthase-Kinase 3β, Keap1: Kelch-ähnliches ECH-assoziiertes Protein 1, Keap1-KD: Keap1-knockdown, Nrf2: *Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2*, PKC: Proteinkinase C, sMaf: *small Musculoaponeurotic fibrosarcoma*. Adaptiert nach Tonelli *et al.* [115] und Kaspar *et al.* [113].

### 5.2.2 Eine konstitutive Nrf2-Aktivierung verhindert Ald-induzierte Änderungen des Blutdrucks

In diesem Kapitel wird der Einfluss des Nrf2-Status auf die Ald-induzierten Änderungen des Blutdrucks diskutiert. Für eine bessere Übersicht, der in diesem Kapitel diskutierten Ergebnisse, sind diese in Tabelle 5.4 zusammengefasst.

**Tabelle 5.4: Zusammenfassung der im Kapitel 5.2.2 diskutierten Parameter in den Aldosteron-infundierten Wildtyp und Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen.** Dargestellt ist eine vereinfachte Zusammenfassung der untersuchten Parameter. Dabei werden die Parameter immer mit den Werten der WT-K verglichen. Sind die Pfeile nicht umklammert, handelt es sich um signifikante Effekte. Bei umklammerten Pfeilen war der Effekt zu sehen, jedoch nicht signifikant. ↑: höhere Werte vs. WT-K, ↓: niedrigere Werte vs. WT-K., -: kein Effekt. αENaC: α-Untereinheit des epithelialen Natriumkanals, Ald: Aldosteron, K: Kontrolle, Nrf2: *Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2*, Sulf: Sulforaphan, WT: Wildtyp.

Parameter	WT-K	WT-Sulf	WT-Ald	WT-Ald+Sulf	Nrf2 <sup>+</sup> -K	Nrf2 <sup>+</sup> -Ald
Blutdruck	-	-	↑	(↑)	-	-
Ald-Konzentration im Plasma	-	-	↑	↑	-	↑
αENaC-Expression	-	-	↑	(↑)	↓	-

Die Ald-Infusion von 125 µg/kg x Tag führte in WT-Mäusen nicht zu einer konstanten Hypertonie. Zu Beginn des Protektionsversuches stieg der systolische Blutdruck und war am siebten und fünfzehnten Messtag signifikant zur WT-Kontrolle. Danach fand wie auch im Dosisversuch ein Adaptionsprozess statt. Während eine Behandlung mit Sulf alleine wie erwartet nicht zu einer Veränderung des Blutdrucks führte, entwickelten die Ald-infundierten und mit Sulf behandelten WT-Mäuse zwar einen tendenziell höheren systolischen Blutdruck, dieser war aber zu keinem Messzeitpunkt signifikant gegenüber der WT-Kontrolle. In einer vorangegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe konnte die zusätzliche Behandlung mit Sulf die Ald-verursachte Hypertonie in Ratten allerdings vollständig verhindern [76]. Auch in SHR (spontan hypertensiven Ratten) führte Sulf zu einer Verminderung des Bluthochdrucks [226, 227]. Der systolische Blutdruck der Nrf2<sup>+</sup>-K-Mäuse war mit dem der WT-K-Gruppe vergleichbar. Die Infusion von Ald beeinflusste den systolischen Blutdruck nicht und führte demnach zu keinem Zeitpunkt zu einer Hypertonie in den Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen. In einer Versuchsreihe von Rush *et al.* hingegen führte eine Infusion von Ang II zu Hypertonie in diesem Mausstamm, dabei stieg der systolische Blutdruck sogar im Vergleich zu Ang II-infundierten WT-Mäusen in der Nacht noch stärker [216]. Weiterhin zeigten deren Nrf2<sup>+</sup>-Mäuse tagsüber bereits basal einen höheren systolischen Blutdruck. Dies konnte in diesem Versuch nicht beobachtet werden. Im Gegenteil, an sechs von sieben Messzeitpunkten war der systolische Blutdruck der Nrf2<sup>+</sup>-K-Mäuse unter dem der WT-K-Mäuse. In der Studie von Rush *et al.* erfolgte die Messung des Blutdrucks mittels Telemetrie [216], welche die bessere und zuverlässigere Messmethode ist [228]. Jedoch wurden im Versuchsverlauf keine nicht mit Ang II-infundierten Kontrolltiere, weder bei den

transgenen noch bei den WT-Mäusen, mitgeführt. Die durch Ang II ausgelöste Hypertonie zeichnet sich durch das Zusammenspiel von Ang II- und Ald-vermittelten Effekten aus, da die Bindung von Ang II an seinen Rezeptor AT1R zum einen zu einer Vasokonstriktion führt aber auch zu einer zusätzlichen Ald-Ausschüttung [20, 21]. Weiterhin zeigt die Studie von Rush *et al.*, dass für eine Induktion von Hypertonie in diesem transgenen Mausstamm, die Ang II ausgelösten Effekte und AT1R essenziell sein könnten [216].

Die Messung der Plasmakonzentration von Ald zeigte in allen Ald-behandelten Mäusen einen erhöhten Ald-Spiegel, was die Schlussfolgerung zulässt, dass die osmotischen Minipumpen bis zum Ende der 28-tägigen Behandlung funktionsfähig waren. Die Ald-Infusion führte in den WT-Mäusen, wie auch schon im Dosisversuch zu einer erhöhten Expression des klassischen Ald-Zielgens  $\alpha\text{ENaC}$ . Die zusätzliche Behandlung mit Sulf minderte die Ald-induzierte Expression nicht. ENaC reguliert den  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ - und  $\text{H}_2\text{O}$ -Transport in den epithelialen Zellen des distalen Tubulus und Sammelrohes und eine gesteigerte Expression ist mit einer erhöhten Natrium Resorption, Kalium-Ausscheidung und daraus resultierenden Wasseraufnahme verbunden. Die erhöhte Wasseraufnahme führt zu einer Erhöhung des Blutvolumens und damit auch zu einer Erhöhung des Blutdrucks [33]. Die nachgewiesene geringere  $\alpha\text{ENaC}$ -Expression könnte die ausbleibende Hypertonie in Ald-exponierten  $\text{Nrf2}^{\uparrow}$ -Mäusen erklären, da es nicht zu einer ENaC-induzierten Erhöhung des Blutvolumens kam. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass in den  $\text{Nrf2}^{\uparrow}$ -Mäusen eine Ald-Infusion nicht zu einer Induktion der Ald-regulierten Gene führte. Da die MR-Expression nur leicht verändert war, ist dies wahrscheinlich nicht der hauptsächliche Grund für das Ausbleiben der Induktion. Jedoch ist die Aktivität von MR als Transkriptionsfaktor auch durch Ko-Aktivatoren und Ko-Repressoren beeinflusst [229]. Im hypertensiven Ratten-Modell verhinderte eine zusätzliche Gabe von Sulf die Ald-induzierte Hypertonie [76] und auch in den WT-Mäusen führte die Kombinationsbehandlung zu keinem Zeitpunkt zu einem signifikant höheren Bluthochdruck. Grund hierfür könnte eine verbesserte Funktion der vaskulären Muskulatur über die Verminderung des oxidativen Stresses sein, da diese auch von den ROS beeinträchtigt wird [230]. Jedoch führte in dieser Arbeit weder der Keap1-KD noch die Sulf-Behandlung zu einer Reduzierung des systemischen oxidativen Stresses. Die Ergebnisse dieser Arbeit und der Arbeiten in anderen hypertensiven Tiermodellen lässt vermuten, dass der Keap1-KD oder eine  $\text{Nrf2}$ -Aktivierung einen Einfluss auf die Bildung des Ald/MR-Komplexes, die Translokation oder Funktion als Transkriptionsfaktor hat. Der genaue Mechanismus ist jedoch bisher nicht bekannt.

### 5.2.3 Eine konstitutive Nrf2-Aktivierung schützt vor Ald-induzierten Schäden nur in den Nierentubuli

Wie erwartet führte die Ald-Infusion in den WT-Mäusen zu einer moderaten Nierenschädigung und Veränderungen in der Histopathologie, sowohl in Bezug auf die glomeruläre als auch auf die tubuläre Schädigung. Somit konnten die Ergebnisse des Dosisversuches bezüglich dieser untersuchten Parameter reproduziert werden. Die in Bezug auf die Nierenfunktion und - histologie diskutierten Ergebnisse sind in Tabelle 5.5 zusammengefasst.

**Tabelle 5.5: Übersicht der für die Beurteilung der Nierenschädigung analysierten Parameter.** Dargestellt ist eine vereinfachte Zusammenfassung der untersuchten Parameter. Dabei werden die Parameter immer mit den Werten der WT-K verglichen. Sind die Pfeile nicht umklammert, handelt es sich um signifikante Effekte. Bei umklammerten Pfeilen war der Effekt zu sehen, jedoch nicht signifikant. ↑: höhere Werte vs. WT-K, ↓: niedrigere Werte vs. WT-K., -: kein Effekt. Die NGAL/Kreatinin-Ratio und die KIM-1/Kreatinin-Ratio sind als Marker für tubuläre Schäden zusammengefasst. Bei dem Parameter Hydronephrose wurden die Mäuse in den entsprechenden Gruppen gezählt, bei denen es zu Hydronephrose kam. n = 8. Ald: Aldosteron, GSI: Glomeruloskleroseinde KIM-1: *Kidney Injury Molecule-1*, K: Kontrolle, MSI: Mesangiolyseindex, NGAL: Neutrophilengelatinase-assoziiertes Lipocalin, Nrf2: *Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2*, Sulf: Sulforaphan, TSI: Tubulointerstitieller Schädigungsindex, WT: Wildtyp.

Parameter	WT-K	WT-Sulf	WT-Ald	WT-Ald+Sulf	Nrf2 <sup>↑</sup> -K	Nrf2 <sup>↑</sup> -Ald
Nierengewicht	-	-	↑	↑	↑	↑↑
Hydronephrose	0/8	0/8	0/8	0/8	2/8	4/8
Trink- und Urinmenge	-	-	↑	↑	-	↑
Kreatinin-Clearance	-	↓	-	-	(↓)	(↓)
Albumin/Kreatinin-Ratio	-	-	↑	↑	-	↑
Marker für tubuläre Schäden	-	-	↑	↑	-	-
TSI	-	-	↑	↑	-	-
MSI/GSI	-/-	-/↑	↑/↑	-/↑	-/↑	-/↑

Obwohl die Nrf2<sup>↑</sup>-Mäuse durch die konstitutive Nrf2-Aktivierung vor der Ald-induzierten Hypertonie geschützt wurden, zeigten die Tiere bereits basal Veränderungen in der Niere. So war eine erhöhte Anzahl an Hydronephrose und ein erhöhtes Nierengewicht, in der Nrf2<sup>↑</sup>-K-Gruppe im Vergleich zu der WT-K-Gruppe sichtbar. Dies verstärkte sich unter der Infusion von Ald noch einmal deutlich. In bisherigen Studien mit diesem transgenen Mausstamm in denen auch die Niere untersucht wurde, wurde bisher nicht von dieser Beobachtung berichtet [156, 208, 216, 219, 231]. Da die Hydronephrose, jedoch auch bei den unbehandelten Mäusen auftraten, ist die Hydronephrose vermutlich ein direkter Effekt des Keap1-KD. Bei einer Hydronephrose ist der Abfluss von Urin gestört und staut sich im Nierenbeckenbereich, welcher sich daraufhin stark ausdehnt und das umliegende Gewebe unter der Belastung zerstören kann. Ursachen für einen Nierenstau können beispielsweise Verengungen der Harnleiter, Herzinsuffizienz oder Harnsteine sein [232, 233].

Infolgedessen kommt es zu einer Verminderung der GFR, erhöhtem interstitiellen Druck in der Niere und einer Verminderung der Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen. Eine erhöhte H<sub>2</sub>O und Na<sup>+</sup>-Aufnahme, sowie Aktivierung des RAAS, können zusätzlich zu einer Bildung der Stauniere beitragen [233]. Dies erklärt auch die höhere Inzidenz an Hydronephrose nach salzigem Trinkwasser und Ald-Infusion. Trotz des ausbleibenden Bluthochdrucks tranken die Nrf2<sup>↑</sup>-Ald-Mäuse tendenziell sogar mehr als die Mäuse der WT-Ald oder WT-Ald+Sulf-Gruppe.

Dass eine dauerhafte Nrf2-Aktivierung negative Effekte hervorrufen kann, zeigte bereits die vollständige Deletion des Inhibitors Keap1 in Mäusen. So sterben Keap1-defiziente Mäuse infolge einer Hyperkeratose in der Speiseröhre und im Vormagen kurz nach der Geburt an Mangelernährung [234]. Weiterhin kommen Mutationen im *Nrf2*- oder *Keap1*-Gen in Krebszellen häufiger vor, welche zu einer Aktivierung des Nrf2-Signalweges führen, da dieser Signalweg das Überleben der Zelle sichert und ihre Proliferation begünstigt [235, 236]. In Studien des hier verwendeten Mausstammes Nrf2<sup>↑</sup>, wurden zunächst positive Effekte beobachtet, welche auf den hypomorphen Keap1-KD zurückgeführt werden können. Mäuse dieses Stammes zeigten im Gegensatz zu den Keap1-KO-Mäusen keine Wachstums- oder Entwicklungsstörungen [156]. Weiterhin waren sie vor tubulären Schäden nach einer akuten Nierenverletzung über Reperfusion oder einseitiger Harnleiterobstruktion geschützt [208, 219]. Auch in diesem Versuch wurden die Nrf2<sup>↑</sup>-Mäuse vor Ald-induzierten tubulären Schäden geschützt. Im Gegensatz zu der Situation der WT-Mäuse stieg in den Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen nach der Ald-Infusion keiner der Marker für tubuläre Schäden (NGAL oder KIM-1) signifikant zur Nrf2<sup>↑</sup>-K an und auch auf den TSI hatte die Ald-Infusion keinen Einfluss. Sulf hingegen konnte vor den Ald-induzierten tubulären Schäden nicht schützen. Hier stieg das KIM-1 und NGAL/Kreatinin-Verhältnis im Sammelurin und der TSI im Nierencortex nur geringfügig weniger an als in den Ald-infundierten WT-Mäusen. Im Kontrast dazu konnte in einer 5-wöchigen Studie mit CDDO-Im an einem transgenen Mausmodell gezeigt werden, dass die Behandlung vor Ald-induzierten tubulären Schäden schützen kann [237]. Dies konnte auch für CDDO-Im in zwei tierexperimentellen Studien an WT-Mäusen nach akuter Nierenverletzung beobachtet werden [110, 238]. Jedoch wurde hier CDDO-Im nur einmalig oder über einen Zeitraum von zwei Wochen verabreicht. Eine 5-wöchige Verabreichung von Curcumin in einem Adenin-induzierten Rattenmodell für CKD konnte die tubulären Schäden nur partiell verhindern [147]. Mit dem TSI wird über die HE-Färbung auch eine Entzündung im Nierencortex über die Infiltration von Immunzellen in das Interstitium beurteilt. Während die Ald-Infusion in den WT-Mäusen zu einer erhöhten Infiltration führte, war dies in den infundierten Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen nicht zu beobachten. Die Anwesenheit oder Expression von proinflammatorischen Zytokinen wurde in diesem Teil der Arbeit nicht untersucht. Nach einer akuten

Nierenverletzung über Reperfusion war die Expression dieser jedoch in Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen signifikant geringer gegenüber den ebenfalls verletzten WT-Mäusen [208].

In den Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen trat bereits basal eine geringere Kreatinin-Clearance auf, die auch in den mit Sulf behandelten WT-Mäusen zu sehen war. Eine Veränderung im GFR konnte hingegen von einer anderen Arbeitsgruppe in den transgenen Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen nicht beobachtet werden [216]. Die Kreatinin-Clearance normalisierte sich jedoch in der Kombinationsbehandlung mit Ald wieder auf das Niveau der WT-Kontrolle. Die Sulf-Behandlung in den WT-Mäusen scheint also trotz ausbleibender Beeinflussung der Nrf2-Aktivität Auswirkungen auf die Funktion der Niere zu haben. Eine geringere Kreatinin-Clearance konnte hingegen in Sulf-behandelten Ratten nicht beobachtet werden [76].

Zusätzlich konnte in den Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen bereits basal verstärkt Glomerulosklerose beobachtet werden, welche auch in den WT-Sulf-Mäusen sichtbar war und sich unter Ald-Infusion noch weiter verstärkte. Ebenso stieg nach einer Ald-Behandlung das Albumin zu Kreatinin-Verhältnis und der MSI in den Nrf2<sup>↑</sup>-Ald-Mäusen im Vergleich zur Nrf2<sup>↑</sup>-Kontrolle. Dies zeigt, dass weder Sulf noch der Keap1-KD vor Ald-induzierten glomerulären Schäden schützen konnten. Die Lokalisation von pNrf2 zeigte nur eine Akkumulation in den Zellkernen des distalen Tubulus oder des Sammelrohres bei einer Behandlung mit Sulf, Ald oder einem Keap1-KD, nicht aber im proximalen Tubulus oder in den Glomeruli. Eine ausbleibende Aktivierung des Nrf2-Signalweges in den Glomeruli könnte eine Erklärung für die ausbleibende Protektion sein. Weiterhin zeigte eine genauere Betrachtung der immunhistochemischen Färbungen von Nrf2 und NQO1 kaum eine positive Färbung der Glomeruli. Für eine genauere Schlussfolgerung sollten jedoch weitere Doppelfärbungen durchgeführt werden. Wie bereits in 5.1.2 diskutiert konnte nicht nur in dieser Arbeit die Schädigung der Glomeruli, nach der Ald-Infusion nachgewiesen werden, sondern bereits auch in weiteren Studien [77, 169, 180]. Ein Ausbleiben der Nrf2-Aktivierung könnte so die Empfindlichkeit der Glomeruli gegenüber dem Ald-induzierten oxidativen Stress erklären.

Die im Nrf2<sup>↑</sup>-Stamm und in den Sulf-behandelten WT-Mäusen aufgetretenen geringere Kreatinin-Clearance und der gesteigerte GSI zeigen jedoch, dass auch bereits basal eine Schädigung der Glomeruli und Filtrationsbarriere vorlag. In vorangegangenen Arbeiten konnte dies in einem hypertensiven Ald-Rattenmodell nicht beobachtet werden. Hier hatte eine zusätzliche Sulf-Behandlung einen positiven Effekt und normalisierte die Kreatinin-Clearance, die Albumin-Exkretion, sowie den GSI und den MSI [76]. Auch in einem Modell für diabetische Nephropathie konnte eine Gabe von Sulf nach drei Monaten die Morphologie der Glomeruli und das Albumin/Kreatinin-Verhältnis verbessern [239]. Dies wurde auch in Ratten mit durch Adenin-induzierter CKD mit zusätzlicher Gabe des Nrf2-Aktivators Curcumin beobachtet [147]. Rush *et al.* hingegen konnten zeigen, dass die Nrf2<sup>↑</sup>-Mäuse in drei verschiedenen Modellen für Nierenschädigung empfindlicher

gegenüber glomerulären Schäden und Proteinurie waren als WT-Mäuse. Auch manifestierte sich der Schaden über interstitielle Fibrose. In Nrf2-KO-Mäusen blieben diese Schäden jedoch nach Ang II-Infusion aus, was die entscheidende Rolle von Nrf2 in der Sensitivität gegenüber glomerulären Schäden bestätigt [216]. Weiterhin konnte in dieser Studie über einen Verlust der Podozytenfortsätze und der Podozytenmarker Wilms-Tumor-Protein 1 und Nephrin gezeigt werden, dass es in den Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen vermehrt zu einer Schädigung der Podozyten kommt. Dieser Effekt verstärkte sich noch einmal unter der zusätzlichen Behandlung mit CDDO-Im. Die genannten Studien und diese Arbeit zeigen, dass der protektive Einfluss eines Keap1-KD und somit einer konstitutiven Nrf2-Aktivierung auch vom Krankheitsmodell für AKI, CKD oder Hypertonie abhängen kann.

