

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin IV

(Schwerpunkt: Diabetologie, Endokrinologie und Nephrologie)

Sektion Nieren- und Hochdruckkrankheiten

**Auswirkung der Insulinresistenz auf die akute Wirkung von  
Insulin auf renal-tubuläre Funktionen**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Emektar, Nuray, geb. Karaca**

**2022**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Artunc
2. Berichterstatter: Professorin Dr. O. Garaschuk

Tag der Disputation: 17.01.2022

## INHALTSVERZEICHNIS

---

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis .....	III
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis .....	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Insulinresistenz.....	2
1.1.1 Insulin.....	2
1.1.2 Klassische insulinsensitive Organe und Folgen der Insulinresistenz .....	3
1.2 Die Niere- ein ebenfalls insulinsensitives Organ .....	5
1.2.1 Wirkung von Insulin auf die Niere.....	6
1.2.2 Folgen der renalen Insulinresistenz .....	6
1.3 Die Wirkung von Insulin und der Einfluss der Insulinresistenz auf renal-tubuläre Funktionen.....	8
1.3.1 Proximaler Tubulus.....	8
1.3.2 Henle-Schleife.....	13
1.3.3 Distaler Tubulus .....	15
1.3.4 Sammelrohr.....	18
1.4 Fragestellung der Dissertation.....	21
2 Material und Methoden .....	22
2.1 Material.....	22
2.2 Methoden .....	25
2.2.1 Tiermodell und Tierhaltung.....	25
2.2.2 Studienaufbau .....	26
2.2.3 Experimente und Probengewinnung.....	26
2.2.4 Parameter und Messungen .....	29
2.2.5 Ergebnisanalyse .....	34
3 Ergebnisse .....	36
3.1 Wachstum, Fress- und Trinkverhalten und Blutzucker.....	36
3.1.1 Gewicht.....	36
3.1.2 Fress- und Trinkverhalten .....	38
3.1.3 Blutzucker .....	43
3.2 Insulin-Toleranztest, Blutzucker, Kreatinin und Urinvolumen nach NaCl- und Insulin-Injektion .....	46

3.2.1	Blutzuckerwerte nach NaCl- und Insulin-Injektion.....	46
3.2.2	Blutzuckerabfall nach Zeit und nach injizierter Insulinmenge.....	48
3.2.3	Kreatininkonzentration, Kreatininexkretion und Urinvolumen.....	50
3.3	Urin-Elektrolytausscheidung beim intraperitonealem Insulintoleranztest .....	51
3.3.1	Glucosurie beim intraperitonealem Insulintoleranztest .....	51
3.3.2	Natriurese beim intraperitonealem Insulintoleranztest.....	52
3.3.3	Kaliurie beim intraperitonealem Insulintoleranztest .....	54
3.3.4	U-Natrium zu U-Kalium-Quotient beim intraperitonealem Insulintoleranztest.....	56
3.3.5	Calciurie beim intraperitonealem Insulintoleranztest .....	57
3.3.6	Phosphaturie beim intraperitonealem Insulintoleranztest.....	59
3.3.7	Magnesiurie beim intraperitonealem Insulintoleranztest.....	61
3.3.8	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	62
4	Diskussion .....	63
4.1	Tiermodell zur Untersuchung der Insulinresistenz.....	63
4.1.1	Verlauf des Mausmodells .....	63
4.1.2	Bestimmung des Zeitpunkts und der Fastendauer für die Durchführung des Experimentes.....	64
4.1.3	Tiermodelle im Vergleich und die Parallelen zum Menschen.....	65
4.2	Auswirkungen der Insulinresistenz auf den Blutzucker .....	68
4.3	Auswirkungen der Insulinresistenz auf Transportprozesse.....	69
4.3.1	Effekte einer akuten Insulingabe auf Transportprozesse im proximalen Tubulus gesunder und insulinresistenter Mäuse.....	69
4.3.2	Effekte einer akuten Insulingabe auf Transportprozesse in der Henle-Schleife und im distalen Tubulus gesunder und insulinresistenter Mäuse.....	72
4.3.3	Effekte einer akuten Insulingabe auf Transportprozesse im Sammelrohr gesunder und insulinresistenter Mäuse .....	74
4.4	Kritische Würdigung und Ausblick .....	75
4.4.1	Limitationen .....	76
4.4.2	Ausblick .....	77
5	Zusammenfassung .....	79
6	Literaturverzeichnis.....	80
7	Erklärung zum Eigenanteil .....	85
8	Veröffentlichungen .....	86
9	Danksagung .....	87