In klinischen Studien mit dem Nrf2-Aktivator CDDO-Me konnten sowohl negative als auch positive Effekte beobachtet werden. So verbesserte sich zwar in diabetischen Patienten mit CKD unter der Gabe von CDDO-Me die GFR, das Albumin/Kreatinin-Verhältnis nahm jedoch zu [149-151]. Da das gesteigerte Albumin/Kreatinin-Verhältnis für eine weitere Progression der CKD spricht, haben diese Studien nicht nur das Primärziel, die Verbesserung oder das Aufhalten der CKD nicht erfüllt, zusätzlich musste auch eine Phase 3 Studie zu CDDO-Me wegen auftretender Fälle von Herzversagen abgebrochen werden. Eine nachträglich Analyse der Risikofaktoren zeigte, dass Patienten die bereits vor der Studie wegen Herzinsuffizienz hospitalisiert wurden oder einen erhöhten BNP-Wert (*Brain natriuretic peptide*) im Blut aufwiesen, während der Behandlung mit CDDO-Me ein 50 % höheres Risiko hatten eine Herzinsuffizienz oder Hypervolämie zu erleiden [152]. BNP wird in der Klinik als Marker für Herzmuskelschwäche eingesetzt. In einer weiteren klinischen Studie mit CDDO-Me wurden deshalb nur diabetische CKD-Patienten im Stadium 3 oder 4 ausgewählt, die diese Risikofaktoren nicht aufwiesen [153]. Auch hier wurde ein Anstieg im GFR nach 16 Wochen-Behandlung beobachtet, jedoch ohne ein Auftreten von Herzversagen. Zwar war in dieser Studie kein signifikanter Anstieg des Albumin/Kreatinin-Verhältnisses im Urin sichtbar, allerdings wurde eine Erhöhung an BNP im Blut der mit CDDO-Me behandelten Patienten mit CKD im Stadium 4 nachgewiesen. Erste Hinweise, dass Nrf2-Aktivatoren auch einen negativen Einfluss auf die Herzfunktion haben könnten, zeigte eine *in vitro* Studie von Rhoden *et al* [240]. In aus humanen pluripotenten Stammzellen differenzierten Kardiomyozyten führte Sulf zu einer Dysfunktion der Mitochondrien, welche die Kontraktilität der Kardiomyozyten negativ beeinflusste.

Zusammenfassend konnte ein Keap1-KD und die dadurch erreichte konstitutive Nrf2-Aktivierung vor der Ald-induzierten tubulären Schädigung, jedoch nicht vor einer glomerulären Schädigung schützen. Weiterhin scheint eine konstitutive Nrf2-Aktivierung über einen Keap1-KD bereits basal Veränderungen in der Niere, besonders in den Glomeruli zu verursachen. Eine zusätzliche Sulf-Behandlung hingegen konnte vor keinen

Ald-induzierten Schäden der Niere schützen, führte jedoch basal zu einer Verminderung der glomerulären Filtration. Eine Hemmung der Keap1-Nrf2-Interaktion, egal ob genetisch oder pharmakologisch scheint somit nicht nur positive, sondern auch negative Effekte zu verursachen.

#### 5.2.4 Ald-induzierter oxidativer Stress kann über eine konstitutive Nrf2-Aktivierung nicht verhindert werden

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob die konstitutive Nrf2-Aktivierung in den Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen oder die Sulf-Behandlung die Induktion von oxidativen Stress und die damit verbundenen oxidativen und DNA-Schäden vermindern oder sogar verhindern kann. In einer vorangegangenen Studie konnte die Sulf-Behandlung *in vitro* und *in vivo* vor den Ald-induzierten DNA-Schäden schützen [76].

Die in diesem Kapitel diskutierten Ergebnisse sind in der Tabelle 5.6 für eine Übersicht zusammengefasst.

**Tabelle 5.6: Übersicht der für die Analyse des oxidativen Stresses analysierten Parameter.** Dargestellt ist eine vereinfachte Zusammenfassung der untersuchten Parameter. Dabei werden die Parameter immer mit den Werten der WT-K verglichen. Sind die Pfeile nicht umklammert, handelt es sich um signifikante Effekte. Bei umklammerten Pfeilen war der Effekt zu sehen, jedoch nicht signifikant. ↑: höhere Werte vs. WT-K, ↓: niedrigere Werte vs. WT-K., -: kein Effekt. Die Isoprostan F<sub>2t</sub>- und 8-OHdG-Exkretion sind als systemische oxidative Marker zusammengelegt worden. 8-OHdG: 8-Hydroxy-2'-Desoxyguanosin, Ald: Aldosteron, DNA: Desoxyribonukleinsäure, K: Kontrolle, Nox2: NADPH-Oxidase 2. Nrf2: Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2, Sulf: Sulforaphan, WT: Wildtyp.

Parameter	WT-K	WT-Sulf	WT-Ald	WT-Ald+Sulf	Nrf2 <sup>↑</sup> -K	Nrf2 <sup>↑</sup> -Ald
Systemische oxidative Marker	-	(↓)	↑	↑	(↓)	↑
DNA-Schäden	-	(↑)	↑	↑	(↑)	↑
Nox2-Expression	-	-	↑	↑	-	-
pp47phox-Expression	-	-	(↑)	(↑)	-	-

Systemischer oxidativer Stress wurde in diesem Versuch über die Exkretion von 15-Isoprostan F<sub>2t</sub> und 8-OHdG im Sammelurin gemessen. Wie in dem Dosisversuch erhöhte die Ald-Infusion in den WT-Mäusen die Ausscheidung von 15-Isoprostan F<sub>2t</sub>, als Marker für oxidativen Schaden an Lipiden, und 8-OHdG, als Marker für Schaden an Nukleotiden. Tendenziell wurde nach Sulf-Behandlung in den WT-Tieren und in den Nrf2<sup>↑</sup>-K-Mäusen basal weniger Marker nachgewiesen. Jedoch waren weder die Nrf2<sup>↑</sup>-Mäuse, noch die zusätzlich mit Sulf behandelten WT-Mäuse vor den durch Ald ausgelösten oxidativen Schäden geschützt. Die Exkretion der beiden Marker im Urin stieg auch in diesen Gruppen (WT-Ald+Sulf und Nrf2<sup>↑</sup>-Ald), im gleichen Umfang wie in den WT-Ald-Mäusen, signifikant an. Da das im Dosisversuch verwendete Verstärkerreagenz der immunhistochemischen Färbung von 8-oxodG auf dem Nierengewebe (TSA-System) nicht mehr hergestellt wird und ein neues nicht die gewünschten Erfolge erbrachte, wurde der Marker für strukturelle

DNA-Schäden  $\gamma$ H2AX in diesem Versuch als Marker für Ald-induzierte oxidative DNA-Schäden hinzugezogen. Auf dem Nierengewebe zeigte sich das gleiche Bild, wie zuvor bei dem Nachweis des systemischen oxidativen Stresses. Alle Ald-infundierten Mäuse unabhängig vom Mausstamm oder einer zusätzlichen Behandlung zeigten im Cortex und in der Medulla mehr DNA-Schäden. Im Cortex waren diese Effekte signifikant zu den Kontrollen. Daraus lässt sich schließen, dass weder die konstitutive Nrf2-Aktivierung über den Keap1-KD, noch die Sulf-Behandlung vor dem Ald-induzierten oxidativen Stress schützen konnte. Im Nierengewebe von Ald-infundierten humanisierten Mäusen wurde hingegen, nach einer zusätzlichen Behandlung mit CDDO-Me, eine DHE-Fluoreszenz auf Kontrollniveau und somit eine geringere ROS-Produktion als nach der Ald-Infusion nachgewiesen [237]. Weiterhin konnte eine geringere Produktion der ROS-Spezies  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{O}_2^{\bullet-}$  nach einer *ex vivo* -Behandlung von Aorten von Mäusen und Endothelzellen mit Sulf nachgewiesen werden. Hier konnte Sulf also den Ald-induzierten oxidativen Stress mindern [241]. Auch in Ald-infundierten Ratten konnten weniger  $\gamma$ H2AX-positive Zellkerne im Cortex und der Medulla nach einer zusätzlichen Behandlung mit Sulf beobachtet werden [76].

Da Ald die Produktion von ROS über die Aktivierung der NOX induziert und der Ald/MR-Komplex auch direkt die Expression der NOX-Untereinheiten beeinflusst [33], wurde in diesem Versuch die mRNA-Expression von der Untereinheit *Nox2* und die Phosphorylierung und somit Aktivierung der Untereinheit p47phox analysiert. Die Ald-Exposition führte in den WT-Mäusen wie aus dem Dosisversuch erwartet zu einer erhöhten Expression von *Nox2* und tendenziellen Aktivierung von p47phox. Im Gegensatz zur Wirkung von Ald in den WT-Mäusen führte Ald in den Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen weder zu einer Induktion der *Nox2*- Expression noch zu einer Aktivierung von p47phox. Die Bedeutung der NOX- und der NOS-Aktivität für den Ald-induzierten oxidativen Stress konnte schon von *in vitro* in kultivierten proximalen und distalen Nierenzellen mit der Verwendung von NOX- und NOS-Inhibitoren wie VAS2870 und *N(ω)-nitro-L-arginine methyl ester* (L-NAME) demonstriert werden [44]. Weiterhin wird in der Niere nicht nur die Isoform NOX2 exprimiert, sondern auch NOX1 und NOX4 und die jeweiligen Untereinheiten p22phox, p47phox und p67phox [242]. So konnte in Ald-infundierten Ratten auch eine Induktion der Expression der Untereinheiten *Nox4*, p22phox und p47phox nachgewiesen werden [93]. In Kokulturen primärer neuronaler Zellen und kultivierten Schnitten des Gehirns aus WT-, Nrf2-KO- und Keap1-KD-Mäusen konnten Kovac *et al.* beobachten, dass der Nrf2-Status die Expression der *Nox2* und *Nox4*-Isoformen beeinflusst. Während *Nox2* in den Nrf2-KO Mäusen hochreguliert war, war die mRNA-Expression von *Nox4* bei einer konstitutiven Nrf2-Aktivierung im Vergleich zum WT erhöht [243]. Weiterhin war auch die ROS-Produktion in den Mitochondrien der Nrf2-KO und Keap1-KD Mäuse erhöht. Eine Analyse der Expression

auf mRNA und Proteinebene aller in der Niere vorhandenen NOX-Isoformen und NOX-Untereinheiten unserer Tiere könnte Aufschluss darüber geben, ob die Ald-Infusion oder der Genotyp selbst die Expression in den Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen beeinflusste. Da allerdings auch die Expression der klassischen Gene nicht von Ald induziert wurde, könnte auch eine ausbleibende Bindung des Ald/MR-Komplexes an das HRE für diesen Befund sprechen. Jedoch sind keine Studien vorhanden, die einen Einfluss von Keap1 auf den Ald/MR-Komplex oder das HRE beschreiben. Weiterhin spielen viele sekundäre Botenstoffe (DAG, IP<sub>3</sub>, Ca<sup>2+</sup>), Signalmoleküle (PLC, PKC) und Zellkompartimente (ER) eine Rolle in der NOX-Aktivierung über Ald [33]. Darüber hinaus tragen auch die Mitochondrien zu einer Generierung der ROS bei [91] und könnten für den in den Nrf2<sup>↑</sup>-Ald Mäusen nachgewiesenen systemischen oxidativen stress und den daraus resultierenden Schäden verantwortlich ein.

In dieser Arbeit konnte eine zusätzliche Nrf2-Aktivierung über einen Keap1-KD oder eine Sulf-Behandlung nicht vor dem Ald-induzierten oxidativen Stress und lokalen DNA-Schäden in der Niere schützen. Während NOX2 als eine mögliche Quelle für den oxidativen Stress in der Niere in WT-Mäusen identifiziert werden konnte, war dies für die transgenen Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen nicht möglich.

Schlussfolgernd lässt sich festhalten, dass die Ald-Infusion in den WT-Mäusen, wie schon im Dosisversuch, zu systemischem oxidativen Stress und lokalen moderaten Schäden in der Niere führte. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine zusätzliche Stimulierung des Nrf2-Signalweges nur bedingt protektiv war. Weder die genetische Nrf2-Aktivierung noch die Sulf-Behandlung konnten die Entwicklung von oxidativem Stress über Ald verhindern. Allerdings konnten in dem hier verwendeten transgenen Mausstamm bei einer Ald-Infusion, die aus klinischen Studien bekannten negativen Effekte von Nrf2-Aktivatoren beobachtet werden. Eine konstitutive Nrf2-Aktivierung scheint die Filtrationsfunktion der Niere zu verschlechtern und Glomeruli sensitiver gegenüber oxidativem Stress zu machen. Diese Arbeit unterstreicht die Nrf2-Stimulation als zweischneidiges Schwert in der Verwendung für die Protektion vor Schäden in renalen Krankheitsmodellen.

## 6. Zusammenfassung

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) reguliert den Blutdruck, sowie den Wasser- und Elektrolythaushalt. Erhöhte Aldosteron (Ald)-Konzentrationen können aber nicht nur zur Bildung von Hypertonie, sondern auch zu einer Entwicklung und Progression von chronischer Niereninsuffizienz (CKD) beitragen. So führen gesteigerte Ald-Konzentrationen in Nierenzellen zu einer erhöhten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und DNA-Schäden. Um sich vor den Ald-induzierten Schäden zu schützen, können Nierenzellen den Transkriptionsfaktor *Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2* (Nrf2) aktivieren, einen der Masterregulatoren der endogenen antioxidativen Abwehr.

Zielsetzung im ersten Teil dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob erhöhte Ald-Konzentrationen in der Wildtyp-Maus zu einer moderaten Nierenschädigung und Aktivierung von Nrf2 führen. Weiterhin sollten die induzierten Schäden und die Nrf2-Aktivierung im Tubulussystem der Niere lokalisiert werden. Für den Versuch zur Dosisfindung und Lokalisation der Ald-induzierten Nierenschäden und Nrf2-Aktivierung, wurden zunächst männlichen C57BL/6-Mäusen osmotische Minipumpen implantiert, welche 75, 125 oder 250 µg/kg x Tag Ald über einen Behandlungszeitraum von 28 Tagen abgaben. Die Ald-Infusion führte in keiner der getesteten Konzentrationen zu einem stabilen Anstieg des Blutdrucks. Jedoch führte Ald in den Nieren der Mäuse zu histopathologischen Veränderungen im Tubulussystem und in den Glomeruli. Dies spiegelte sich auch in einer verschlechterten Nierenfunktion wider. Weiterhin verursachten die erhöhten Ald-Spiegel systemischen oxidativen Stress und lokale oxidative Schäden in der Niere. Eine Phosphorylierung und Translokation des Transkriptionsfaktors Nrf2 in den Zellkern und somit eine Aktivierung, konnte in den Ald-behandelten Mäusen nachgewiesen werden. Eine Lokalisation der Ald-induzierten Schäden, in Form von DNA-Läsionen, in den verschiedenen Nierenzellen, zeigte einen Anstieg in den proximalen Tubuli und in einem noch größeren Ausmaß in den distalen Tubuli. Die Phosphorylierung von Nrf2 war in den distalen Tubuluszellen erhöht, dort wo auch die höchste Menge an DNA-Schäden gezeigt werden konnte. Überraschenderweise konnte für die Nrf2-Zielgene und -proteine eher eine Inhibierung ihrer Expression nach Ald-Infusion nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen der an der Regulation von Nrf2 beteiligten Proteine *Musculoaponeurotic fibrosarcoma K* und *BTB and CNC homology 1* (Bach1) zeigten keine signifikanten Unterschiede. Allerdings könnte die nachgewiesene erhöhte Expression von Glykogensynthase-Kinase 3β (GSK3β), einer Kinase deren Phosphorylierung von Nrf2 zu einer Degradation führt, nach einer Ald-Infusion ein Hinweis für die Inhibierung der Nrf2-Zielgene geben.

Im weiterführenden Teil der Dissertation wurden wildtypische Mäuse mit Sulforaphan (Sulf), einem in der Literatur beschriebenen Nrf2-Aktivator, behandelt und ein transgener Mausstamm verwendet, der hypomorph für den Nrf2-Repressor Kelch-ähnliches ECH-assoziiertes Protein 1 (Keap1) war. Ziel des zweiten Versuches war es zu untersuchen, ob die zusätzliche Stimulation von Nrf2 zu einer Protektion vor den Ald-induzierten Schäden führt. Hierfür wurden wildtypische männliche C57BL/6-Mäuse und transgene Nrf2<sup>↑</sup>-Mäuse (B6.Cg-Keap1<sup>tm2Mym</sup>(Alb-cre)21Mgn/J) mit osmotischen Minipumpen ausgestattet, die 125 µg/kg x Tag Ald über einen Behandlungszeitraum von 28 Tagen abgaben. Zusätzlich wurden wildtypische Mäuse mit Sulf im Trinkwasser behandelt. In den Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen, auch in den mit Ald behandelten, konnte in den Nieren, wie erwartet, eine geringere Keap1-Expression nachgewiesen werden, welche zu einer Aktivierung von Nrf2 und erhöhten Expression der Nrf2-Zielgene führte. Die Sulf-Behandlung hatte hingegen weder Einfluss auf die Nrf2-Aktivität noch auf die Expression der Nrf2-Zielgene. Die Ald-Infusion in den wildtypischen Mäusen führte zwar wieder zu einer Aktivierung von Nrf2, jedoch größtenteils zur Inhibition der Zielgene. Die Ald-Infusion löste in den Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen zu keinem Messzeitpunkt Bluthochdruck aus, was möglicherweise an der ausbleibenden Expression des Volumen-erhöhenden epithelialen Natriumkanals lag. Während die Ald-infundierten Wildtyp-Mäuse zumindest zeitweise erhöhte Blutdruckwerte zeigten, war dies bei den zusätzlich mit Sulf-behandelten Tieren nicht der Fall. Die konstitutive Nrf2-Aktivierung in den Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen schützte vor Ald-induzierten tubulären, jedoch nicht vor glomerulären Schäden. Weiterhin waren in den Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen bereits basal Veränderungen in den Nieren anhand des Auftretens von Hydronephrose, histopathologischen Veränderungen der Glomeruli und einer niedrigeren Filtrationsrate nachweisbar. Die Sulf-Behandlung konnte nicht vor den Ald-verursachten Nierenschäden schützen. Weiterhin konnte weder die konstitutive Nrf2-Aktivierung in den Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen noch die Gabe von Sulf vor dem Ald-induzierten systemischen oxidativen Stress und den lokalen oxidativen Schäden in der Niere schützen. Während die NADPH-Oxidase 2 als mögliche Quelle für den oxidativen Stress in den Wildtyp-Mäusen identifiziert werden konnte, konnte dies für die Nrf2<sup>↑</sup>-Mäuse nicht gezeigt werden.

Zusammenfassend konnte eine zusätzliche Stimulation von Nrf2 nicht vor Ald-induzierten oxidativen Schäden schützen. Vielmehr zeigen die bereits basalen Veränderungen in den Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen, dass eine dauerhafte Nrf2-Aktivierung die Filtrationsbarriere der Niere schädigt. Diese Arbeit demonstriert, dass eine Nrf2-Stimulation sowohl protektive als auch schädigende Effekte mit sich bringt und dies bei einer Verwendung von Nrf2-Aktivatoren in renalen Krankheitsmodellen wie CKD in beachtet werden sollte.

## 7. Summary

The renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) regulates blood pressure, as well as water and electrolyte balance. However, elevated aldosterone (Ald) concentrations contribute not only to the development of hypertension, but also to the development and progression of chronic kidney disease (CKD). Thus, increased Ald concentrations in kidney cells lead to increased production of reactive oxygen species and DNA damage. To protect themselves from Ald-induced damage, renal cells can activate the transcription factor nuclear factor-erythroid-2-related factor 2 (Nrf2), one of the master regulators of endogenous antioxidant defense.

The objective in the first part of this thesis was to investigate whether increased Ald concentrations in the wild-type mouse led to moderate renal damage and activation of Nrf2. Furthermore, to localize the induced damage and Nrf2 activation in the renal tubule system. For the dose finding, localization of Ald-induced renal damage and Nrf2 activation, male C57BL/6 mice were implanted with osmotic minipumps delivering 75, 125, or 250 µg/kg x day Ald over a treatment period of 28 days. Ald infusion did not result in a stable increase in blood pressure at any of the concentrations tested. However, Ald-induced histopathological changes in the tubular system and glomeruli in the kidneys of the mice. This was also reflected in deteriorated renal function. Furthermore, increased Ald levels led to systemic oxidative stress and local oxidative damage in the kidney. Phosphorylation, translocation and thus activation of the transcription factor Nrf2 into the nucleus could be detected in the Ald-treated mice. Localization of Ald-induced damage, in the form of DNA lesions, in the different kidney cells showed an increase in the proximal tubule and to an even greater extent in the distal tubule. Phosphorylation of Nrf2 was increased in the distal tubule cells, where the highest amount of DNA damage was also shown. Surprisingly, Nrf2 target genes and proteins were more likely to show inhibition of their expression after Ald infusion. Further investigation of the proteins involved in the regulation of Nrf2, Musculoaponeurotic fibrosarcoma K und BTB and CNC homology 1 (Bach1), showed no significant differences. However, the detected increased expression of Glycogen synthase kinase 3β (GSK3β), a kinase whose phosphorylation leads to degradation of Nrf2, after Ald infusion, may provide evidence for inhibition of Nrf2 target genes.

In the continuing part of the dissertation, wild-type mice were treated with sulforaphane (Sulf), an Nrf2 activator described in the literature, and a transgenic mouse strain hypomorphic for the Nrf2 repressor Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) was used. The aim of the second experiment was to investigate whether additional stimulation of Nrf2 leads to protection against Ald-induced damage. For this purpose, wild-type male C57BL/6 mice and Nrf2<sup>↑</sup> transgenic mice (B6.Cg-Keap1<sup>tm2Mym(Alb-cre)</sup>21Mgn/J) were equipped with osmotic minipumps that delivered 125 µg/kg x day Ald over a treatment period of 28

days. Additionally, wild-type mice were treated with Sulf in drinking water. In the Nrf2<sup>↑</sup> mice, including those treated with Ald, lower Keap1 expression was detected in the kidneys, as expected, leading to Nrf2 activation and increased expression of Nrf2 target genes. In contrast, Sulf treatment did not affect Nrf2 activity or expression of Nrf2 target genes. Ald treatment in the wild-type mice again led to activation of Nrf2 but largely to inhibition of the target genes. Ald infusion did not elicit hypertension in the Nrf2<sup>↑</sup> mice at any measurement time point, possibly because of the absence of expression of the volume-enhancing epithelial sodium channel. Whereas the Ald-infused wild-type mice showed elevated blood pressure levels at least intermittently, this was not the case in the additional Sulf-treated animals. Constitutive Nrf2 activation in the Nrf2<sup>↑</sup> mice protected against Ald-induced tubular but not glomerular damage. Furthermore, changes in the kidneys were already detectable basally in the Nrf2<sup>↑</sup> mice based on the appearance of hydronephrosis, histopathological changes in the glomeruli and a lower filtration rate. Sulf treatment failed to protect against Ald-induced renal damage. Furthermore, neither constitutive Nrf2 activation in the Nrf2<sup>↑</sup> mice nor Sulf administration could protect against Ald-induced systemic oxidative stress and local oxidative damage in the kidney. While NADPH oxidase 2 was identified as a possible source of oxidative stress in the wild-type mice, this could not be shown for the Nrf2<sup>↑</sup> mice.

In conclusion, additional stimulation of Nrf2 failed to protect against Ald-induced oxidative damage. Rather, the already basal changes in the Nrf2<sup>↑</sup> mice demonstrate that sustained Nrf2 activation damages the renal filtration barrier. This work shows that Nrf2 stimulation involves both protective and damaging effects and that this should be considered when Nrf2 activators are used in renal disease models such as CKD.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Singulett-Sauerstoff
8-oxodG	8-Oxo-2'-Deoxyguanosin
8-OHdG	8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosin
αGST	α-Glutathion-S-Transferase
αENaC	α-Untereinheit des epithelialen Natriumkanals
β-TrCP	<i>β-Transducin repeat-Containing Protein</i>
γH2AX	Phosphoryliertes Histon 2AX an Serin 139
A	Avidin
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
ACE	Angiotensin-Konversions-Enzym
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADH	Antidiuretisches Hormon
Alb	Albumin
Ald	Aldosteron
Ang II	Angiotensin II
AP-1	Aktivator-Protein 1
APC	Allophycocyanin
Apex1	DNA-(apurinische/ apyrimidimische) Endonuklease
ARB	Angiotensin II-Rezeptor-Blocker
ARE	<i>Antioxidative Response Element</i>
AT1R	Angiotensin II-Rezeptor-Typ 1
AT2R	Angiotensin II-Rezeptor-Typ 2
Atm	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
B	Biotin
Bach1	<i>BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 1</i>
BNB	<i>Bric-a-brac</i>
BNP	<i>Barin natriuretic peptide</i>
Brac1	Brustkrebsgen 1, <i>BReast CAncer 1</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
BTB	<i>Bric-a-brac</i>
bZIP	<i>Basic Leucin-Zipper</i>
Bzw.	Beziehungsweise
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAT	Katalase
CDDO-Me	Bardoxolon-Methyl
CKD	Chronische Niereninsuffizienz, <i>Chronic Kidney Disease</i>
CNC	Cap 'n' Collar
CO	Kohlenstoffmonoxid
Cre	Cre-Rekombinase
CRP	C-reaktives Protein
Cul3/Rbx1	Ubiquitin-Ligase-Komplex
d	Tag
DAB	Diaminobenzidin
DAG	Diacylglycerin
DHE	Dihydroethidium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphate
DOCA	Deoxycorticosteronacetat
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Desoxyuridin-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ENaC	epithelialer Natriumkanal, <i>epithelial sodium channel</i>

eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK1/2	<i>Extracellular-signal Regulated Kinase 1/2</i>
EtOH	Ethanol
G6PD	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GCL	Glutamat-Cysteinligase
GCLC	Glutamat-Cysteinligase katalytische Untereinheit
GCLM	Glutamat-Cysteinligase regulatorische Untereinheit
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GPX	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreduktase
GSH	Glutathion
GSI	Glomeruloskleroseindex
GSK3 $\alpha$	Glykogensynthase-Kinase 3 $\alpha$
GSK3 $\beta$	Glykogensynthase-Kinase 3 $\beta$
GSSG	Glutathion-Disulfid
GST	Glutathion-Transferase
GST-Pi	Glutathion-S-Transferase Pi
Gstm1	Glutathion-Transferase Mu 1
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin-Eosin
HO	Hämoxygenase
HOCl	Hypochlorige Säure
HRE	Hormonresponsive Elemente
HRP	Meerrettichperoxidase
Hsp90	<i>Heat shock protein 90</i>
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
IL	Interleukin
IVR	<i>Intervening Linker Region</i>
Keap1	Kelch-ähnliches ECH-assoziiertes Protein 1
Keap1-KD	<i>Keap1-knockdown</i>
Keap1-KO	<i>Keap1-knockout</i>
KDIGO	<i>Kidney Disease. Improving Global Outcome</i>
KIM-1	<i>Kidney Injury Molecule-1</i>
L-NAME	<i>N(<math>\omega</math>)-nitro-L-arginine methyl ester</i>
Lig1/4	Ligase 1/4
LoxP	<i>Locus of X-over P1</i>
MafK	<i>Musculoaponeurotic fibrosarcoma K</i>
MAP	<i>Mitogen activated protein</i>
min	Minuten
MPO	Myeloperoxidase
mg	Milligramm
NLRP3	<i>NLR family pyrin domain containing 3</i>
MSI	Mesangiolyseindex
MR	Mineralkortikoidrezeptor
Na <sup>+</sup>	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase	Natrium-Kalium-Adenosintriphosphatase
Neh	Nrf2-ECH-homologe Domäne
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
ng	Nanogramm
NGAL	Neutrophilengelatinase-assoziiertes Lipocalin
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NOX	NADPH-Oxidase

NQO1	NAD(P)H-(Chinone) Dehydrogenase 1,
Nrf2	<i>Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2</i>
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Superoxid
OH <sup>•</sup>	Hydroxylradikal
Ogg1	8-Oxoguanin-Glykosylase 1
ONNO <sup>-</sup>	Peroxinitrit-Anion
PARP	Poly-(ADP-Ribose) Polymerase
PAS	Perjodsäure-Schiff
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCNA	<i>Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRAS40	40 kDa Prolin-Reiches-AKT1-Substrat
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
RAAS	Renin-Angitensin-Aldosteron-System
RIPA	Radioimmunpräzipitationsassay
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	Reaktive Stickstoffspezies
ROMK	<i>renal outer medullary K<sup>+</sup> channel</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RSK	Ribosomale S6 Kinase
RT	Raumtemperatur
RXR $\alpha$	Retinoid-X-Rezeptor $\alpha$
sek	Sekunden
SA	Streptavidin
SA-PE	Sterptavidin-Phycoerythrin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standardfehler
Sgk1	Serum-Glukokortikoid-regulierten Kinase 1
SHR	Spontan hypertensive Ratten
Sulf	Sulforaphan
sMaf	<i>Small Musculoaponeurotic fibrosarcoma</i>
SOD	Superoxiddismutase
SR	Sirius-Rot
SRXN	Sulfredoxin
T	Tyramid
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBRAS	<i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TdT	<i>Terminal desoxynucleotidyl Transferase</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Fator <math>\beta</math></i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TNB	Tris-NaCl-Blocking
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TNT	Tris-NaCl-Tween 20
TRX	Thioredoxin
TRXR	Thioredoxinreduktase
TSA	<i>Tyramide Signal Amplification</i>
TSI	Tubulointerstitieller Schädigungsindex
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP-Flourescein nick end labeling</i>
XO	Xanthin-Oxidase

## 9. Literaturverzeichnis

1. WHO, *A global brief on hypertension: silent killer, global public health crisis*. World Health Day 2013, 2013: p. 1-39.
2. Anke-Christine Saß, C.L., Jonas D. Finger, Jennifer Allen, Sabine Born, Jens Hoebel, Ronny Kuhnert, Stephan Müters, Jürgen Thelen, Patrick Schmich, Marike Varga, Elena von der Lippe, Matthias Wetzstein, Thomas Ziese, „*Gesundheit in Deutschland aktuell*“ – *Neue Daten für Deutschland und Europa Hintergrund und Studienmethodik von GEDA 2014/2015-EHIS*. Journal of Health Monitoring, 2017. **2(1)**.
3. Program, N.H.B.P.E., *The Seventh Report of the National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure*. Bethesda, MD: National Heart, Lung, and Blood Institute, 2003: p. 1-34.
4. Titze, S., et al., *Disease burden and risk profile in referred patients with moderate chronic kidney disease: composition of the German Chronic Kidney Disease (GCKD) cohort*. Nephrol Dial Transplant, 2015. **30(3)**: p. 441-51.
5. Members, K.B., *KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease*. Kidney International Supplements, 2013. **3(1)**: p. 1-150.
6. Webster, A.C., et al., *Chronic Kidney Disease*. The Lancet, 2017. **389(10075)**: p. 1238-1252.
7. Shavit, L., M.D. Lifschitz, and M. Epstein, *Aldosterone blockade and the mineralocorticoid receptor in the management of chronic kidney disease: current concepts and emerging treatment paradigms*. Kidney Int, 2012. **81(10)**: p. 955-968.
8. Barrera-Chimal, J., S. Girerd, and F. Jaisser, *Mineralocorticoid receptor antagonists and kidney diseases: pathophysiological basis*. Kidney Int, 2019. **96(2)**: p. 302-319.
9. Wallace, M.A., *Anatomy and physiology of the kidney*. AORN J, 1998. **68(5)**: p. 800, 803-16, 819-20; quiz 821-4.
10. Chmielewski, C., *Renal anatomy and overview of nephron function*. Nephrol Nurs J, 2003. **30(2)**: p. 185-90; quiz 191-2.
11. Adhipandito, C.F., et al., *Atypical Renal Clearance of Nanoparticles Larger Than the Kidney Filtration Threshold*. Int J Mol Sci, 2021. **22(20)**.
12. Bleich, H.L. and E.S. Boro, *Antidiuretic hormone*. N Engl J Med, 1976. **295(12)**: p. 659-65.
13. Funder, J.W., *New biology of aldosterone, and experimental studies on the selective aldosterone blocker eplerenone*. Am Heart J, 2002. **144(5 Suppl)**: p. S8-11.
14. Meneton, P., J. Loffing, and D.G. Warnock, *Sodium and potassium handling by the aldosterone-sensitive distal nephron: the pivotal role of the distal and connecting tubule*. Am J Physiol Renal Physiol, 2004. **287(4)**: p. F593-601.
15. Brown, M.J., *Direct renin inhibition a new way of targeting the renin system*. Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS, 2006. **7(2)**.
16. Davis, J.O., *The control of renin release*. Am J Med, 1973. **55(3)**: p. 333-50.
17. Davis, J.O. and R.H. Freeman, *Mechanisms regulating renin release*. Physiol Rev, 1976. **56(1)**: p. 1-56.
18. Morgan, L., F. Broughton Pipkin, and N. Kalsheker, *Angiotensinogen: molecular biology, biochemistry and physiology*. Int J Biochem Cell Biol, 1996. **28(11)**: p. 1211-22.
19. Carey, R.M. and H.M. Siragy, *Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation*. Endocr Rev, 2003. **24(3)**: p. 261-71.
20. Atlas, S.A., *The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition*. J Manag Care Pharm, 2007. **13(8 Suppl B)**: p. 9-20.
21. Aguilera, G. and K.J. Catt, *Regulation of aldosterone secretion by the renin-angiotensin system during sodium restriction in rats*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75(8)**: p. 4057-61.
22. Kaplan, N.M. and F.C. Barter, *The effect of ACTH, renin, angiotensin II, and various precursors on biosynthesis of aldosterone by adrenal slices*. J Clin Invest, 1962. **41**: p. 715-24.
23. MacKenzie, S.M., et al., *Expression of 11beta-hydroxylase and aldosterone synthase genes in the rat brain*. J Mol Endocrinol, 2000. **24(3)**: p. 321-8.
24. Silvestre, J.S., et al., *Myocardial production of aldosterone and corticosterone in the rat. Physiological regulation*. J Biol Chem, 1998. **273(9)**: p. 4883-91.
25. Xue, C. and H.M. Siragy, *Local renal aldosterone system and its regulation by salt, diabetes, and angiotensin II type 1 receptor*. Hypertension, 2005. **46(3)**: p. 584-90.
26. Pascual-Le Tallec, L., C. Demange, and M. Lombes, *Human mineralocorticoid receptor A and B protein forms produced by alternative translation sites display different transcriptional activities*. Eur J Endocrinol, 2004. **150(4)**: p. 585-90.

27. Bruner, K.L., et al., *The unliganded mineralocorticoid receptor is associated with heat shock proteins 70 and 90 and the immunophilin FKBP-52*. *Recept Signal Transduct*, 1997. **7**(2): p. 85-98.
28. Pippal, J.B. and P.J. Fuller, *Structure-function relationships in the mineralocorticoid receptor*. *J Mol Endocrinol*, 2008. **41**(6): p. 405-13.
29. Schmidt, U., et al., *Sodium- and potassium-activated ATPase. A possible target of aldosterone*. *J Clin Invest*, 1975. **55**(3): p. 655-60.
30. Mick, V.E., et al., *The alpha-subunit of the epithelial sodium channel is an aldosterone-induced transcript in mammalian collecting ducts, and this transcriptional response is mediated via distinct cis-elements in the 5'-flanking region of the gene*. *Mol Endocrinol*, 2001. **15**(4): p. 575-88.
31. Grossmann, C., et al., *Human mineralocorticoid receptor expression renders cells responsive for nongenotropic aldosterone actions*. *Mol Endocrinol*, 2005. **19**(7): p. 1697-710.
32. Beesley, A.H., D. Hornby, and S.J. White, *Regulation of distal nephron K<sup>+</sup> channels (ROMK) mRNA expression by aldosterone in rat kidney*. *J Physiol*, 1998. **509** ( Pt 3): p. 629-34.
33. Queisser, N. and N. Schupp, *Aldosterone, oxidative stress, and NF-kappaB activation in hypertension-related cardiovascular and renal diseases*. *Free Radic Biol Med*, 2012. **53**(2): p. 314-27.
34. Beron, J. and F. Verrey, *Aldosterone induces early activation and late accumulation of Na<sup>+</sup>-K-ATPase at surface of A6 cells*. *Am J Physiol*, 1994. **266**(5 Pt 1): p. C1278-90.
35. May, A., et al., *Early effect of aldosterone on the rate of synthesis of the epithelial sodium channel alpha subunit in A6 renal cells*. *J Am Soc Nephrol*, 1997. **8**(12): p. 1813-22.
36. Sancho, J., et al., *The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in cardiovascular homeostasis in normal human subjects*. *Circulation*, 1976. **53**(3): p. 400-5.
37. Christ, M., et al., *Rapid aldosterone signaling in vascular smooth muscle cells: involvement of phospholipase C, diacylglycerol and protein kinase C alpha*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995. **213**(1): p. 123-9.
38. Christ, M., et al., *Aldosterone, not estradiol, is the physiological agonist for rapid increases in cAMP in vascular smooth muscle cells*. *Circulation*, 1999. **99**(11): p. 1485-91.
39. Christ, M., et al., *Rapid effects of aldosterone on sodium transport in vascular smooth muscle cells*. *Hypertension*, 1995. **25**(1): p. 117-23.
40. Wehling, M., et al., *Nongenomic effects of aldosterone on intracellular Ca<sup>2+</sup> in vascular smooth muscle cells*. *Circ Res*, 1995. **76**(6): p. 973-9.
41. Arima, S., et al., *Nongenomic vascular action of aldosterone in the glomerular microcirculation*. *J Am Soc Nephrol*, 2003. **14**(9): p. 2255-63.
42. Fukami, K., et al., *Phospholipase C is a key enzyme regulating intracellular calcium and modulating the phosphoinositide balance*. *Prog Lipid Res*, 2010. **49**(4): p. 429-37.
43. Wehling, M., et al., *Rapid effects of aldosterone on free intracellular calcium in vascular smooth muscle and endothelial cells: subcellular localization of calcium elevations by single cell imaging*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994. **204**(2): p. 475-81.
44. Queisser, N., et al., *Aldosterone increases kidney tubule cell oxidants through calcium-mediated activation of NADPH oxidase and nitric oxide synthase*. *Free Radic Biol Med*, 2011. **51**(11): p. 1996-2006.
45. Geraldès, P. and G.L. King, *Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications*. *Circ Res*, 2010. **106**(8): p. 1319-31.
46. Reeves, E.P., et al., *Direct interaction between p47phox and protein kinase C: evidence for targeting of protein kinase C by p47phox in neutrophils*. *Biochem J*, 1999. **344** Pt 3: p. 859-66.
47. Ungvari, Z., et al., *High pressure induces superoxide production in isolated arteries via protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase*. *Circulation*, 2003. **108**(10): p. 1253-8.
48. El-Benna, J., et al., *p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases*. *Exp Mol Med*, 2009. **41**(4): p. 217-25.
49. Brieger, K., et al., *Reactive oxygen species: from health to disease*. *Swiss Med Wkly*, 2012. **142**: p. w13659.
50. Jin, L., et al., *Increased reactive oxygen species contributes to kidney injury in mineralocorticoid hypertensive rats*. *J Physiol Pharmacol*, 2006. **57**(3): p. 343-57.
51. Lastra, G., et al., *Low-dose spironolactone reduces reactive oxygen species generation and improves insulin-stimulated glucose transport in skeletal muscle in the TG(mRen2)27 rat*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008. **295**(1): p. E110-6.