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ADH	Antidiuretische Hormon
Akt	Gen, welches für die Proteinkinase B codiert
aPKC	Atypical Protein Kinase C
AS160	Akt Substrate of 160 kDa
BZ	Blutzucker
CaSR	Calciumsensitive Rezeptoren
CKD	Chronic Kidney Disease
CLC-KA	Chloride Channel Protein
ENaC	Epithelialer Natriumkanal
FoxO	Forkhead-Box-Protein O3
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GLUT	Glucosetransporter
GSK3	Glykogensynthase-Kinase 3/ Glycogen Synthase Kinase 3
HGF	Hepatic growth factor
IGF-1R	Insulin-like Growth Factor 1 Receptor
JCR:LA-cp-Ratten	CP-Gen-mutierte korpulente Ratten
KO	BTBR Lep <sup>ko/ko</sup> Knock- Out
mTORC1	Mammalian Target of Rapamycin Complex 1
NCC	Natrium-Chlorid-Kotransporter
NHE	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -Antiporter
NKCC2	Na-K-2Cl-Kotransporter
NO	Stickstoffmonoxid
PKD1	PIP3-abhängige Kinase 1
pH	Potentia Hydrogenii
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
RAAS	Renin Angiotensin Aldosteron System

ROMK	Renal Outer Medullary Potassium Channel
ROS	Reactive Oxygen Species
SGK1	Serum-Glukokortikoid-regulierte Kinase 1
SGLT	Sodium dependent glucose transporter
SHR/N-cp-Ratten	spontane hypertensive/NIH corpulent rats
TGF	Transforming growth factor
TRPM6	Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily M Member 6
TRPV5	Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily V Member 5
WT	BTBR Lep <sup>wt/wt</sup> Wildtyp
ZDF-Ratten	Zucker diabetic fatty rats
AUC	Fläche unterhalb der Kurve

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

---

Abbildung 1: Insulinabhängige Stoffwechselprozesse.....	2
Abbildung 2: Einfluss von Insulin auf Transportvorgänge im proximalen Tubulus.....	10
Abbildung 3: Einfluss von Insulin auf Transportvorgänge in der Henle-Schleife .....	14
Abbildung 4: Einfluss von Insulin auf Transportvorgänge im distalen Tubulus .....	16
Abbildung 5: Einfluss von Insulin auf Transportvorgänge im Sammelrohr .....	19
Abbildung 6: Studiendesign: Zeitlicher Ablauf der Interventionstage .....	28
Abbildung 7: Körpergewicht im Verlauf von 123 Tagen.....	36
Abbildung 8: Fotografische Dokumentation einer WT- und einer KO-Maus.....	37
Abbildung 9: Fressmenge im Verlauf von 120 Tagen.....	38
Abbildung 10: Trinkmenge im Verlauf von 120 Tagen.....	40
Abbildung 11: Trinkflaschen der KO- und WT-Mäuse .....	42
Abbildung 12: Gelegenheitsblutzucker im Verlauf über 90 Tage .....	43
Abbildung 13: Nüchternblutzucker nach 6-8 h und nach 12 h Fasten .....	44
Abbildung 14: Blutzuckerwerte im Verlauf von 2h nach intraperitonealer Injektion von NaCl und Insulin (IPITT) .....	46
Abbildung 15: Insulinwirkung auf den Blutzucker.....	48
Abbildung 16: Kreatininkonzentration, Kreatininexkretion und Urinvolumen.....	50
Abbildung 17: Glucoseexkretion im Urin.....	51
Abbildung 18: Natriumexkretion im Urin .....	52
Abbildung 19: Kaliumexkretion im Urin .....	54
Abbildung 20: Urin-Natrium zu Urin-Kalium-Ratio .....	56
Abbildung 21: Calciumexkretion im Urin.....	57
Abbildung 22: Phosphatexkretion im Urin.....	59
Abbildung 23: Magnesiumexkretion im Urin .....	61

## TABELLENVERZEICHNIS

---

Tabelle 1: Geräte.....	22
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien .....	22
Tabelle 3: Kits.....	23
Tabelle 4: Medikamente .....	24
Tabelle 5: Tierhaltung.....	24



## 1 EINLEITUNG

---

Übergewicht und Adipositas haben in den letzten Jahren insbesondere in der westlichen Welt zugenommen. Grund dafür ist ein ungünstiger Lebensstil, welcher sich durch unausgewogene Ernährung und Bewegungsmangel auszeichnet. Die Folgen für Menschen und Gesundheitssysteme sind gravierend: Diabetes mellitus ist mit einer stetig steigenden Prävalenz eine der führenden Volkskrankheiten in Deutschland. In Europa nimmt Deutschland mit rund 7,5 Millionen Diabeteserkrankten den zweiten Platz nach Russland ein [1]. Laut einer Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland des Robert Koch-Instituts waren 2012 7,2 % der Erwachsenen, d.h. rund 5 Millionen Menschen, an einem Diabetes erkrankt [2].