52. Maron, B.A., et al., *Aldosterone increases oxidant stress to impair guanylyl cyclase activity by cysteinyl thiol oxidation in vascular smooth muscle cells*. J Biol Chem, 2009. **284**(12): p. 7665-72.
53. Gromotowicz, A., et al., *Study of the mechanisms of aldosterone prothrombotic effect in rats*. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2011. **12**(4): p. 430-9.
54. Queisser, N., et al., *Aldosterone induces fibrosis, oxidative stress and DNA damage in livers of male rats independent of blood pressure changes*. Toxicol Appl Pharmacol, 2014. **280**(3): p. 399-407.
55. Queisser, N., et al., *Aldosterone induces oxidative stress, oxidative DNA damage and NF-kappaB-activation in kidney tubule cells*. Mol Carcinog, 2011. **50**(2): p. 123-35.
56. Stas, S., et al., *Mineralocorticoid receptor blockade attenuates chronic overexpression of the renin-angiotensin-aldosterone system stimulation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase and cardiac remodeling*. Endocrinology, 2007. **148**(8): p. 3773-80.
57. Nakano, S., et al., *Cardioprotective mechanisms of spironolactone associated with the angiotensin-converting enzyme/epidermal growth factor receptor/extracellular signal-regulated kinases, NAD(P)H oxidase/lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1, and Rho-kinase pathways in aldosterone/salt-induced hypertensive rats*. Hypertens Res, 2005. **28**(11): p. 925-36.
58. Nishiyama, A., et al., *Possible contributions of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase to renal injury in aldosterone/salt-induced hypertensive rats*. Hypertension, 2004. **43**(4): p. 841-8.
59. Onozato, M.L., et al., *Dual blockade of aldosterone and angiotensin II additively suppresses TGF-beta and NADPH oxidase in the hypertensive kidney*. Nephrol Dial Transplant, 2007. **22**(5): p. 1314-22.
60. Weber, K.T., *Aldosterone in congestive heart failure*. N Engl J Med, 2001. **345**(23): p. 1689-97.
61. Young, M.J. and J.W. Funder, *Mineralocorticoid receptors and pathophysiological roles for aldosterone in the cardiovascular system*. J Hypertens, 2002. **20**(8): p. 1465-8.
62. Rafiq, K., et al., *Pathophysiological roles of aldosterone and mineralocorticoid receptor in the kidney*. J Pharmacol Sci, 2011. **115**(1): p. 1-7.
63. Quack, I., O. Vonend, and L.C. Rump, *Familial hyperaldosteronism I-III*. Horm Metab Res, 2010. **42**(6): p. 424-8.
64. Gordon, R.D., et al., *Evidence that primary aldosteronism may not be uncommon: 12% incidence among antihypertensive drug trial volunteers*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1993. **20**(5): p. 296-8.
65. Rossi, G.P., et al., *A prospective study of the prevalence of primary aldosteronism in 1,125 hypertensive patients*. J Am Coll Cardiol, 2006. **48**(11): p. 2293-300.
66. Funder, J. and M.I. New, *Low renin hypertension (LRH): shades of John Laragh*. Trends Endocrinol Metab, 2008. **19**(3): p. 83.
67. Calhoun, D.A., et al., *Resistant hypertension: diagnosis, evaluation, and treatment: a scientific statement from the American Heart Association Professional Education Committee of the Council for High Blood Pressure Research*. Circulation, 2008. **117**(25): p. e510-26.
68. Zannad, F., et al., *Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms*. N Engl J Med, 2011. **364**(1): p. 11-21.
69. Pitt, B., et al., *Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction*. N Engl J Med, 2003. **348**(14): p. 1309-21.
70. Pitt, B., et al., *The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators*. N Engl J Med, 1999. **341**(10): p. 709-17.
71. Schjoedt, K.J., et al., *Aldosterone escape during blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system in diabetic nephropathy is associated with enhanced decline in glomerular filtration rate*. Diabetologia, 2004. **47**(11): p. 1936-9.
72. Bomback, A.S., et al., *Change in proteinuria after adding aldosterone blockers to ACE inhibitors or angiotensin receptor blockers in CKD: a systematic review*. Am J Kidney Dis, 2008. **51**(2): p. 199-211.
73. Catena, C., et al., *Relationships of plasma renin levels with renal function in patients with primary aldosteronism*. Clin J Am Soc Nephrol, 2007. **2**(4): p. 722-31.
74. Kiyomoto, H., et al., *Possible underlying mechanisms responsible for aldosterone and mineralocorticoid receptor-dependent renal injury*. J Pharmacol Sci, 2008. **108**(4): p. 399-405.

75. Nagase, M. and T. Fujita, *Aldosterone and glomerular podocyte injury*. Clin Exp Nephrol, 2008. **12**(4): p. 233-242.
76. Queisser, N., et al., *Aldosterone activates transcription factor Nrf2 in kidney cells both in vitro and in vivo*. Antioxid Redox Signal, 2014. **21**(15): p. 2126-42.
77. Queisser, N., et al., *Blood pressure has only minor influence on aldosterone-induced oxidative stress and DNA damage in vivo*. Free Radic Biol Med, 2013. **54**: p. 17-25.
78. Bianchi, S., R. Bigazzi, and V.M. Campese, *Antagonists of aldosterone and proteinuria in patients with CKD: an uncontrolled pilot study*. Am J Kidney Dis, 2005. **46**(1): p. 45-51.
79. Nishiyama, A., *Pathophysiological mechanisms of mineralocorticoid receptor-dependent cardiovascular and chronic kidney disease*. Hypertens Res, 2019. **42**(3): p. 293-300.
80. Locatelli, F., et al., *Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome*. Nephrol Dial Transplant, 2003. **18**(7): p. 1272-80.
81. Birben, E., et al., *Oxidative stress and antioxidant defense*. World Allergy Organ J, 2012. **5**(1): p. 9-19.
82. Krause, K.H., *Aging: a revisited theory based on free radicals generated by NOX family NADPH oxidases*. Exp Gerontol, 2007. **42**(4): p. 256-62.
83. D'Autreaux, B. and M.B. Toledano, *ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(10): p. 813-24.
84. Dhalla, N.S., R.M. Temsah, and T. Netticadan, *Role of oxidative stress in cardiovascular diseases*. J Hypertens, 2000. **18**(6): p. 655-73.
85. Zhang, Y., V.L. Dawson, and T.M. Dawson, *Oxidative stress and genetics in the pathogenesis of Parkinson's disease*. Neurobiol Dis, 2000. **7**(4): p. 240-50.
86. Qin, B., et al., *A key role for the microglial NADPH oxidase in APP-dependent killing of neurons*. Neurobiol Aging, 2006. **27**(11): p. 1577-87.
87. Popolo, A., et al., *Oxidative stress in patients with cardiovascular disease and chronic renal failure*. Free Radic Res, 2013. **47**(5): p. 346-56.
88. Daenen, K., et al., *Oxidative stress in chronic kidney disease*. Pediatr Nephrol, 2019. **34**(6): p. 975-991.
89. Di Meo, S., et al., *Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions*. Oxid Med Cell Longev, 2016. **2016**: p. 1245049.
90. Keidar, S., et al., *Aldosterone administration to mice stimulates macrophage NADPH oxidase and increases atherosclerosis development: a possible role for angiotensin-converting enzyme and the receptors for angiotensin II and aldosterone*. Circulation, 2004. **109**(18): p. 2213-20.
91. Holterman, C.E., N.C. Read, and C.R. Kennedy, *Nox and renal disease*. Clin Sci (Lond), 2015. **128**(8): p. 465-81.
92. Beswick, R.A., et al., *NADH/NADPH oxidase and enhanced superoxide production in the mineralocorticoid hypertensive rat*. Hypertension, 2001. **38**(5): p. 1107-11.
93. Bayorh, M.A., et al., *Eplerenone suppresses aldosterone/ salt-induced expression of NOX-4*. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2011. **12**(3): p. 195-201.
94. Dinh, Q.N., et al., *Roles of inflammation, oxidative stress, and vascular dysfunction in hypertension*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 406960.
95. Gupta, J., et al., *Association between albuminuria, kidney function, and inflammatory biomarker profile in CKD in CRIC*. Clin J Am Soc Nephrol, 2012. **7**(12): p. 1938-46.
96. Tzamou, V., et al., *Aldosterone levels and inflammatory stimulation in essential hypertensive patients*. J Hum Hypertens, 2013. **27**(9): p. 535-8.
97. Ballou, S.P. and G. Lozanski, *Induction of inflammatory cytokine release from cultured human monocytes by C-reactive protein*. Cytokine, 1992. **4**(5): p. 361-8.
98. Blasi, E.R., et al., *Aldosterone/salt induces renal inflammation and fibrosis in hypertensive rats*. Kidney Int, 2003. **63**(5): p. 1791-800.
99. Crowley, S.D., *The cooperative roles of inflammation and oxidative stress in the pathogenesis of hypertension*. Antioxid Redox Signal, 2014. **20**(1): p. 102-20.
100. Touyz, R.M., *Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells -- implications in cardiovascular disease*. Braz J Med Biol Res, 2004. **37**(8): p. 1263-73.
101. Terada, Y., et al., *Aldosterone-stimulated SGK1 activity mediates profibrotic signaling in the mesangium*. J Am Soc Nephrol, 2008. **19**(2): p. 298-309.
102. Strutz, F., *Novel aspects of renal fibrogenesis*. Nephrol Dial Transplant, 1995. **10**(9): p. 1526-32.
103. Juknevičius, I., et al., *Effect of aldosterone on renal transforming growth factor-beta*. Am J Physiol Renal Physiol, 2004. **286**(6): p. F1059-62.

104. Briet, M. and E.L. Schiffrin, *Aldosterone: effects on the kidney and cardiovascular system*. Nat Rev Nephrol, 2010. **6**(5): p. 261-73.
105. Bleich, M. and F. Lang, *Aufbau der Niere und glomeruläre Filtration*, in *Physiologie des Menschen*. 2019. p. 395-405.
106. Weaver, R.G., et al., *Estimating Urine Albumin-to-Creatinine Ratio from Protein-to-Creatinine Ratio: Development of Equations using Same-Day Measurements*. J Am Soc Nephrol, 2020. **31**(3): p. 591-601.
107. Lewis, E.J., et al., *The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy*. The Collaborative Study Group. N Engl J Med, 1993. **329**(20): p. 1456-62.
108. Shibata, S., et al., *Podocyte as the target for aldosterone: roles of oxidative stress and Sgk1*. Hypertension, 2007. **49**(2): p. 355-64.
109. Valko, M., et al., *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(1): p. 44-84.
110. Nezu, M. and N. Suzuki, *Roles of Nrf2 in Protecting the Kidney from Oxidative Damage*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(8).
111. Callegari, A., et al., *Gain and loss of function for glutathione synthesis: impact on advanced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(11): p. 2473-82.
112. Holmgren, A. and J. Lu, *Thioredoxin and thioredoxin reductase: current research with special reference to human disease*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **396**(1): p. 120-4.
113. Kaspar, J.W., S.K. Niture, and A.K. Jaiswal, *Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress*. Free Radic Biol Med, 2009. **47**(9): p. 1304-9.
114. Tebay, L.E., et al., *Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease*. Free Radic Biol Med, 2015. **88**(Pt B): p. 108-146.
115. Tonelli, C., I.I.C. Chio, and D.A. Tuveson, *Transcriptional Regulation by Nrf2*. Antioxid Redox Signal, 2018. **29**(17): p. 1727-1745.
116. Nioi, P., et al., *The carboxy-terminal Neh3 domain of Nrf2 is required for transcriptional activation*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(24): p. 10895-906.
117. Wang, H., et al., *RXRalpha inhibits the NRF2-ARE signaling pathway through a direct interaction with the Neh7 domain of NRF2*. Cancer Res, 2013. **73**(10): p. 3097-108.
118. Motohashi, H., et al., *Small Maf proteins serve as transcriptional cofactors for keratinocyte differentiation in the Keap1-Nrf2 regulatory pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(17): p. 6379-84.
119. Itoh, K., et al., *Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain*. Genes Dev, 1999. **13**(1): p. 76-86.
120. Cuadrado, A., *Structural and functional characterization of Nrf2 degradation by glycogen synthase kinase 3/beta-TrCP*. Free Radic Biol Med, 2015. **88**(Pt B): p. 147-157.
121. Bryan, H.K., et al., *The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation*. Biochem Pharmacol, 2013. **85**(6): p. 705-17.
122. McMahon, M., et al., *Dimerization of substrate adaptors can facilitate cullin-mediated ubiquitylation of proteins by a "tethering" mechanism: a two-site interaction model for the Nrf2-Keap1 complex*. J Biol Chem, 2006. **281**(34): p. 24756-68.
123. Itoh, K., et al., *Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles*. Genes Cells, 2003. **8**(4): p. 379-91.
124. Dinkova-Kostova, A.T., et al., *Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(18): p. 11908-13.
125. Huang, H.C., T. Nguyen, and C.B. Pickett, *Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription*. J Biol Chem, 2002. **277**(45): p. 42769-74.
126. Itoh, K., et al., *An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **236**(2): p. 313-22.
127. Katsuoka, F., et al., *Genetic evidence that small maf proteins are essential for the activation of antioxidant response element-dependent genes*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(18): p. 8044-51.
128. Rada, P., et al., *Structural and functional characterization of Nrf2 degradation by the glycogen synthase kinase 3/beta-TrCP axis*. Mol Cell Biol, 2012. **32**(17): p. 3486-99.
129. Jain, A.K. and A.K. Jaiswal, *GSK-3beta acts upstream of Fyn kinase in regulation of nuclear export and degradation of NF-E2 related factor 2*. J Biol Chem, 2007. **282**(22): p. 16502-10.

130. Chowdhry, S., et al., *Nrf2 is controlled by two distinct beta-TrCP recognition motifs in its Neh6 domain, one of which can be modulated by GSK-3 activity*. *Oncogene*, 2013. **32**(32): p. 3765-81.
131. Oyake, T., et al., *Bach proteins belong to a novel family of BTB-basic leucine zipper transcription factors that interact with MafK and regulate transcription through the NF-E2 site*. *Mol Cell Biol*, 1996. **16**(11): p. 6083-95.
132. Moinova, H.R. and R.T. Mulcahy, *Up-regulation of the human gamma-glutamylcysteine synthetase regulatory subunit gene involves binding of Nrf-2 to an electrophile responsive element*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. **261**(3): p. 661-8.
133. Chanas, S.A., et al., *Loss of the Nrf2 transcription factor causes a marked reduction in constitutive and inducible expression of the glutathione S-transferase Gsta1, Gsta2, Gstm1, Gstm2, Gstm3 and Gstm4 genes in the livers of male and female mice*. *Biochem J*, 2002. **365**(Pt 2): p. 405-16.
134. Hawkes, H.J., T.C. Karlenius, and K.F. Tonissen, *Regulation of the human thioredoxin gene promoter and its key substrates: a study of functional and putative regulatory elements*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1840**(1): p. 303-14.
135. Wu, K.C., J.Y. Cui, and C.D. Klaassen, *Beneficial role of Nrf2 in regulating NADPH generation and consumption*. *Toxicol Sci*, 2011. **123**(2): p. 590-600.
136. Alam, J., et al., *Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(37): p. 26071-8.
137. Gozzelino, R., V. Jeney, and M.P. Soares, *Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2010. **50**: p. 323-54.
138. Hayes, J.D. and A.T. Dinkova-Kostova, *The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism*. *Trends Biochem Sci*, 2014. **39**(4): p. 199-218.
139. Poulianiti, K.P., et al., *Systemic Redox Imbalance in Chronic Kidney Disease: A Systematic Review*. *Oxid Med Cell Longev*, 2016. **2016**: p. 8598253.
140. Kuchta, A., et al., *Estimation of oxidative stress markers in chronic kidney disease*. *Kidney Blood Press Res*, 2011. **34**(1): p. 12-9.
141. Pellegrino, D., D. La Russa, and A. Marrone, *Oxidative Imbalance and Kidney Damage: New Study Perspectives from Animal Models to Hospitalized Patients*. *Antioxidants (Basel)*, 2019. **8**(12).
142. Pedruzzi, L.M., et al., *Systemic inflammation and oxidative stress in hemodialysis patients are associated with down-regulation of Nrf2*. *J Nephrol*, 2015. **28**(4): p. 495-501.
143. Kim, H.J. and N.D. Vaziri, *Contribution of impaired Nrf2-Keap1 pathway to oxidative stress and inflammation in chronic renal failure*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2010. **298**(3): p. F662-71.
144. Ma, Q., L. Battelli, and A.F. Hubbs, *Multiorgan autoimmune inflammation, enhanced lymphoproliferation, and impaired homeostasis of reactive oxygen species in mice lacking the antioxidant-activated transcription factor Nrf2*. *Am J Pathol*, 2006. **168**(6): p. 1960-74.
145. Liu, M., et al., *Transcription factor Nrf2 is protective during ischemic and nephrotoxic acute kidney injury in mice*. *Kidney Int*, 2009. **76**(3): p. 277-85.
146. Jerotic, D., et al., *Association of Nrf2, SOD2 and GPX1 Polymorphisms with Biomarkers of Oxidative Distress and Survival in End-Stage Renal Disease Patients*. *Toxins (Basel)*, 2019. **11**(7).
147. Ali, B.H., et al., *Curcumin Ameliorates Kidney Function and Oxidative Stress in Experimental Chronic Kidney Disease*. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2018. **122**(1): p. 65-73.
148. Wu, Q.Q., et al., *Bardoxolone methyl (BARD) ameliorates ischemic AKI and increases expression of protective genes Nrf2, PPARgamma, and HO-1*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2011. **300**(5): p. F1180-92.
149. Pergola, P.E., et al., *Effect of bardoxolone methyl on kidney function in patients with T2D and Stage 3b-4 CKD*. *Am J Nephrol*, 2011. **33**(5): p. 469-76.
150. Pergola, P.E., et al., *Bardoxolone methyl and kidney function in CKD with type 2 diabetes*. *N Engl J Med*, 2011. **365**(4): p. 327-36.
151. de Zeeuw, D., et al., *Bardoxolone methyl in type 2 diabetes and stage 4 chronic kidney disease*. *N Engl J Med*, 2013. **369**(26): p. 2492-503.
152. Chin, M.P., et al., *Risk factors for heart failure in patients with type 2 diabetes mellitus and stage 4 chronic kidney disease treated with bardoxolone methyl*. *J Card Fail*, 2014. **20**(12): p. 953-8.
153. Nangaku, M., et al., *Randomized Clinical Trial on the Effect of Bardoxolone Methyl on GFR in Diabetic Kidney Disease Patients (TSUBAKI Study)*. *Kidney Int Rep*, 2020. **5**(6): p. 879-890.