Diabetes mellitus umfasst eine Gruppe von Stoffwechselkrankheiten mit dem Hauptmerkmal der chronischen Hyperglykämie, der entweder eine Störung der Insulinsekretion wie bei einem Typ 1-Diabetes oder der Insulinwirkung an den Zellen im Rahmen eines Typ 2-Diabetes zu Grunde liegt [3]. Der Typ 2-Diabetes entwickelt sich schleichend und zeigt zu Beginn meist unspezifische Symptome wie Leistungsabfall, Müdigkeit und Potenzstörungen [3]. Langfristig sind vor allem die Augen (diabetische Retinopathie), die Nieren (diabetische Nephropathie), das Nerven- (diabetische Neuropathie) und Herz-Kreislaufsystem (koronare Herzkrankheit, arterielle Verschlusskrankheiten und Myokardinfarkte) gefährdet [3].

Bei der Entstehung des Typ 2-Diabetes mellitus spielen mehrere Faktoren eine Rolle: eine Insulinresistenz, bei der es zusätzlich zu einer Herunterregulation der Insulinrezeptoren an den Zellen und somit zur Wirkabschwächung des Insulins kommt, eine gestörte Inkretinsekretion und -wirkung, eine gestörte Insulin- und Glukagonsekretion und eine Zerstörung der  $\beta$ -Zellen, welche Hyperglykämien verstärken [3]. Die gestörte Insulinwirkung im Typ 2-Diabetes mellitus ist nicht auf einen gestörten Insulinrezeptor [4], sondern auf die Insulinresistenz zurückzuführen. Mit diesem Hintergrund wird die Insulinresistenz in den folgenden Kapiteln näher beleuchtet.

## 1.1 INSULINRESISTENZ

Die Insulinresistenz ist ein Zustand, bei der durch Abschwächung der Insulinwirkung immer mehr Insulin benötigt wird, um an der Zielzelle suffizient wirken zu können. Mit neuen Erkenntnissen um den Insulinrezeptor im Jahre 1970 tauchte der Begriff Insulinresistenz erstmalig auf [5, 6]. Die Insulinresistenz steht im Zentrum der Entstehung des Diabetes mellitus und dessen Komorbiditäten. Für das Verständnis um die Pathomechanismen dieser ist die Beschäftigung mit der Insulinresistenz essenziell.

### 1.1.1 Insulin

Insulin ist ein anaboles Peptidhormon, welches in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas gebildet wird und den Glucosestoffwechsel beeinflusst. Es fördert die Synthese und hemmt den Abbau von Glykogen, Proteinen und Lipiden [3, 7]. Insulin bindet an Insulinrezeptoren, was eine Kaskade von Signalen in Gang setzt. Der Insulinrezeptor besteht aus zwei  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten [6-8]. Insulin bindet an die extrazellulären  $\alpha$ -Untereinheiten, wodurch die intrazellulären  $\beta$ -Untereinheiten aktiv werden, es handelt sich hierbei um Tyrosinkinassen [7, 9]. Es gibt zwei Splicevarianten des Insulinrezeptors: Insulinrezeptor A und Insulinrezeptor B. Insulinrezeptor A ist in Tumorzellen und in embryonalem Bindegewebe zu finden, Insulinrezeptor B in den klassischen insulinempfindlichen Organen: Leber, Skelettmuskulatur und Adipozyten [6-9].

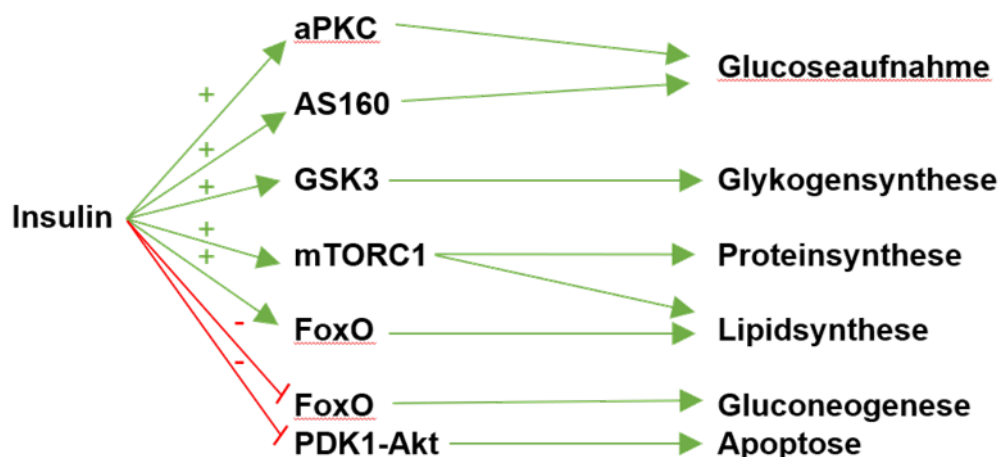


Abbildung 1: Insulinabhängige Stoffwechselprozesse

Abgebildet sind verschiedene Insulinabhängige Stoffwechselwege. Die Glucoseaufnahme ist aPKC- (Atypical Protein Kinase C) und AS160- (Akt Substrate of 160 kDa) und die Glykogensynthese GSK3- vermittelt (Glykogensynthase-Kinase 3). Über die Aktivierung von mTORC1 (Mammalian Target of Rapamycin Complex 1) wird die Proteinsynthese und mTORC1- und FoxO-vermittelt (Forkhead-Box-Protein O3) die Lipidsynthese gefördert. Gehemmt werden die Gluconeogenese über FoxO und die Apoptose über PDK1-Akt (PIP3-abhängige Kinase 1) und Akt (Gen, welches für die Proteinkinase B codiert) [6, 10-17].

Nach Bindung an die  $\alpha$ -Untereinheiten, bewirkt Insulin die Phosphorylierung der  $\beta$ -Untereinheiten, den Tyrosinkinasen und gibt somit den Startschuss für verschiedene Signalwege. Hierzu zählen die in der Abbildung 1 erwähnten insulinabhängigen Stoffwechselprozesse. Insulin bindet nicht nur an klassische Insulinrezeptoren sondern, beispielsweise, wenn auch mit geringerer Affinität, an den IGF-1R (insulin-like growth factor 1 receptor) und andere Rezeptoren, auf die später eingegangen wird [6, 11].

### **1.1.2 Klassische insulinsensitive Organe und Folgen der Insulinresistenz**

Die Insulinresistenz zeigt sich sehr deutlich in den insulinsensitiven Organen wie Leber, Skelettmuskulatur und Fettzellen. In diesen Geweben ist eine immer weiter steigende Menge an Insulin nötig, um Glucose in die Zellen aufzunehmen [3]. Diese erhöhten Insulinspiegel haben ein steigendes Hungergefühl zur Folge, welche in Adipositas enden [3]. Die Hyperinsulinämie mit Adipositas ist das Hauptcharakteristikum metabolischen Syndroms [3]. Das metabolische Syndrom ist definiert durch eine abdominelle Adipositas und zwei der folgenden Symptome: erhöhte Triglyzeride, erniedrigtes HDL-Cholesterin, Hypertonie und erhöhte Nüchtern-Plasmagluucose, Diabetes mellitus Typ 2 [3].

Die Insulinresistenz wird im Wesentlichen verursacht durch eine Adipositas, Hyperinsulinämie, Hyperglykämie, Hyperlipidämie und oxidativen Stress [4]. Die zunehmende Zahl an Adipozyten in übergewichtigen Patienten schütten proinflammatorische Zytokine aus, welche über eine chronische Inflammation im Körper die Insulinresistenz begünstigt [4]. Hohe Spiegel von ROS (reactive oxygen species) und anhaltende Hyperglykämien führen über oxidativen Stress zur Aktivierung von Stress-Kinasen zur Insulinresistenz [4].

Insulin senkt innerhalb weniger Minuten den Blutzuckerspiegel, indem es an die Insulinrezeptoren der Skelettmuskulatur und in den Adipozyten bindet und über eine Signalkaskade dazu führt, dass die in den Vesikeln intrazellulär gespeicherten Glucose-Transporter 4 (GLUT4) in die Plasmamembran integriert werden [7]. Glucose wird über den GLUT4-Transporter in die Skelettmuskel- und Fettzelle aufgenommen [7]. In der Skelettmuskulatur findet zusätzlich insulinabhängig die Protein- und Kaliumaufnahme für die Proteinbiosynthese statt [7]. Im Allgemeinen wird durch die vermehrte Aktivierung der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase der zelluläre Metabolismus gesteigert. In der Leber existieren für die Glucoseaufnahme Glucose-Transporter 2 (GLUT2), diese sind deutlich weniger affin als die GLUT4-Transporter aber permanent an der Zellmembran exprimiert [7]. Nach der Glucoseaufnahme finden in der Leber und in der Skelettmuskulatur die Glykolyse und die Glykogensynthese statt. Gehemmt werden dagegen Gluconeogenese und Glykogenolyse [7]. In der Leber und in den Adipozyten fördert Insulin die Lipidsynthese und hemmt die Lipolyse [7].