154. Nangaku, M., et al., *Randomized, double-blind, placebo-controlled phase 3 study of bardoxolone methyl in patients with diabetic kidney disease: Design and baseline characteristics of AYAME study*. *Nephrol Dial Transplant*, 2022.
155. Chertow, G.M., et al., *Study Design and Baseline Characteristics of the CARDINAL Trial: A Phase 3 Study of Bardoxolone Methyl in Patients with Alport Syndrome*. *Am J Nephrol*, 2021. **52**(3): p. 180-189.
156. Taguchi, K., et al., *Genetic analysis of cytoprotective functions supported by graded expression of Keap1*. *Mol Cell Biol*, 2010. **30**(12): p. 3016-26.
157. Okawa, H., et al., *Hepatocyte-specific deletion of the keap1 gene activates Nrf2 and confers potent resistance against acute drug toxicity*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **339**(1): p. 79-88.
158. Veniant, M., et al., *Calcium blockade versus ACE inhibition in clipped and unclipped kidneys of 2K-1C rats*. *Kidney Int*, 1994. **46**(2): p. 421-9.
159. el Nahas, A.M., et al., *Role of growth hormone in the development of experimental renal scarring*. *Kidney Int*, 1991. **40**(1): p. 29-34.
160. Kumar, R., et al., *Immunolocalization of calcitriol receptor, 24-hydroxylase cytochrome P-450, and calbindin D28k in human kidney*. *Am J Physiol*, 1994. **266**(3 Pt 2): p. F477-85.
161. Taylor, A.N., J.E. McIntosh, and J.E. Bourdeau, *Immunocytochemical localization of vitamin D-dependent calcium-binding protein in renal tubules of rabbit, rat, and chick*. *Kidney Int*, 1982. **21**(5): p. 765-73.
162. Coleman, R.A., et al., *Expression of aquaporins in the renal connecting tubule*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2000. **279**(5): p. F874-83.
163. Gavrieli, Y., Y. Sherman, and S.A. Ben-Sasson, *Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation*. *J Cell Biol*, 1992. **119**(3): p. 493-501.
164. Slot, C., *Plasma creatinine determination. A new and specific Jaffe reaction method*. *Scand J Clin Lab Invest*, 1965. **17**(4): p. 381-7.
165. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
166. Waeckel, L., et al., *Antihypertensive role of tissue kallikrein in hyperaldosteronism in the mouse*. *Endocrinology*, 2012. **153**(8): p. 3886-96.
167. Wilson, R.M., et al., *Effects of fixed-dose isosorbide dinitrate/hydralazine on diastolic function and exercise capacity in hypertension-induced diastolic heart failure*. *Hypertension*, 2009. **54**(3): p. 583-90.
168. Calvier, L., et al., *Galectin-3 mediates aldosterone-induced vascular fibrosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013. **33**(1): p. 67-75.
169. Butler, M.J., et al., *Aldosterone induces albuminuria via matrix metalloproteinase-dependent damage of the endothelial glycocalyx*. *Kidney Int*, 2019. **95**(1): p. 94-107.
170. Cracowski, J.-L., T. Durand, and G. Bessard, *Isoprostanes as a biomarker of lipid peroxidation in humans: physiology, pharmacology and clinical implications*. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2002. **23**(8): p. 360-366.
171. Bloom, D.A. and A.K. Jaiswal, *Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from I $\kappa$ Nrf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 gene expression*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(45): p. 44675-82.
172. Sundberg, A.G., et al., *Immunohistochemical localization of alpha and pi class glutathione transferases in normal human tissues*. *Pharmacol Toxicol*, 1993. **72**(4-5): p. 321-31.
173. Ekker, M., D. Tronik, and F. Rougeon, *Extra-renal transcription of the renin genes in multiple tissues of mice and rats*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(13): p. 5155-8.
174. Field, L.J. and K.W. Gross, *Ren-1 and Ren-2 loci are expressed in mouse kidney*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. **82**(18): p. 6196-200.
175. Wang, Q., et al., *Blood pressure, cardiac, and renal responses to salt and deoxycorticosterone acetate in mice: role of Renin genes*. *J Am Soc Nephrol*, 2002. **13**(6): p. 1509-16.
176. Michel, F.S., et al., *Contribution of circulating angiotensinogen concentrations to variations in aldosterone and blood pressure in a group of African ancestry depends on salt intake*. *Hypertension*, 2012. **59**(1): p. 62-9.
177. Morizane, S., et al., *Biphasic time course of the changes in aldosterone biosynthesis under high-salt conditions in Dahl salt-sensitive rats*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012. **32**(5): p. 1194-203.

178. Rust, P. and C. Ekmekcioglu, *Impact of Salt Intake on the Pathogenesis and Treatment of Hypertension*. Adv Exp Med Biol, 2017. **956**: p. 61-84.
179. Fujimoto, T., et al., *Excretions of urinary albumin and various proteins increase in hypertension*. Blood Press, 2008. **17**(5-6): p. 270-3.
180. Kato, Y., et al., *Natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A pathway counteracts glomerular injury evoked by aldosterone through p38 mitogen-activated protein kinase inhibition*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 46624.
181. Dunn, S.R., et al., *Utility of endogenous creatinine clearance as a measure of renal function in mice*. Kidney Int, 2004. **65**(5): p. 1959-67.
182. Anders, H.J. and D.A. Muvuve, *The inflammasomes in kidney disease*. J Am Soc Nephrol, 2011. **22**(6): p. 1007-18.
183. Bai, M., et al., *NLRP3 inflammasome activation contributes to aldosterone-induced podocyte injury*. Am J Physiol Renal Physiol, 2017. **312**(4): p. F556-F564.
184. Mihai, S., et al., *Inflammation-Related Mechanisms in Chronic Kidney Disease Prediction, Progression, and Outcome*. J Immunol Res, 2018. **2018**: p. 2180373.
185. Sinha, N. and P.K. Dabla, *Oxidative stress and antioxidants in hypertension-a current review*. Curr Hypertens Rev, 2015. **11**(2): p. 132-42.
186. Hamrahian, S.M. and B. Falkner, *Hypertension in Chronic Kidney Disease*. Adv Exp Med Biol, 2017. **956**: p. 307-325.
187. Brand, S., K. Amann, and N. Schupp, *Angiotensin II-induced hypertension dose-dependently leads to oxidative stress and DNA damage in mouse kidneys and hearts*. J Hypertens, 2013. **31**(2): p. 333-44.
188. Schmid, U., et al., *Angiotensin II induces DNA damage in the kidney*. Cancer Res, 2008. **68**(22): p. 9239-46.
189. Fortuno, A., et al., *Increased phagocytic nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase-dependent superoxide production in patients with early chronic kidney disease*. Kidney Int Suppl, 2005(99): p. S71-5.
190. Schupp, N., et al., *Mineralocorticoid receptor-mediated DNA damage in kidneys of DOCA-salt hypertensive rats*. FASEB J, 2011. **25**(3): p. 968-78.
191. Queisser, N., et al., *Aldosterone activates the oncogenic signals ERK1/2 and STAT3 via redox-regulated mechanisms*. Mol Carcinog, 2017. **56**(8): p. 1868-1883.
192. Brand, S., et al., *Oxidative DNA damage in kidneys and heart of hypertensive mice is prevented by blocking angiotensin II and aldosterone receptors*. PLoS One, 2014. **9**(12): p. e115715.
193. Leal, V.O., et al., *NRF2 and NF-kappaB mRNA expression in chronic kidney disease: a focus on nondialysis patients*. Int Urol Nephrol, 2015. **47**(12): p. 1985-91.
194. Igarashi, K., et al., *Regulation of transcription by dimerization of erythroid factor NF-E2 p45 with small Maf proteins*. Nature, 1994. **367**(6463): p. 568-72.
195. Nguyen, T., H.C. Huang, and C.B. Pickett, *Transcriptional regulation of the antioxidant response element. Activation by Nrf2 and repression by MafK*. J Biol Chem, 2000. **275**(20): p. 15466-73.
196. Lu, M., et al., *GSK3beta-mediated Keap1-independent regulation of Nrf2 antioxidant response: A molecular rheostat of acute kidney injury to chronic kidney disease transition*. Redox Biol, 2019. **26**: p. 101275.
197. Zhang, Y.D., et al., *SB-216763, a GSK-3beta inhibitor, protects against aldosterone-induced cardiac, and renal injury by activating autophagy*. J Cell Biochem, 2018. **119**(7): p. 5934-5943.
198. Smith, E.R., et al., *Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin may aid prediction of renal decline in patients with non-proteinuric Stages 3 and 4 chronic kidney disease (CKD)*. Nephrol Dial Transplant, 2013. **28**(6): p. 1569-79.
199. Bolignano, D., et al., *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and progression of chronic kidney disease*. Clin J Am Soc Nephrol, 2009. **4**(2): p. 337-44.
200. Lyu, Z., et al., *PPARgamma maintains the metabolic heterogeneity and homeostasis of renal tubules*. EBioMedicine, 2018. **38**: p. 178-190.
201. Gwinner, W., et al., *Antioxidant-oxidant balance in the glomerulus and proximal tubule of the rat kidney*. J Physiol, 1998. **509** ( Pt 2): p. 599-606.
202. Ishizuka, S., et al., *Regulation and immunohistochemical analysis of stress protein heme oxygenase-1 in rat kidney with myoglobinuric acute renal failure*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **240**(1): p. 93-8.
203. Shepard, M., et al., *Heme oxygenase-1 localization in the rat nephron*. Nephron, 2002. **92**(3): p. 660-4.

204. Poole, B., et al., *Role of heme oxygenase-1 in endotoxemic acute renal failure*. Am J Physiol Renal Physiol, 2005. **289**(6): p. F1382-5.
205. Advani, A., et al., *Expression, localization, and function of the thioredoxin system in diabetic nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(4): p. 730-41.
206. Fahey, J.W., A.T. Zalcman, and P. Talalay, *The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants*. Phytochemistry, 2001. **56**(1): p. 5-51.
207. Dinkova-Kostova, A.T., et al., *KEAP1 and Done? Targeting the NRF2 Pathway with Sulforaphane*. Trends Food Sci Technol, 2017. **69**(Pt B): p. 257-269.
208. Tan, R.J., et al., *Keap1 hypomorphism protects against ischemic and obstructive kidney disease*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 36185.
209. Kim, H., et al., *Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes*. Lab Anim Res, 2018. **34**(4): p. 147-159.
210. Egger, A.L., et al., *Cul3-mediated Nrf2 ubiquitination and antioxidant response element (ARE) activation are dependent on the partial molar volume at position 151 of Keap1*. Biochem J, 2009. **422**(1): p. 171-80.
211. Hu, C., et al., *Modification of keap1 cysteine residues by sulforaphane*. Chem Res Toxicol, 2011. **24**(4): p. 515-21.
212. Hanlon, N., et al., *Absolute bioavailability and dose-dependent pharmacokinetic behaviour of dietary doses of the chemopreventive isothiocyanate sulforaphane in rat*. Br J Nutr, 2008. **99**(3): p. 559-64.
213. Li, Z., et al., *Sulforaphane prevents type 2 diabetes-induced nephropathy via AMPK-mediated activation of lipid metabolic pathways and Nrf2 antioxidative function*. Clin Sci (Lond), 2020. **134**(18): p. 2469-2487.
214. Zheng, H., et al., *Therapeutic potential of Nrf2 activators in streptozotocin-induced diabetic nephropathy*. Diabetes, 2011. **60**(11): p. 3055-66.
215. Xin, Y., et al., *Sulforaphane prevents angiotensin II-induced cardiomyopathy by activation of Nrf2 via stimulating the Akt/GSK-3 $\beta$ /Fyn pathway*. Redox Biol, 2018. **15**: p. 405-417.
216. Rush, B.M., et al., *Genetic or pharmacologic Nrf2 activation increases proteinuria in chronic kidney disease in mice*. Kidney Int, 2021. **99**(1): p. 102-116.
217. Vaziri, N.D., et al., *Dose-dependent deleterious and salutary actions of the Nrf2 inducer dh404 in chronic kidney disease*. Free Radic Biol Med, 2015. **86**: p. 374-81.
218. Tan, S.M., et al., *Derivative of bardoxolone methyl, dh404, in an inverse dose-dependent manner lessens diabetes-associated atherosclerosis and improves diabetic kidney disease*. Diabetes, 2014. **63**(9): p. 3091-103.
219. Nezu, M., et al., *Transcription factor Nrf2 hyperactivation in early-phase renal ischemia-reperfusion injury prevents tubular damage progression*. Kidney Int, 2017. **91**(2): p. 387-401.
220. Alam, J. and J.L. Cook, *How many transcription factors does it take to turn on the heme oxygenase-1 gene?* Am J Respir Cell Mol Biol, 2007. **36**(2): p. 166-74.
221. Jyrkkanen, H.K., et al., *Novel insights into the regulation of antioxidant-response-element-mediated gene expression by electrophiles: induction of the transcriptional repressor BACH1 by Nrf2*. Biochem J, 2011. **440**(2): p. 167-74.
222. Reichard, J.F., G.T. Motz, and A. Puga, *Heme oxygenase-1 induction by NRF2 requires inactivation of the transcriptional repressor BACH1*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(21): p. 7074-86.
223. Sun, J., et al., *Heme regulates the dynamic exchange of Bach1 and NF-E2-related factors in the Maf transcription factor network*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(6): p. 1461-6.
224. Suzuki, H., et al., *Heme regulates gene expression by triggering Crm1-dependent nuclear export of Bach1*. EMBO J, 2004. **23**(13): p. 2544-53.
225. Shang, G., et al., *Sulforaphane attenuation of experimental diabetic nephropathy involves GSK-3 $\beta$ /Fyn/Nrf2 signaling pathway*. J Nutr Biochem, 2015. **26**(6): p. 596-606.
226. Elbarbry, F., A. Vermehren-Schmaedick, and A. Balkowiec, *Modulation of arachidonic Acid metabolism in the rat kidney by sulforaphane: implications for regulation of blood pressure*. ISRN Pharmacol, 2014. **2014**: p. 683508.
227. Senanayake, G.V., et al., *The dietary phase 2 protein inducer sulforaphane can normalize the kidney epigenome and improve blood pressure in hypertensive rats*. Am J Hypertens, 2012. **25**(2): p. 229-35.
228. Huetteman, D.A. and H. Bogie, *Direct blood pressure monitoring in laboratory rodents via implantable radio telemetry*. Methods Mol Biol, 2009. **573**: p. 57-73.
229. Yang, J. and M.J. Young, *The mineralocorticoid receptor and its coregulators*. J Mol Endocrinol, 2009. **43**(2): p. 53-64.

230. Lopes, R.A., et al., *Downregulation of Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor and Associated Antioxidant Genes Contributes to Redox-Sensitive Vascular Dysfunction in Hypertension*. Hypertension, 2015. **66**(6): p. 1240-50.
231. Miyazaki, Y., et al., *Keap1 inhibition attenuates glomerulosclerosis*. Nephrol Dial Transplant, 2014. **29**(4): p. 783-91.
232. Klahr, S., *Obstructive nephropathy*. Intern Med, 2000. **39**(5): p. 355-61.
233. Afsar, B., et al., *Focus on renal congestion in heart failure*. Clin Kidney J, 2016. **9**(1): p. 39-47.
234. Wakabayashi, N., et al., *Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation*. Nat Genet, 2003. **35**(3): p. 238-45.
235. Zhang, P., et al., *Loss of Kelch-like ECH-associated protein 1 function in prostate cancer cells causes chemoresistance and radioresistance and promotes tumor growth*. Mol Cancer Ther, 2010. **9**(2): p. 336-46.
236. Kim, Y.R., et al., *Oncogenic NRF2 mutations in squamous cell carcinomas of oesophagus and skin*. J Pathol, 2010. **220**(4): p. 446-51.
237. Hisamichi, M., et al., *Role of bardoxolone methyl, a nuclear factor erythroid 2-related factor 2 activator, in aldosterone- and salt-induced renal injury*. Hypertens Res, 2018. **41**(1): p. 8-17.
238. Liu, M., et al., *The Nrf2 triterpenoid activator, CDDO-imidazolide, protects kidneys from ischemia-reperfusion injury in mice*. Kidney Int, 2014. **85**(1): p. 134-41.
239. Cui, W., et al., *Prevention of diabetic nephropathy by sulforaphane: possible role of Nrf2 upregulation and activation*. Oxid Med Cell Longev, 2012. **2012**: p. 821936.
240. Rhoden, A., et al., *Sulforaphane exposure impairs contractility and mitochondrial function in three-dimensional engineered heart tissue*. Redox Biol, 2021. **41**: p. 101951.
241. Rodrigues, D., et al., *Aldosterone Negatively Regulates Nrf2 Activity: An Additional Mechanism Contributing to Oxidative Stress and Vascular Dysfunction by Aldosterone*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(11).
242. Modlinger, P., et al., *RNA silencing in vivo reveals role of p22phox in rat angiotensin slow pressor response*. Hypertension, 2006. **47**(2): p. 238-44.
243. Kovac, S., et al., *Nrf2 regulates ROS production by mitochondria and NADPH oxidase*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1850**(4): p. 794-801.

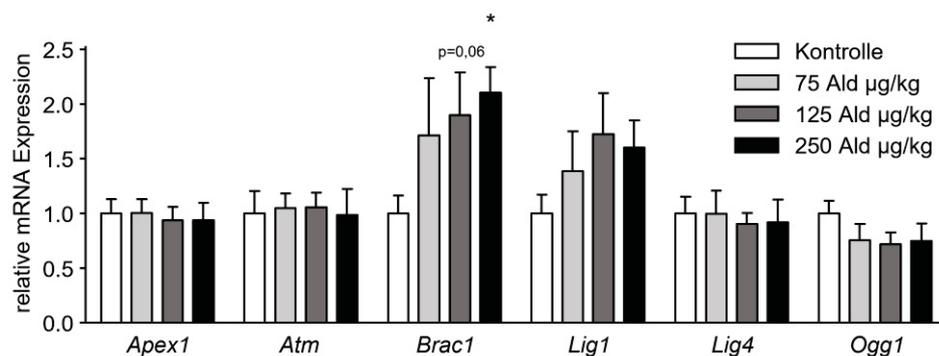
## 10. Anhang

### 10.1 Weiterführende Daten zum Dosisversuch zur Lokalisation der Nrf2-Aktivierung und Ald-induzierter Nierenschäden

Folgend werden zusätzliche Daten des Versuches zum Dosisversuch der Lokalisation der Nrf2-Aktivierung und Ald-induzierten Nierenschäden beschrieben.

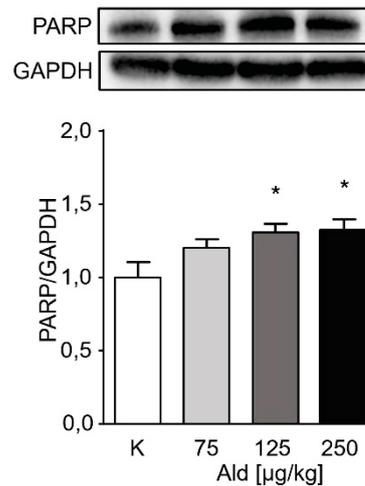
#### 10.1.1 Weiterführende Untersuchungen zur DNA-Reparatur

Weiterführend wurde, wie in 4.1.8 beschrieben, untersucht, ob die nachgewiesenen DNA-Schäden auch zu einer Induktion der DNA-Reparatur führten. Eine Untersuchung der Genexpression DNA-Reparatur assoziierter Gene zeigte eine tendenzielle Induktion für *Brac1* und *Lig1*. Diese war für *Brac1* in der höchsten Ald-Dosis sogar signifikant zur Kontrollgruppe. Für alle weiteren untersuchten Gene war keine Veränderung der mRNA-Expression zu beobachten (Abbildung 10.1).

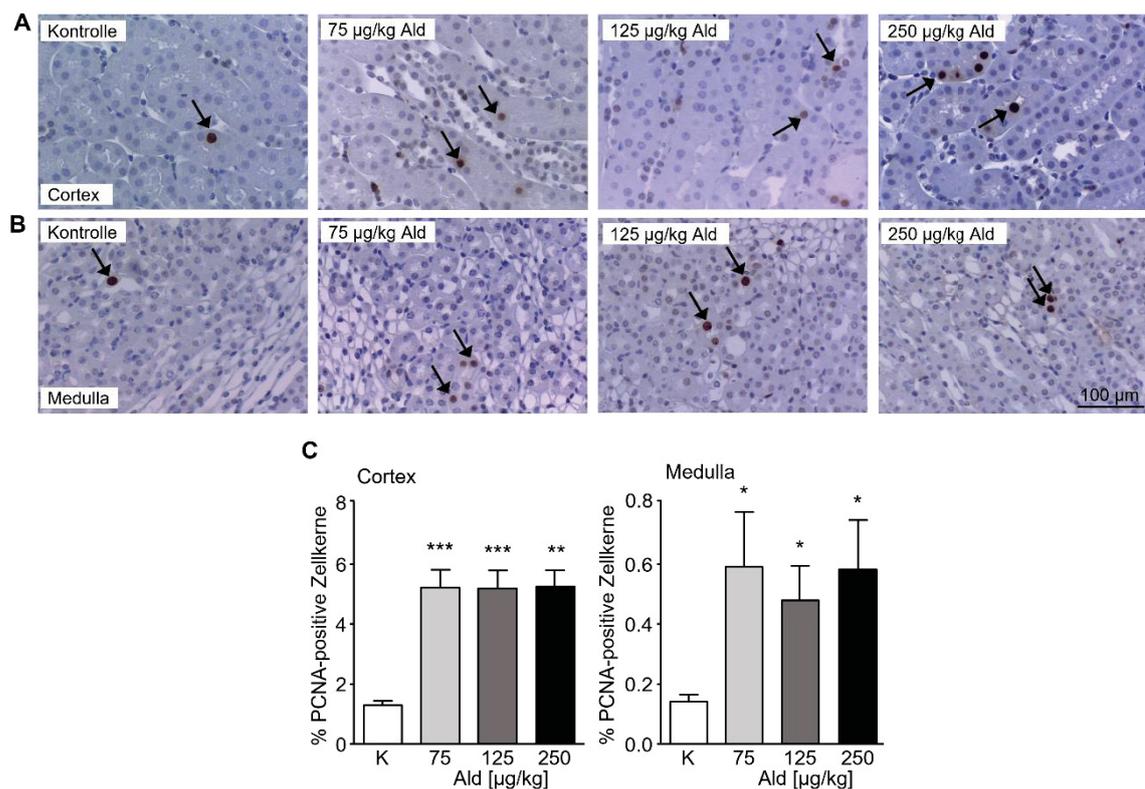


**Abbildung 10.1: mRNA-Expression von Genen, die mit der DNA-Schadensantwort verknüpft sind, in Aldosteron-infundierten Mäusen und Kontroll-Mäusen.** Die mRNA-Expression von *Apex1*, *Atm*, *Brac1*, *Lig1*, *Lig4* und *Ogg1* in den Nieren von Mäusen wurde mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Die RNA wurde aus den Nieren von Kontroll-Mäusen und von Mäusen denen Aldosteron infundiert wurde, isoliert. Die mRNA-Werte wurden auf *Gapdh* und  $\beta$ -*actin* als Referenz-Gene bezogen. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte + Standardfehler, n=5. \* $p \leq 0,05$  vs. Kontrolle. Ald: Aldosteron, *Apex1*: DNA-(apurinische/ apyrimidimische) Endonuklease 1, *Atm*: *Ataxia telangiectasia mutated*. *Brac1*: Brustkrebsgen 1, *Lig1*: Ligase 1, *Lig4*: Ligase 4, *Ogg1*: 8-Oxoguanin-Glykosylase 1, *Gapdh*: Glycerinaldehyde-3-phosphat-Dehydrogenase.

Eine Induktion der Expression von PARP konnte auf Proteinebene nachgewiesen werden. Dabei wurde für die Ald-infundierten Mäuse der mittleren und hohen Dosis ein signifikanter Unterschied zu Kontrolle beobachtet (Abbildung 10.2). Der Immunhistochemische Nachweis von PCNA zeigte ebenso eine signifikante Induktion der Proteinexpression in der Niere in allen Ald-Gruppen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe. Die höhere Anwesenheit von PCNA konnte sowohl im Cortex als auch in der Medulla gezeigt werden (Abbildung 10.3).



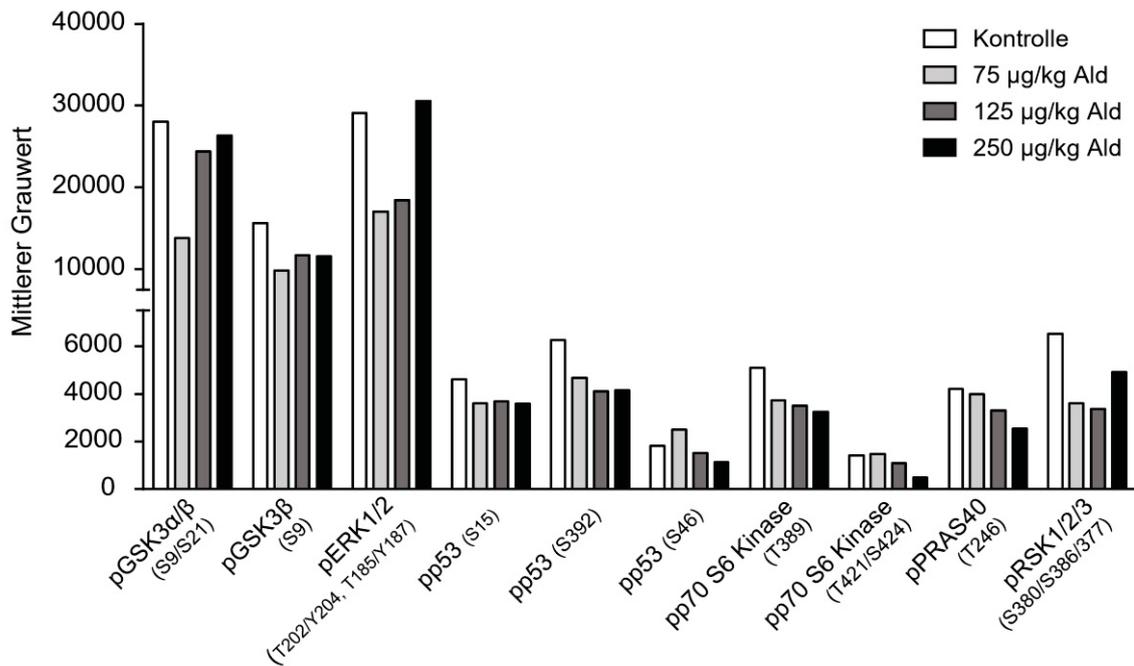
**Abbildung 10.2: Western Blots zum Nachweis von PARP in der Niere von Aldosteron-infundierten Mäusen und Kontroll-Mäusen.** Gezeigt sind Banden einer repräsentativen Membran und die Quantifizierung der Expression für PARP. Die Proben wurden jeweils auf das Referenzprotein GAPDH und anschließend auf die Kontroll-Mäuse normiert. Die Quantifizierung erfolgte mit ImageLab. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte + Standardfehler. n=5. \* $p \leq 0,05$  vs. Kontrolle. Ald: Aldosteron, GAPDH: Glyceraldehyde-3-Phosphat-Dehydrogenase, K: Kontrolle, PARP: Poly-(ADP-Ribose) Polymerase.



**Abbildung 10.3: Nachweis von PCNA auf dem Nierengewebe von Aldosteron-infundierten Mäusen und Kontroll-Mäusen.** Paraffinschnitte des Nierengewebes wurden mit einem Antikörper gegen PCNA immunhistochemisch angefärbt. A: Repräsentative Bilder im Nierencortex von Kontroll- und Aldosteron-infundierten Mäusen. PCNA-positive Zellkerne sind mit schwarzen Pfeilen markiert. B: Repräsentative Bilder in der Nierenmedulla von Kontroll- und Aldosteron-infundierten Mäusen. C: Ratio der PCNA-positiven Zellkerne normiert auf die Kontrolle. Für die Quantifizierung wurden 10 Gesichtsfelder des Nierencortex und 5 Gesichtsfelder der Nierenmedulla pro Tier mit Hilfe von Image J ausgewertet. Die Anzahl der PCNA-positiven Zellkernen wurde auf die Gesamtkernzahl des Bildes bezogen. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert + Standardfehler. n=5. 200x Vergrößerung, \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs. Kontrolle. Ald: Aldosteron, PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen, K: Kontrolle.

### 10.1.2 Weiterführende Daten zur Identifizierung Aldosteron-induzierter Signalwege

Für die Identifizierung weiterer Ald-induzierter Signalwege wurde ein Phospho-Kinase-Array durchgeführt, um den Phosphorylierungs-Status möglichst vieler Kinasen untersuchen zu können. Hierfür wurden Proteinisolate einer Maus pro Gruppe verwendet. Die Ergebnisse ausgewählter Kinasen ist in Abbildung 10.4 dargestellt. Der Array zeigte keine eindeutigen Ergebnisse für die Veränderung des Phosphorylierungs-Status der untersuchten Kinasen in den Ald-behandelten Mäusen im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen.



**Abbildung 10.4: Phosphorylierungs-Status der untersuchten Kinasen in Ald-infundierten und Kontroll-Mäusen.** Gezeigt ist die Quantifizierung der Phosphorylierungs-Status ausgewählter Kinasen mit ihren jeweiligen Phosphorylierungs-Stellen. Für den Nachweis wurden je Gruppe eine Maus ausgewählt und frisches Nierenprotein-Isolat hergestellt. Für die Durchführung wurden mehrere Membranen verwendet. Die Quantifizierung erfolgte mit ImageJ. Dargestellt ist der mittlere Grauwert nach Abzug des Hintergrunds. Ald: Aldosteron, pERK1/2: phosphorylierte *Extracellular-signal Regulated Kinase* 1/2, pGSKα/β: phosphorylierte Glykogensynthase-Kinase 3 α/β, pp53: phosphoryliertes p53, pp70 S6 Kinase: phosphorylierte p70 Sg Kinase, pPRAS40: phosphoryliertes 40 kDa Prolin-Reiches-AKT1-Substrat, pRSK1/2/3: phosphorylierte Ribosomale S6 Kinase 1/2/3, S: Serin, T: Threonin, Y: Tyrosin.

## 10.2 Weitere Daten zum Protektionsversuch zur Untersuchung der Relevanz der Nrf2-Aktivierung in der Protektion von Aldosteron-induzierten Nierenschäden

Folgend werden zusätzliche Daten des Protektionsversuches zur Relevanz der Nrf2-Aktivierung in der Protektion von Ald-induzierten Nierenschäden beschrieben.

### 10.2.1 Ergebnisse zur Untersuchung des Einflusses von Salz-haltigem Trinkwasser in den Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen

Um einen Einfluss des im Versuch verwendeten Trinkwassers (1 % NaCl) in den Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen auszuschließen, wurden zusätzlich Mäuse im gleichen Alter dieses Mausstammes in den Experimenten als Kontrollen mitgeführt. Die Ergebnisse dieser sind im Folgenden tabellarisch zusammengefasst. Für einen besseren direkten Vergleich sind die Ergebnisse für die WT- und Nrf2<sup>+</sup>-K-Gruppe mit aufgeführt (Tabelle 10.1-10.9). Zusammenfassend konnten keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Nrf2<sup>+</sup>-K Mäusen und den unbehandelten Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen (Nrf2<sup>+</sup> kein Salz) festgestellt werden. Daher ist bei den in dieser Dissertation untersuchten Endpunkten nicht von einem Effekt des 1 % NaCl-haltigen Trinkwassers auszugehen.

**Tabelle 10.1: Übersicht der Gewichtsparameter von Kontroll-Mäusen und unbehandelten Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen.** Gezeigt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. n=8. \*p $\leq$ 0,05 vs. WT K, Ald: Aldosteron, K: Kontrolle, Nrf2: *Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2*, WT: Wildtyp.

Parameter	WT-K	Nrf2 <sup>+</sup> -K	Nrf2 <sup>+</sup> kein Salz
Körpergewicht [g]	29,8 $\pm$ 0,5	28,0 $\pm$ 0,5	28,1 $\pm$ 1,0
Relatives Nierengewicht [% <sub>0</sub> ]	5,8 $\pm$ 0,1	7,6 $\pm$ 0,2*	7,3 $\pm$ 0,3
Relatives Herzgewicht [% <sub>0</sub> ]	4,9 $\pm$ 0,1	5,1 $\pm$ 0,2	5,0 $\pm$ 0,2

**Tabelle 10.2: Übersicht der Nierenfunktionsparameter von Kontroll-Mäusen und unbehandelten Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen.** Gezeigt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. n=5 für die Nrf2<sup>+</sup> kein Salz-Gruppe, n=8 für alle anderen Gruppen. \*p $\leq$ 0,05 vs. WT K, Ald: Aldosteron, KIM: *Kidney Injury Molecule-1*, K: Kontrolle, NGAL: Neutrophil Gelatinase-assoziiertes Lipocalin, Nrf2: *Nuclear factor-erythroid-2-related factor*, WT: Wildtyp.

Parameter	WT-K	Nrf2 <sup>+</sup> -K	Nrf2 <sup>+</sup> kein Salz
Hydronephrose	0/8	2/8	1/8
Albumin/Kreatinin [ $\mu$ g/mg]	36 $\pm$ 4	42 $\pm$ 8	49 $\pm$ 8
KIM-1/Kreatinin [pg/mg]	409 $\pm$ 102	129 $\pm$ 39	71 $\pm$ 19
NGAL/Kreatinin [ $\mu$ g/mg]	40 $\pm$ 3	51 $\pm$ 13	33 $\pm$ 5

**Tabelle 10.3: Semiquantitative Auswertung der Nierenmorphologie auf dem Nierencortex von Kontroll-Mäusen und unbehandelten Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen.** Die Auswertung erfolgte mit den entsprechenden Färbungen und Schädigungsscores (3.2.3.4+3.2.3.5). Gezeigt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. n=8. \*p $\leq$ 0,05 vs. WT K, Ald: Aldosteron, GSI: Glomeruloskleroseindex, K: Kontrolle, MSI: Mesangiolyseindex, Nrf2: *Nuclear factor-erythroid-2-related factor*, TSI: Tubulointerstitieller Schädigungsindex, WT: Wildtyp.

Parameter	WT-K	Nrf2 <sup>+</sup> -K	Nrf2 <sup>+</sup> kein Salz
TSI	0,32 $\pm$ 0,03	0,34 $\pm$ 0,04	0,23 $\pm$ 0,02
MSI	0,28 $\pm$ 0,03	0,21 $\pm$ 0,04	0,23 $\pm$ 0,04
GSI	0,70 $\pm$ 0,06	1,19 $\pm$ 0,17*	0,97 $\pm$ 0,08

**Tabelle 10.4: Übersicht zum Nachweis Ald-induzierter Gene, Proteine und DNA-Schäden in der Niere von Kontroll-Mäusen und unbehandelten Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen.** Die mRNA-Expression von  *$\alpha$ Enac* und *Nox2* in den Nieren von Mäusen wurde mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Die RNA wurde aus den Nieren der behandelten wildtypischen und transgenen Mäuse isoliert. Die mRNA-Werte wurden auf *Gapdh* und  *$\beta$ -actin* als Referenz-Gene bezogen. Die Proben wurden jeweils auf das Referenzprotein GAPDH und anschließend auf die wildtypischen Kontroll-Tiere normiert. Die Quantifizierung erfolgte mit dem Programm ImageLab. Für den Nachweis von DNA-Schäden wurden Paraffinschnitte des Nierengewebes mit einem Antikörper gegen  $\gamma$ H2AX, einem Marker für DNA-Schäden, immunhistochemisch angefärbt. Für die Quantifizierung wurden 10 Gesichtsfelder des Nierencortex und 5 Gesichtsfelder der Nierenmedulla pro Tier mit Hilfe von Image J ausgewertet. Die Ratio der  $\gamma$ H2AX-positiven Zellkerne wurde auf die Wildtyp-Kontrolle normiert. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. n=8. Ald: Aldosteron, GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate-Dehydrogenase, K: Kontrolle, Nrf2: *Nuclear factor-erythroid-2-related factor*, WT: Wildtyp.

Parameter	WT-K	Nrf2 <sup>+</sup> -K	Nrf2 <sup>+</sup> kein Salz
<i><math>\alpha</math>Enac</i> [relative mRNA-Expression]	1,00 $\pm$ 0,11	0,70 $\pm$ 0,06	0,72 $\pm$ 0,05
<i>Nox2</i> [relative mRNA-Expression]	1,00 $\pm$ 0,15	1,21 $\pm$ 0,14	0,93 $\pm$ 0,10
pp47phox [relative Protein-Expression]	1,00 $\pm$ 0,06	0,83 $\pm$ 0,10	0,95 $\pm$ 0,20
Ratio $\gamma$ H2AX-positive Zellkerne im Cortex	1,00 $\pm$ 0,21	2,11 $\pm$ 0,51	1,63 $\pm$ 0,42
Ratio $\gamma$ H2AX-positive Zellkerne in der Medulla	1,00 $\pm$ 0,29	1,07 $\pm$ 0,32	0,56 $\pm$ 0,17

**Tabelle 10.5: Übersicht zum Nachweis von Keap1 und Nrf2 in der Niere von Kontroll-Mäusen und unbehandelten Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen.** Die mRNA-Expression von *Keap1* und *Nrf2* in den Nieren von Mäusen wurde mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Die RNA wurde aus den Nieren der behandelten wildtypischen und transgenen Mäuse isoliert. Die mRNA-Werte wurden auf *Gapdh* und  *$\beta$ -actin* als Referenz-Gene bezogen. Die analysierten Proteine wurden jeweils auf das Referenzprotein GAPDH oder  $\alpha$ -Tubulin und anschließend auf die wildtypischen Kontroll-Tiere normiert. Die Quantifizierung erfolgte mit dem Programm ImageLab. Für den Nachweis von Nrf2 wurden Paraffinschnitte des Nierengewebes mit einem Antikörper gegen Nrf2 immunhistochemisch angefärbt. Für die Quantifizierung wurden 10 Gesichtsfelder des Nierencortex und 5 Gesichtsfelder der Nierenmedulla pro Tier mit Hilfe von Image J ausgewertet. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. n=8. Ald: Aldosteron, GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate-Dehydrogenase, Keap1: Kelch-ähnliches ECH-assoziiertes Protein 1, K: Kontrolle, Nrf2: *Nuclear factor-erythroid-2-related factor*, WT: Wildtyp.