Diese Signalwege sind im Status der Insulinresistenz gestört. Die Adipozyten nehmen im Rahmen dieses Prozesses an Größe zu und produzieren proinflammatorische Zytokine, wie Leptin, und weniger Adipokine, wie z.B. das Adiponectin [6]. Adiponectin ist ein anti-inflammatorisches Hormon, welches zellprotektive Wirkungen hat und die Insulinsensitivität erhöht [18]. Die Fettzellen steigern ihre Lipolyse, die freien Fettsäuren sammeln sich in der Leber an und verursachen hier eine entzündliche Reaktion: Die Gluconeogenese und die Produktion von verschiedenen proinflammatorischen Hepatokinen in der Leber werden angeregt [6]. Die Hyperlipidämie erhöht das Risiko für die nicht alkoholische Fettleber [6]. Außerdem wird über die Skelettmuskulatur weniger Glucose aufgenommen [6].

Im Gehirn veranlasst Insulin die Glucoseaufnahme, beeinflusst den peripheren Stoffwechsel, das Essverhalten und das Körpergewicht. Es besteht ein Zusammenhang zwischen insulinresistenten Gehirnzellen, Adipositas und hohem Anteil von viszeralem Fett [19].

Im Herzen wurde in Zusammenhang mit einer Hyperlipidämie vermehrt Kardiomyopathien, [4] aber auch ein, vermutlich bedingt durch Dysfunktion der Mitochondrien, generell erhöhtes kardiovaskuläres Risiko beobachtet [20]. Yatabe et al. fand eine kausale Beziehung zwischen Insulinresistenz und Hypertonie [21]. Außerdem korreliert ein erhöhter BMI mit vorangegangener Hyperinsulinämie und Insulinresistenz in der Kindheit mit Hypertension im Erwachsenenalter [22].

Um besser seinen Zielort zu erreichen, führt Insulin zur Vasodilatation im arteriellen System [6]. Dies geschieht über die insulingesteuerte Aktivierung der Endothelial Nitric Oxide Synthases (eNOS), welche Stickstoffmonoxid (NO) freisetzt [4]. Bei der Insulinresistenz bleibt die insulinabhängige Vasodilatation jedoch aus. Ganz im Gegenteil führt die vermehrte Expression von Endothelin zur Vasokonstriktion. Zusätzlich führen eine Reihe entzündlicher Botenstoffe zur Erhöhung der Gefäßpermeabilität und zur Endothelschädigung und begünstigen die Entstehung von Artherosklerose [7].

Im Pankreas erhöht Insulin das  $\beta$ -Zell-Überleben, eine permanente Hyperlipidämie und Hyperglykämie zerstören aber langfristig die  $\beta$ -Zellen [6, 7]. Auch der Gastrointestinaltrakt ist von den metabolischen Prozessen betroffen: Es wurde ein Zusammenhang zwischen Diabetes mellitus, dem metabolischen Syndrom und einer Verschiebung des Mikrobiom-Gleichgewichts im Darm adipöser Typ 2-Diabetes-Erkrankten festgestellt [23].

Die Insulinresistenz betrifft demnach nicht nur die klassischen insulinsensitiven Organe, sondern in unterschiedlichem Ausmaß nahezu jede Organstruktur im Körper unter anderem auch die Niere.

## **1.2 DIE NIERE- EIN EBENFALLS INSULINSENSITIVES ORGAN**

In der Niere wurden sowohl in den Glomeruli als auch den Tubuli [24] beide Spliceformen des Insulinrezeptors nachgewiesen [6, 25]. Inwieweit die Insulinresistenz die Niere beeinflusst, wird im Folgenden vertiefend dargestellt.

### **1.2.1 Wirkung von Insulin auf die Niere**

Das Kapillarendothel reagiert auf Insulin mit einer NO-vermittelten Vasodilatation, im Falle einer Insulinresistenz bleibt diese aus und die GFR sinkt [6].

Die Podozyten nehmen insulinabhängig und Phosphoinositid-3-Kinase-vermittelt (PI3K) Glucose über GLUT4-Transporter auf und Insulin hat hier ebenfalls eine zellprotektive Wirkung [6, 25-27]. Podozyten sind insulinsensitive Zellen und reagieren auf die Insulinresistenz mit pathologischen Zellstrukturveränderungen, wie Zellstrukturverlust, Zerstörung und Glomerulosklerose, die die glomeruläre Funktion beeinträchtigen und unter anderem typische Zeichen der diabetischen Nephropathie sind [6, 25-27]. Die sterbenden Podozytzellen können dementsprechend nicht mehr auf den Insulinreiz reagieren [6, 25-27].