Parameter	WT-K	Nrf2 <sup>+</sup> -K	Nrf2 <sup>+</sup> kein Salz
<i>Keap1</i> [relative mRNA-Expression]	1,00 $\pm$ 0,13	0,32 $\pm$ 0,05*	0,31 $\pm$ 0,02
Keap1 [relative Protein-Expression]	1,00 $\pm$ 0,06	0,48 $\pm$ 0,04*	0,52 $\pm$ 0,03
<i>Nrf2</i> [relative mRNA-Expression]	1,00 $\pm$ 0,13	0,89 $\pm$ 0,09	0,87 $\pm$ 0,07
Nrf2 [relative Protein-Expression]	1,00 $\pm$ 0,08	1,25 $\pm$ 0,13	1,27 $\pm$ 0,25
Nrf2-positive Fläche im Cortex [%]	6,20 $\pm$ 0,25	5,12 $\pm$ 0,50	4,82 $\pm$ 0,33
Nrf2-positive Fläche in der Medulla [%]	35,46 $\pm$ 1,62	39,07 $\pm$ 1,51	36,68 $\pm$ 1,10

**Tabelle 10.6: Übersicht zu den Untersuchungen zur Aktivierung und Translokation von Nrf2 in der Niere von Kontroll-Mäusen und unbehandelten Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen.** Für den Nachweis von phosphoryliertem Nrf2 an

Serin 40 und somit aktivem Nrf2 wurden Paraffinschnitte des Nierengewebes mit einem Antikörper gegen pNrf2, immunhistochemisch angefärbt. Für die Quantifizierung wurden 10 Gesichtsfelder des Nierencortex und 5 Gesichtsfelder der Nierenmedulla pro Tier mit Hilfe von Image J ausgewertet. Der prozentuale Anteil der pNrf2-positiven Zellkerne wurde in Relation zur gesamten Anzahl der Zellkerne gesetzt. Für eine genauere Untersuchung der Nrf2 und pNrf2 Lokalisation wurden Kern- und Cytosolfractionen aus Nierenhomogenaten gewonnen. Die Proben wurden jeweils auf das Referenzprotein GAPDH (Cytosol) oder Lamin B2 (Kern) und anschließend auf die Kontroll-Tiere normiert. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. n=7 für Nrf2<sup>+</sup>-K bezüglich der Kernfraktion, n=8 für alle anderen Gruppen. Ald: Aldosteron, GAPDH: Glycerinaldehyde 3-phosphate-Dehydrogenase, K: Kontrolle, Nrf2: *Nuclear factor-erythroid-2-related factor*, WT: Wildtyp.

Parameter	WT-K	Nrf2 <sup>+</sup> -K	Nrf2 <sup>+</sup> kein Salz
pNrf2-positive Zellkerne im Cortex [%]	33,02 $\pm$ 1,30	39,11 $\pm$ 2,06	44,61 $\pm$ 3,73
pNrf2-positive Zellkerne in der Medulla [%]	33,71 $\pm$ 5,98	41,69 $\pm$ 4,07	45,99 $\pm$ 2,96
Nrf2-Proteingehalt in der Cytosolfraction	1,00 $\pm$ 0,10	1,30 $\pm$ 0,17	1,58 $\pm$ 0,28
Nrf2-Proteingehalt in der Kernfraktion	1,00 $\pm$ 0,03	2,12 $\pm$ 0,58	1,38 $\pm$ 0,31
pNrf2-Proteingehalt in der Cytosolfraction	1,00 $\pm$ 0,04	0,91 $\pm$ 0,18	0,83 $\pm$ 0,14
pNrf2-Proteingehalt in der Kernfraktion	1,00 $\pm$ 0,11	1,50 $\pm$ 0,09	1,02 $\pm$ 0,17

**Tabelle 10.7: Übersicht zum Nachweis Nrf2-induzierter Gene und Proteine in der Niere von Kontroll-Mäusen und unbehandelten Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen.** Die mRNA-Expression von *Nqo1*, *Trxr1*, *Ho1*, *Sod1*, *Gclm* und *Gpx1* in den Nieren von Mäusen wurde mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Die RNA wurde aus den Nieren der behandelten wildtypischen und transgenen Mäuse isoliert. Die mRNA-Werte wurden auf *Gapdh* und  $\beta$ -*actin* als Referenz-Gene bezogen. Die analysierten Proteine wurden jeweils auf das Referenzprotein GAPDH und anschließend auf die wildtypischen Kontroll-Tiere normiert. Die Quantifizierung erfolgte mit dem Programm ImageLab. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. n=8. Ald: Aldosteron, *Gapdh*: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, GCLC: Glutamat-Cysteinligase katalytische Untereinheit, *Gclm*: Glutamat-Cystein Ligase regulatorische Untereinheit, *Gpx1*: Glutathionperoxidase 1, HO-1: Hämoxigenase 1, K: Kontrolle, NQO1: NAD(P)H-(Chinone) Dehydrogenase 1, Nrf2: *Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2*, *Sod1*: Superoxiddismutase 1, Sulf: Sulforaphan, TRXR1: Thioredoxinreduktase, WT: Wildtyp.

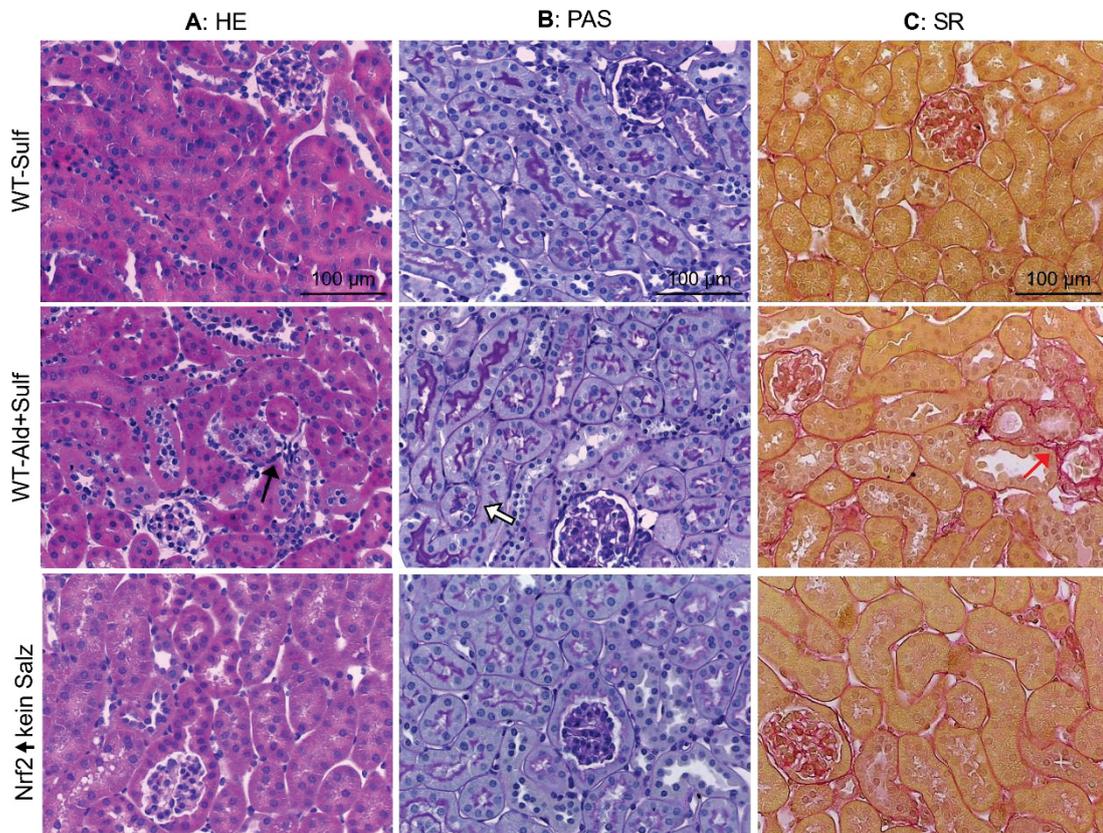
Parameter	WT-K	Nrf2 <sup>+</sup> -K	Nrf2 <sup>+</sup> kein Salz
NQO1 [relative Protein-Expression]	1,00 $\pm$ 0,03	3,48 $\pm$ 0,31*	4,25 $\pm$ 0,27
<i>Nqo1</i> [relative mRNA-Expression]	1,00 $\pm$ 0,13	2,89 $\pm$ 0,34*	3,13 $\pm$ 0,27
TRXR1 [relative Protein-Expression]	1,00 $\pm$ 0,04	1,31 $\pm$ 0,14	1,32 $\pm$ 0,20
<i>Trxr1</i> [relative mRNA-Expression]	1,00 $\pm$ 0,12	1,43 $\pm$ 0,22	1,52 $\pm$ 0,27
HO-1 [relative Protein-Expression]	1,00 $\pm$ 0,09	0,90 $\pm$ 0,09	0,99 $\pm$ 0,31
<i>Ho-1</i> [relative mRNA-Expression]	1,00 $\pm$ 0,14	0,80 $\pm$ 0,11	0,98 $\pm$ 0,10
SOD1 [relative Protein-Expression]	1,00 $\pm$ 0,11	1,09 $\pm$ 0,12	1,13 $\pm$ 0,14
<i>Sod1</i> [relative mRNA-Expression]	1,00 $\pm$ 0,10	1,14 $\pm$ 0,17	1,00 $\pm$ 0,08
GCLC [relative Protein-Expression]	1,00 $\pm$ 0,11	1,38 $\pm$ 0,21	1,30 $\pm$ 0,35
<i>Gclm</i> [relative mRNA-Expression]	1,00 $\pm$ 0,08	0,86 $\pm$ 0,10	0,79 $\pm$ 0,06
<i>Gpx1</i> [relative mRNA Expression]	1,00 $\pm$ 0,11	1,03 $\pm$ 0,14	0,92 $\pm$ 0,07

**Tabelle 10.8: Übersicht zu den Untersuchungen der Keap1-unabhängigen Nrf2-Regulation in der Niere von Kontroll-Mäusen und unbehandelten Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen.** Die mRNA-Expression von *Gsk3β* in den Nieren von Mäusen wurde mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Die RNA wurde aus den Nieren der behandelten wildtypischen und transgenen Mäuse isoliert. Die mRNA-Werte wurden auf *Gapdh* und *β-actin* als Referenz-Gene bezogen. Der gemessene Anteil an phosphorylierten und somit inaktiven Gsk3β wurde gegen seine nicht modifizierte Form und anschließend auf die Wildtyp-Kontrolle normiert. Für eine genauere Untersuchung der Bach1, Gsk3β und Fyn-Lokalisation wurden Kern- und Cytosolfractionen aus Nierenhomogenaten gewonnen.. Die nachgewiesenen Proteine wurden jeweils auf das Referenzprotein GAPDH (Cytosol) oder Lamin B2 (Kern) und anschließend auf die Kontroll-Tiere normiert. Die Quantifizierung erfolgte mit dem Programm ImageLab. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert ± Standardfehler. n=7 für Nrf2<sup>+</sup>-K bezüglich der Kernfraktion, n=8 für alle anderen Gruppen. Ald: Aldosteron, Bach1: *BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 1*, Gapdh: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, Gsk3β: Glykogensynthase-Kinase 3β, Nrf2: *Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2*, WT: Wildtyp.

Parameter	WT-K	Nrf2 <sup>+</sup> -K	Nrf2 <sup>+</sup> kein Salz
Bach1-Proteingehalt in der Cytosolfraction	1,00 ± 0,06	0,92 ± 0,06	1,01 ± 0,11
Bach1-Proteingehalt in der Kernfraktion	1,00 ± 0,09	1,38 ± 0,39	1,10 ± 0,24
Relation pGSK3β/GSK3β	1,00 ± 0,13	2,91 ± 1,00	2,00 ± 0,49
GSK3β [relative mRNA-Expression]	1,00 ± 0,11	1,03 ± 0,13	0,97 ± 0,10
GSK3β-Proteingehalt in der Kernfraktion	1,00 ± 0,12	1,42 ± 0,40	0,94 ± 0,17
Fyn-Proteingehalt in der Kernfraktion	1,00 ± 0,08	0,62 ± 0,08*	0,85 ± 0,20

### 10.2.2 Weiterführende Daten zur Nierenmorphologie

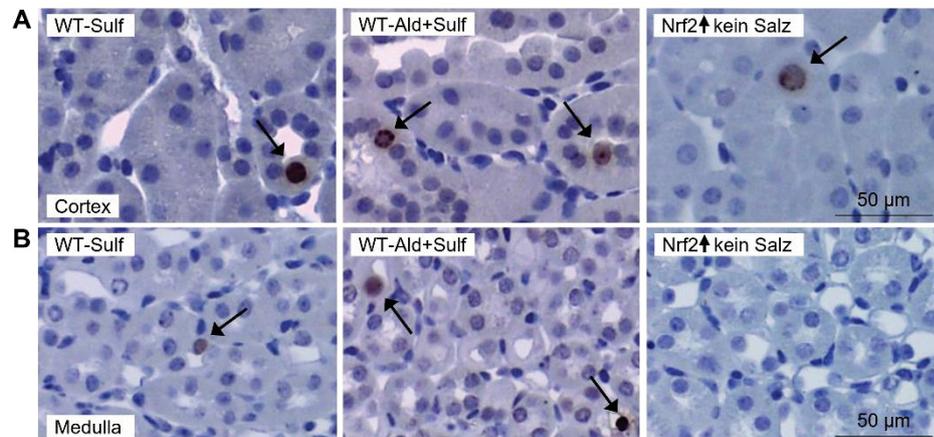
In Abbildung 10.5 sind repräsentative Bilder der histopathologischen Färbungen der WT-Sulf und WT-Ald+Sulf Gruppe und unbehandelten Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen (Nrf2<sup>+</sup> kein Salz) dargestellt.



**Abbildung 10.5: Histopathologische Veränderungen im Nierencortex der mit Sulforaphan behandelten Wildtyp und unbehandelten Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen.** **A:** Repräsentative Bilder der HE-gefärbten Nieren für die Visualisierung inflammatorischer Regionen. **B:** Repräsentative Bilder der PAS-gefärbten Nieren zur Visualisierung der Basalmembran-Atrophie. **C:** Repräsentative Bilder der SR-gefärbten Nieren zur Visualisierung von Kollagenablagerungen. Die schwarzen Pfeile zeigen in das Gewebe migrierte Leukozyten als Marker für eine beginnende Inflammation. Weiße Pfeile: Beispiele für eine Atrophie der Basalmembranen. Rote Pfeile: Kollagenablagerungen. 200x Vergrößerung. Ald: Aldosteron, HE: Hämatoxylin-Eosin, PAS: Periodic-acid-Schiff, Nrf2: *Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2*, SR: Sirius-Rot, WT: Wildtyp.

### 10.2.3 Weiterführende Daten zum Nachweis von DNA-Schäden

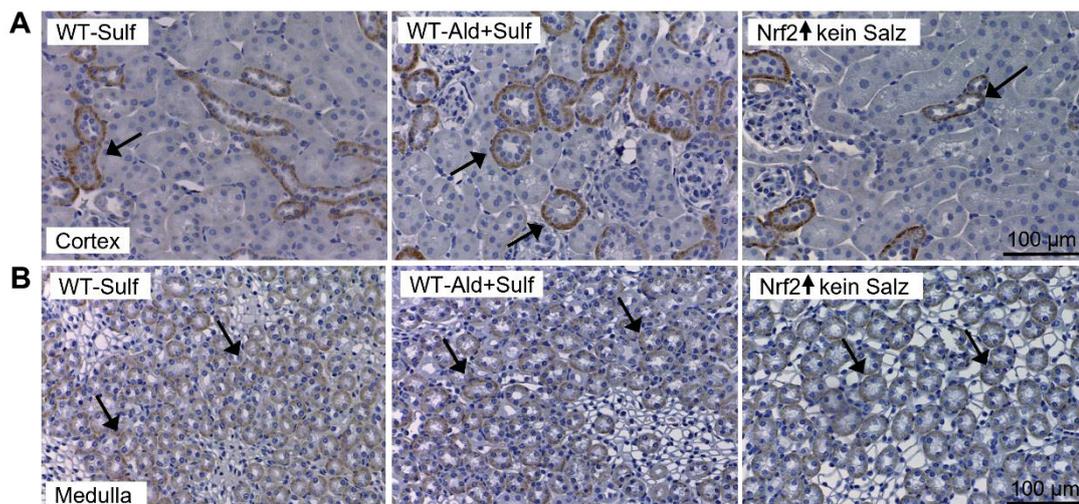
In Abbildung 10.6 sind repräsentative Bilder des immunhistochemischen Nachweises des DNA-Schadensmarkers  $\gamma$ H2AX im Nierengewebe der mit Sulf und Ald+Sulf behandelten WT-Mäuse und der unbehandelten  $\text{Nrf2}^{\uparrow}$ -Mäuse ( $\text{Nrf2}^{\uparrow}$  kein Salz) abgebildet.



**Abbildung 10.6:  $\gamma$ H2AX-Färbung zum Nachweis von DNA-Schäden in der Niere Sulforaphan behandelter Wildtyp und unbehandelten  $\text{Nrf2}^{\uparrow}$ -Mäuse.** Paraffinschnitte des Nierengewebes wurden mit einem Antikörper gegen  $\gamma$ H2AX, einem Marker für DNA-Schäden, immunhistochemisch angefärbt. **A:** Repräsentative Bilder im Nierencortex von mit Sulf, mit Sulf und Ald behandelten Wildtyp-Mäusen und unbehandelten  $\text{Nrf2}^{\uparrow}$ -Mäusen. **B:** Repräsentative Bilder in der Nierenmedulla von mit Sulf, mit Sulf und Ald behandelten Wildtyp-Mäusen und unbehandelten  $\text{Nrf2}^{\uparrow}$ -Mäusen.  $\gamma$ H2AX-positive Zellkerne sind mit schwarzen Pfeilen markiert. 200x Vergrößerung. Ald: Aldosteron, K: Kontrolle, Nrf2: *Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2*, Sulf: Sulforaphan.

#### 10.2.3.1 Weiterführende Abbildungen zur Expression von Nrf2

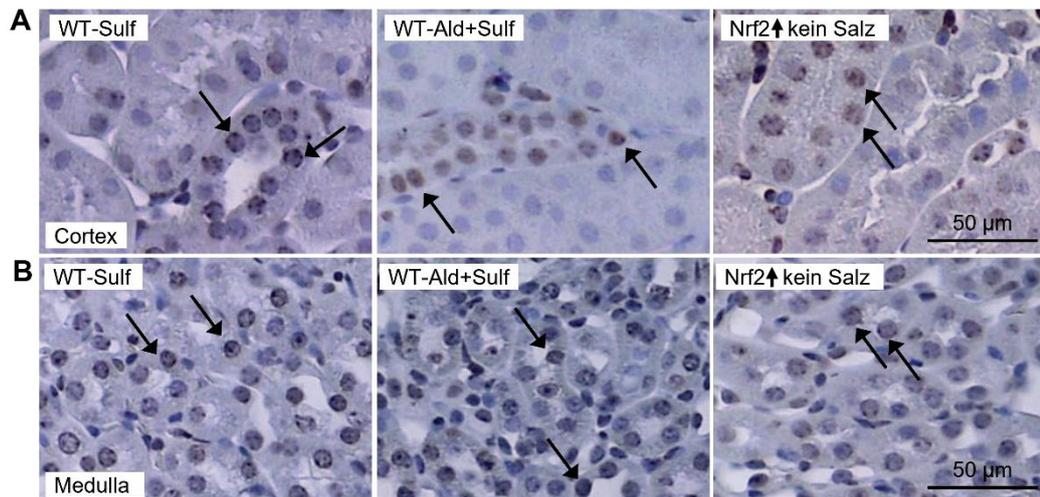
Repräsentative Bilder des immunhistochemischen Nachweises von Nrf2 in der Niere von Mäusen der Gruppen WT-Sulf, WT-Ald+Sulf und  $\text{Nrf2}^{\uparrow}$  kein Salz sind in Abbildung 10.7 gezeigt.