Insulin aktiviert in der Niere das Enzym Serum-Glukokortikoid-regulierte Kinase (SGK1) [28, 29]. Dieses Enzym ist in mehreren Organen des Menschen zu finden. In den Podozyten wird die SGK1 Expression durch Aldosteron und oxidativem Stress verstärkt [29] und führt zu vermehrtem GLUT4-Einbau [29].

Insulin wirkt auf Mesangiumzellen wachstumsfördernd und protektiv, hohe Insulinspiegel über lange Zeit könnten demnach der Grund für die Hypertrophie des Mesangiums im Rahmen der diabetischen Nephropathie sein [6].

### **1.2.2 Folgen der renalen Insulinresistenz**

Die Insulinresistenz an der Niere nimmt eine besondere Stellung ein, da sie viele verschiedene Erkrankungen verursachen kann. Die bereits erwähnten Signalwege sind im Falle einer Insulinresistenz entweder gestört oder auf eine höhere Insulinkonzentration angewiesen.

Auch wenn sich diese Arbeit auf tubuläre Transportprozesse konzentriert, werden vorab unterschiedliche renale Erkrankungen im Rahmen einer Insulinresistenz demonstriert.

Die Wirkung von Insulin auf die unterschiedlichen Tubulus-Abschnitte und die Folgen der Insulinresistenz werden im Kapitel 1.3 erläutert.

### **1.2.2.1 Chronische Nierenerkrankungen**

Die Insulinresistenz und die Faktoren, die eine Insulinresistenz begünstigen, wie beispielsweise ein hoher Anteil an weißem Fettgewebe, insbesondere viszerales Fett, spielen bei der Entwicklung chronischer Nierenerkrankung eine wichtige Rolle [6, 30-32]. Insulin führt durch Vasodilatation in den Vasa afferentia und efferentia zu erhöhter Nierendurchblutung [6]. Die durch die gestörte Insulinwirkung ausbleibende Vasodilatation sorgt für einen erhöhten Gefäßwiderstand und eine verminderte Nierendurchblutung [6]. Trotzdem kommt es zur erhöhten glomerulären Filtrationsrate (GFR) und Hyperfiltration, da die Niere bedingt durch die erhöhte Glucosekonzentration im Urin vermehrt Natrium und Glucose rückresorbiert [6, 33]. Insulinresistenz und Diabetes mellitus führen demnach in der Niere zur erhöhten glomerulären Filtrationsrate und sind Risikofaktoren für eine chronische Nierenerkrankung (CKD) [6, 34-38]. Adipositas allein ist wegen konstanter Hyperfiltration für die Entwicklung chronischer Nierenerkrankungen prädisponierend [6, 34-38].

Die bereits erwähnte diabetische Nephropathie ist ebenfalls eine durch die Insulinresistenz und den Diabetes mellitus verursachte Erkrankung. Beträgt die Plasmaglukosekonzentration über einen längeren Zeitraum über 180 mg/dl, wird die maximale Transportkapazität der Niere für Glucose überschritten und Glucose wird vermehrt mit dem Urin ausgeschieden [7]. Dies führt zur Polyurie und Polydipsie, aber vor allem zu Glomerulaschäden, welche in einer diabetischen Nephropathie enden können [7]. Durch die vermehrte Durchlässigkeit des Filters steigen die Albuminwerte im Urin und die Retentionswerte im Plasma [7]. Aufgrund der Hyperfiltration, Glukosurie und Proteinurie kommt es zur inflammatorischer Reaktion [3]. Die Glomeruli reagieren demnach auf die Insulinresistenz mit einer Verdickung der glomerulären Basalmembran, Hypertrophie des Mesangiums, einer Glomerulosklerose und einer gestörten Podozytenfunktion [39]. Zudem sezernieren Adipozyten vermehrt das Adipokin Leptin, welches im Verdacht steht, über Anregung des transforming growth factor  $\beta$ 1 und somit vermehrter Kollagenproduktion eine Glomerulosklerose zu induzieren [6]. Die mit Diabetes mellitus assoziierten Komplikationen gehen mit einer erhöhten Mortalität einher,

nicht zuletzt, weil der Diabetes mellitus in Deutschland der häufigste Grund für terminale Niereninsuffizienz ist [3].