**Abbildung 10.7: Nachweis von Nrf2 auf Nierengewebe von Sulforaphan behandelten Wildtyp und unbehandelten  $\text{Nrf2}^{\uparrow}$ -Mäusen.** Paraffinschnitte des Nierengewebes wurden mit einem Antikörper gegen Nrf2 immunhistochemisch angefärbt. **A:** Repräsentative Bilder im Nierencortex von mit Sulf, mit Sulf und Ald behandelten Wildtyp-Mäusen und unbehandelten  $\text{Nrf2}^{\uparrow}$ -Mäusen. **B:** Repräsentative Bilder in der Nierenmedulla von mit Sulf, mit Sulf und Ald behandelten Wildtyp-Mäusen und unbehandelten  $\text{Nrf2}^{\uparrow}$ -Mäusen. Nrf2-positive Flächen sind mit schwarzen Pfeilen markiert. 200x Vergrößerung. Ald: Aldosteron, K: Kontrolle, Nrf2: *Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2*, Sulf: Sulforaphan.

### 10.2.4 Weiterführende Abbildungen zur Phosphorylierung und Translokation von Nrf2

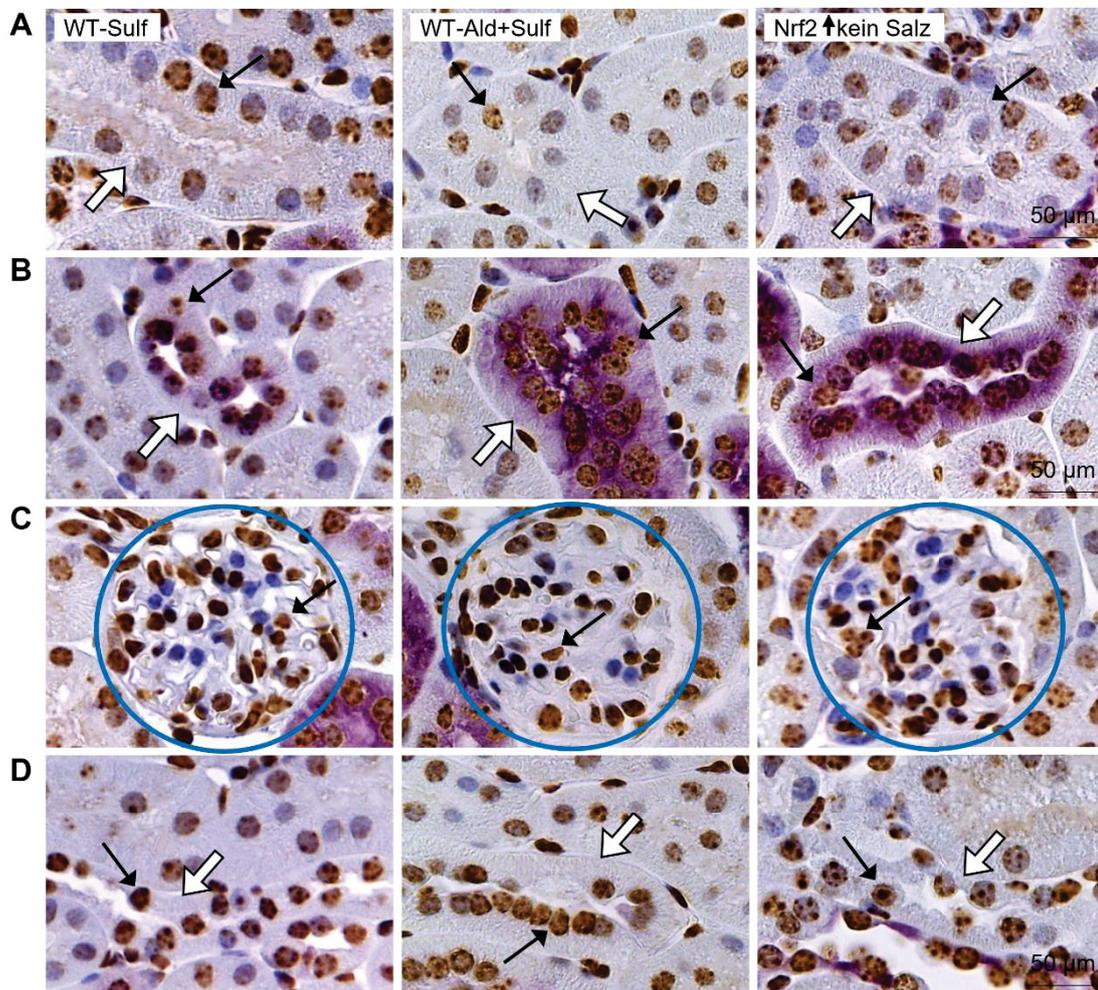
In Abbildung 10.8 sind repräsentative Bilder des immunhistochemischen Nachweises des phosphorylierten Nrf2 an Serin 40 (pNrf2) im Nierengewebe der mit Sulf und Ald+Sulf behandelten WT-Mäuse und der unbehandelten Nrf2<sup>↑</sup>-Mäuse (Nrf2<sup>↑</sup> kein Salz) abgebildet.



**Abbildung 10.8: pNrf2-Färbung zum Nachweis der Aktivierung und Akkumulation auf Nierengewebe von Sulforaphan behandelten Wildtyp und unbehandelten Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen.** Paraffinschnitte des Nierengewebes wurden mit einem Antikörper gegen das an Serin 40 phosphorylierte Nrf2 immunhistochemisch angefärbt. **A:** Repräsentative Bilder im Nierencortex von mit Sulf, mit Sulf und Ald behandelten Wildtyp-Mäusen und unbehandelten Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen. **B:** Repräsentative Bilder in der Nierenmedulla von mit Sulf, mit Sulf und Ald behandelten Wildtyp-Mäusen und unbehandelten Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen. pNrf2-positive Zellkerne sind mit schwarzen Pfeilen markiert. 200x Vergrößerung. Ald: Aldosteron, K: Kontrolle, Nrf2: *Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2*, Sulf: Sulforaphan.

### 10.2.5 Weiterführende Abbildungen zur Lokalisierung der Nrf2-Aktivierung

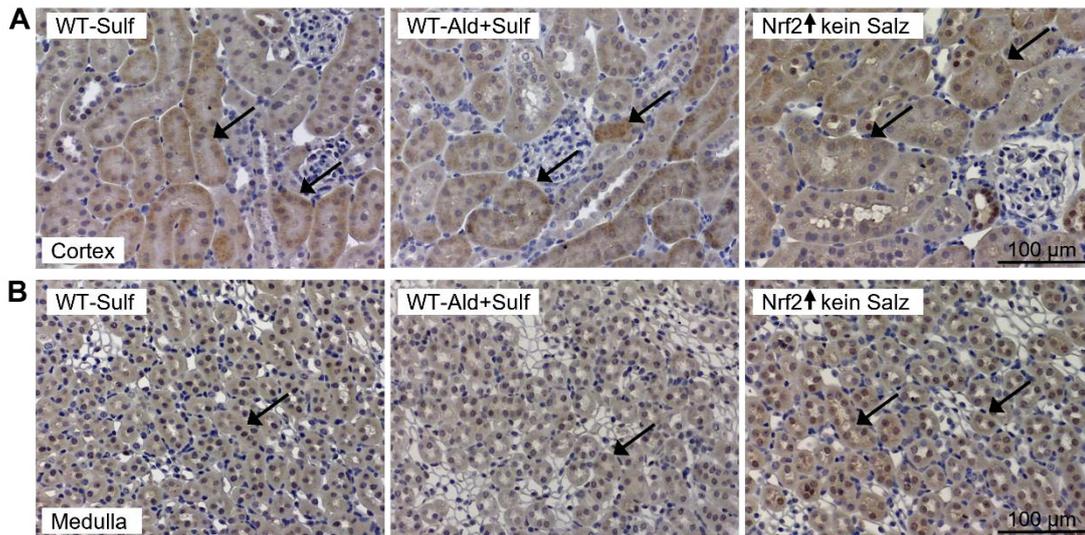
In Abbildung 10.9 sind repräsentative Bilder der immunhistochemischen Lokalisation von pNrf2 im Nierencortex der mit Sulf und Ald+Sulf-behandelten WT-Mäuse und der unbehandelten Nrf2<sup>+</sup>-Mäuse ohne Salz zu finden.



**Abbildung 10.9: pNrf2-Calbindin Doppelfärbung zur Lokalisierung der Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 im Nierencortex von Sulforaphan behandelten Wildtyp und unbehandelten Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen.** A-D: Repräsentative Bilder für die Lokalisation von pNrf2 in den Nierenzellen. Die Doppelfärbungen wurden auf Paraffinschnitten der Nieren von Wildtyp und Nrf2<sup>+</sup>-Mäusen nach 28-tägiger Behandlung durchgeführt. Für die Doppelfärbungen wurde ein Antikörper gegen pNrf2, der an Ser40 phosphoryliert und somit aktiviertes Nrf2 (pNrf2) bindet, (braune Färbung) und Calbindin (lila Färbung), ein Marker für distale Tubuluszellen und Zellen des oberen Sammelrohres verwendet. Die weißen Pfeile zeigen auf den jeweilig identifizierten Tubulusabschnitt und die schwarzen Pfeile auf pNrf2-positive Zellkerne. **A:** Proximale Tubuli wurden anhand ihres Bürstensaumen identifiziert. **B:** Calbindin, ein Marker für distale Tubuluszellen und Zellen des oberen Sammelrohres. **C:** Glomeruli wurden über ihre Struktur identifiziert und mit blauen Kreisen eingrahmt. **D:** Sammelrohre wurden anhand ihres Lumens über die ausgebliebenen Färbung identifiziert. 400x Vergrößerung. Ald: Aldosteron, K: Kontrolle, Nrf2: *nuclear factor-erythroid-2-related factor 2*, pNrf2: phosphoryliert an Ser40, Sulf: Sulforaphan, WT: Wildtyp.

### 10.2.6 Weiterführende Abbildungen zur Expression von Nrf2-regulierten Zielgenen und -proteinen

Repräsentative Bilder des immunhistochemischen Nachweises von NQO1 auf dem Nierengewebe von Sulforaphan behandelten WT-Mäusen und den unbehandelten (kein Salz) Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen sind in Abbildung 10.10 zu finden.



**Abbildung 10.10: Nachweis von NQO1 auf Nierengewebe von Sulforaphan behandelten Wildtyp und unbehandelten Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen.** Paraffinschnitte des Nierengewebes wurden mit einem Antikörper gegen NQO1 immunhistochemisch angefärbt. **A:** Repräsentative Bilder im Nierencortex von mit Sulf, mit Sulf+Ald behandelten Wildtyp-Mäusen und unbehandelten Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen. **B:** Repräsentative Bilder in der Nierenmedulla von mit Sulf, mit Sulf+Ald behandelten Wildtyp-Mäusen und unbehandelten Nrf2<sup>↑</sup>-Mäusen. NQO1-positive Flächen sind mit schwarzen Pfeilen markiert. 200x Vergrößerung. Ald: Aldosteron, K: Kontrolle, Nrf2: *Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2*, Sulf: Sulforaphan.

## 10.3 Publikationen und Kongressbeiträge

### 10.3.1 Liste der Publikationen von Erst-Autorenschaften

Aus Prioritätsgründen wurden Teile dieser Arbeit unter folgenden Titeln bereits publiziert:

**Brinks R**, Wruck C J, Schmitz J, Schupp N, *Nrf2 activation does not protect from aldosterone-induced kidney damage in mice.*

Status: Eingereicht bei *Antioxidants*

#### **Auflistung des Eigenanteils an der Publikation:**

##### Schreiben:

Mitverfassen der Einleitung, des Methodenteils, der Ergebnisse und der Diskussion.

##### Abbildungen:

Abbildungen 1-4 und 7: Durchführung der zugehörigen Experimente, sowie Auswertung der Ergebnisse und Erstellen der Abbildungen.

Abbildung 5: Durchführung der zugehörigen Experimente mit Kerstin De Mezzo und Cornelia Hirsch, alleinige Auswertung der Ergebnisse und Erstellen der Abbildungen.

Abbildung 6: Durchführung der zugehörigen Experimente mit Cornelia Hirsch, alleinige Auswertung der Ergebnisse und Erstellen der Abbildungen.

##### Tabellen:

Tabelle 1: Durchführung der zugehörigen Experimente, sowie Auswertung der Ergebnisse und Erstellen der Abbildungen.

**Balhorn R**, Hartmann C, Schupp N, *Aldosterone Induces Mainly DNA Damage and Activation of Nrf2 Mainly in Tubuli of Mouse Kidneys.* Int J Mol Sci, 2020. 30;21(13):4679.

Status: Veröffentlicht

#### **Auflistung des Eigenanteils an der Publikation:**

##### Schreiben:

Mitverfassen des Methodenteils, der Ergebnisse und der Diskussion.

Abbildungen:

Abbildungen 3, 4, 6 und 7: Durchführung der zugehörigen Experimente, sowie Auswertung der Ergebnisse und Erstellen der Abbildungen.

Abbildung 1: Durchführung der zugehörigen Experimente mit Andrea Hassel, alleinige Auswertung der Ergebnisse Erstellung der Abbildungen.

Abbildungen 2, 5 und 8: Durchführung der zugehörigen Experimente und Auswertung der Ergebnisse mit Andrea Hassel, alleinige Erstellung der Abbildungen.

Tabellen:

Tabelle 1: Durchführung der zugehörigen Experimente, sowie Auswertung der Ergebnisse und Erstellen der Abbildungen.

Tabelle 2: Durchführung der zugehörigen Experimente und Auswertung der Ergebnisse mit Andrea Hassel, alleiniges Zusammentragen der Daten.

**10.3.2 Lister der Publikationen weiterer Autorenschaften**

Zimnol A, Spicker N, **Balhorn R**, Schröder K, Schupp N, *The NADPH Oxidase Isoform 1 Contributes to Angiotensin II-Mediated DNA Damage in the Kidney*. *Antioxidants*, 2020. 5;9(7):586.

**10.3.3 Liste der Kongressteilnahmen**

## 10.3.3.1 Vorträge

**Brinks R**, Wruck C J, Schupp N, *Effects of genetic or pharmacological Nrf2 activation on aldosterone-induced kidney damage in mice*, 7th German Pharm-Tox Summit, 2022.

**Balhorn R**, Schupp N, *Aldosterone-induced oxidative damage does not result in an upregulation of Nrf2 target genes in mouse kidneys*. GUM-Workshop "Nachwuchsförderung", 2021.

## 10.3.3.2 Posterpräsentationen

**Balhorn R**, Schupp N, *Aldosterone-induced phosphorylation of Nrf2 and its subsequent translocation into the nucleus does not lead to upregulation of Nrf2 target genes in tubuli of mouse kidneys*". 27<sup>th</sup> Annual Conference of the Society for Redox Biology and Medicine (SfRBM), 2020.

**Balhorn R**, Schupp N, *Aldosterone infusion induces renal damage and activation of Nrf2 in distal tubule cells in kidneys of mice*, 5<sup>th</sup> German Pharm-Tox Summit, 2020.

**Balhorn R**, Schupp N, *Aldosterone infusion induces renal damage and activation of Nrf2 in distal tubule cells in the kidney of mice*, 31<sup>st</sup> GUM Meeting, 2019.

**Balhorn R**, Hartmann C, Schupp N, *Aldosterone infusion induces renal damage and the activation of the key regulator Nrf2 in kidney cells of mice*, 7<sup>th</sup> Symposium of the Young Physiologists and Pharmacologists, 2019.

## 11. Danksagung

Allen voran geht mein erster Dank an Frau Prof. Dr. Nicole Schupp und Herrn Prof. Dr. Gerhard Fritz für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit zu diesem spannenden und herausfordernden Thema am Institut für Toxikologie anfertigen zu dürfen.

Vielen Dank Nicole für deine großartige Betreuung, deine stets offene Tür und deine stetige Motivation in Phasen in denen es einmal nicht so gut lief. Du hast mir immer das positive Gefühl gegeben, dass wir das schon hinbekommen.

Außerdem bedanke ich mich bei Prof. Dr. Stephanie Lärer aus dem Institut für Klinische Pharmazie und Pharmakotherapie für die Bereitschaft, meine Doktorarbeit als Zweitgutachter zu betreuen.

Vielen Dank an Herrn PD Dr. Christoph Jan Wruck aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der RWTH Aachen für die Bereitstellung der transgenen Mäuse und die gute Zusammenarbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Toxis für die schönen vier Jahre im Institut bedanken. Vielen Dank für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Hilfe bei allen theoretischen und praktischen Fragen. Bei eigen möchte ich mich noch einmal persönlich bedanken (in alphabetischer Reihenfolge:

Andrea: Bei Dir möchte ich mich für Deinen Einsatz und für Deine Begeisterung an der Laborarbeit bedanken. Vielen Dank für Deine Hilfe!

Christina: Danke, für die wundervolle Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die hervorragende Einarbeitung!

Cornelia: Danke, für Deine Unterstützung in der herausforderndsten und stressigsten Zeit meiner Doktorarbeit!

Kerstin: Ich danke dir für deine Hilfsbereitschaft und deine stetige Unterstützung während der gesamten Phase meiner Doktorarbeit!

Weiterhin möchte ich mich bei Jana, Julia, Lena, Marlena und Nirina für alles im und außerhalb des Labors bedanken. Gerade in herausfordernden Abschnitten war es Balsam für meine Seele, dass Ihr stets ein offenes Ohr hattet und mich aufgemuntert habt. Danke!

Vielen Dank auch an Anne und Evgenia für die Mühen bei der Korrektur dieser Arbeit und auch die emotionale Unterstützung und vor allem Danke für diese wunderbare Freundschaft!

Zuletzt gilt mein Dank meiner Familie: Danke für eure bedingungslose Unterstützung in jeglicher Hinsicht und dafür, dass ihr mir immer wieder zeigt, was wirklich im Leben zählt und dass es wesentlich wichtigere Dinge im Leben gibt als ein erfolgreiches Experiment.

Ein besonderer Dank gilt meinem Mann Jan. Vielen Dank für deine stetige Motivation und Aufmunterung während meines gesamten Studiums und dass du mir immer das Gefühl gegeben hast, nicht allein zu sein. Bei dir kann ich der Mensch sein, der ich wirklich bin. Ohne dich hätte ich das niemals geschafft.

Widmen möchte ich diese Arbeit meinen Eltern - Danke, dass ihr mir immer das Gefühl gebt etwas Besonderes zu sein.

## 12. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Diese Dissertation wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form, abgesehen von den angegebenen Publikationen, bei keiner anderen Fakultät zum Prüfungsverfahren vorgelegt oder veröffentlicht.

Ich habe keine vorherigen erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 17.01.2023

Ronja Brinks