### **1.2.2.2 Weitere Erkrankungen**

Auch die Nephrolithiasis, insbesondere Harnsäuresteine in der Niere, welche im Rahmen eines metabolischen Syndroms gehäuft auftreten, könnte Folge einer wegen einer Insulinresistenz gestörten Ammoniakentgiftung sein [40, 41].

## **1.3 DIE WIRKUNG VON INSULIN UND DER EINFLUSS DER INSULINRESISTENZ AUF RENAL-TUBULÄRE FUNKTIONEN**

In den Glomeruli wird der Primärharn durch freie Filtration gebildet. Wertvolle Bestandteile aus dem Primärharn werden im Tubulussystem rückresorbiert und harnpflichtige Bestandteile werden mit dem Endharn ausgeschieden. Insulin wird frei filtriert und befindet sich in der Niere sowohl im Primärharn als auch im Plasma und kann somit die Zielzellen von luminal und von basolateral erreichen, die basolaterale Insulin-Rezeptorbindung ist jedoch die physiologisch wertvolle und Signalkaskaden-auslösende Bindung [42]. Im Folgenden werden die physiologischen Vorgänge, die Wirkung von Insulin und die Auswirkungen der Insulinresistenz auf renal tubuläre Transportprozesse erläutert.

### **1.3.1 Proximaler Tubulus**

#### **1.3.1.1 Physiologie**

Im proximalen Tubulus findet die energieintensive Rückresorption der Flüssigkeit und einigen anderen Bestandteilen des Primärharns statt. Nahezu 100 % der Aminosäuren, der Glucose und des Bikarbonats wird hier rückresorbiert [7, 43]. Proteine werden noch im Lumen proteolysiert und über Endozytose oder über natriumabhängige und natriumunabhängige Transporter rückresorbiert [7, 43]. Für die Resorption von Glucose gibt es zwei Transportwege: Die Sodium Dependent Glucose Transporter 1 und 2. Der SGLT1 ist affiner für Glucose als der SGLT2 und dafür zuständig, dass der Endharn frei von Glucose ist [7, 33]. Der SGLT2 hat dagegen eine höhere Transportkapazität als der SGLT2, so dass ca. 97 % der Glucose durch den SGLT2 rückresorbiert wird [33]. Beide Transporter schleusen Glucose an



Natrium gekoppelt in die Zelle, von dort gelangt Glucose über den GLUT2 Transporter weiter ins Interstitium [7, 33, 43]. Die Zellen im proximalen Tubulus sind außerdem zur Gluconeogenese, nicht aber zur Glykolyse fähig.

Natrium, Chlorid und Kalium werden zum größten Teil (ca. 65 %) im proximalen Tubulus rückresorbiert: Natrium wird durch den Na-H-Austauscher, den Natrium-Bikarbonat-Kotransporter und wie Chlorid und Kalium mit Aminosäuren, Glucose und Anionen passiv parazellulär rückresorbiert [7, 43]. Außerdem werden hier ca. 65 % des Calciums per Solvent Drag und passiv rückresorbiert [7, 43]. Nur 15 % des Magnesiums wird im proximalen Tubulus parazellulär rückresorbiert [7, 43]. 80 % des Phosphats wird im proximalen Tubulus über den Natrium-Phosphat-Kotransporter rückresorbiert und steht unter dem Einfluss des Parathormons und des Calcitriols [3, 7, 43]. Es gibt drei unterschiedliche Natrium-Phosphat-Kotransporter: I, IIa und III, dabei spielt IIa die wichtigste Rolle, denn über diesen Transporter wird der Phosphathaushalt hauptsächlich reguliert [44, 45]. Parathormon fördert, über einen verminderten Einbau der Natrium-Phosphat-Kotransporter IIa [46], die Phosphatausscheidung in der Niere, setzt aber zugleich Phosphat und Calcium aus dem Knochen frei [3, 7, 43]. Das Parathormon stimuliert die Calcitriolausscheidung: Calcitriol steigert die Calcium- und Phosphatresorption im Darm, wirkt dem Knochenabbau entgegen, indem es die Einlagerung von Calcium und Phosphat im Knochen fördert und die Calcium- und Phosphatrückresorption in der Niere erhöht [3, 7, 43-45].

Die massive Rückresorption der Elektrolyte sorgt dafür, dass die Osmolarität im Lumen sinkt, deshalb folgen ca. 65 % des Wassers hier per Solvent drag in die Zellen [7, 43].

### 1.3.1.2 Wirkung von Insulin auf Transportprozesse im proximalen Tubulus

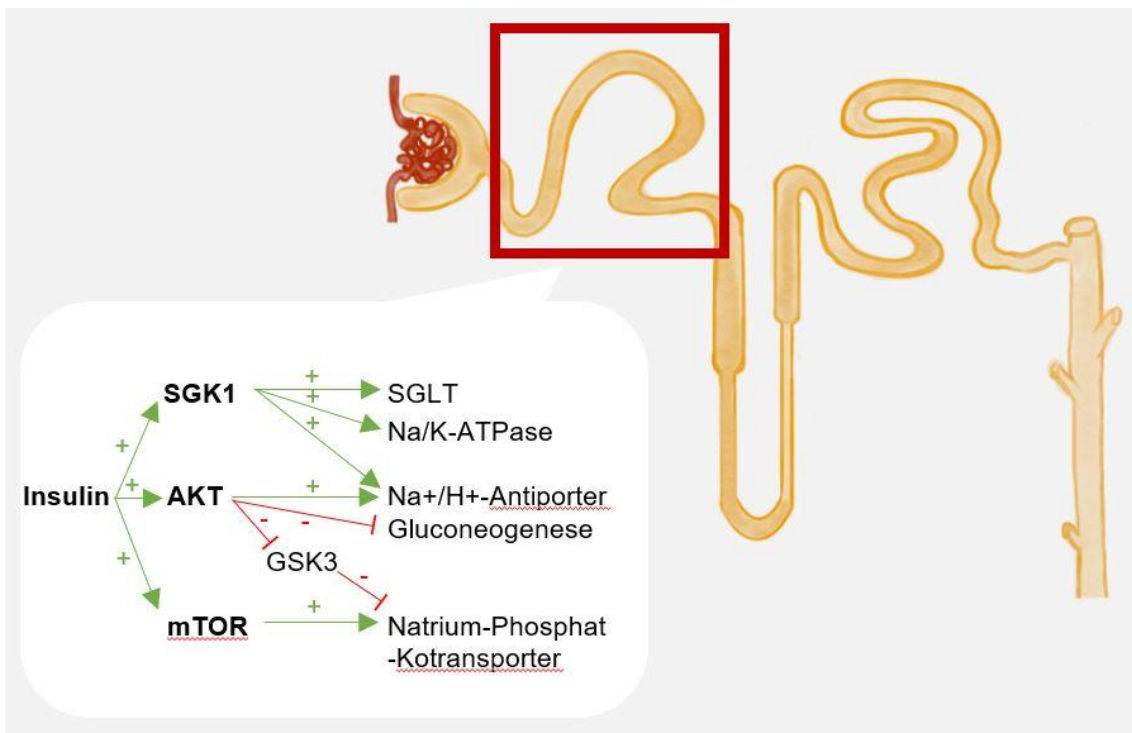


Abbildung 2: Einfluss von Insulin auf Transportvorgänge im proximalen Tubulus

Zur besseren Übersicht werden insulinabhängige SGK1-, Akt-, GSK3- und mTOR-vermittelten Signalwege im proximalen Tubulus schematisch dargestellt.

#### Glucose und Natrium

Die insulinvermittelte SGK1-Aktivierung spielt eine wichtige Rolle in tubulären Transportprozessen [28, 29]. SGK1 wird durch IGF1, HGF (Hepatic Growth Factor), Gluko- und Mineralokortikoide und Vitamin D3 vermehrt exprimiert [29]. SGK1 führt im proximalen Tubulus bei Hyperglykämien [29] zur gesteigerten Glucoseaufnahme über SGLT1 und 2 [47] und stimuliert zusätzlich den NHE3 [48]. Über SGLT1 und 2 werden an Glucose gekoppelt auch Natrium transportiert. SGK1 aktiviert im proximalen Tubulus zusätzlich zum Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter, die Na/K-ATPase [6, 29].

Akt ist eine Serin-/Threonin-Kinase und ähnlich wie SGK1 an verschiedenen Transportprozessen in der Niere beteiligt [48]. Für die Akt-Wirkung ist das Insulin-Rezeptor-Substrat (IRS) unerlässlich. Insulin bindet an den Insulinrezeptor, hierdurch wird IRS phosphoryliert und somit aktiviert und führt

über eine Signalkaskade zur Mobilisierung von Akt [48]. Die SGK1- und Akt-Signalwege laufen zum Teil unabhängig und parallel, aber wohlmöglich auch synergetisch ab [48]. Im proximalen Tubulus aktiviert Insulin Akt-vermittelt den Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter und fördert die Natriumrückresorption [48]. Außerdem aktiviert IRS2 über den PI3K-Akt-Signalweg den Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter [39]. Eine Arbeit mit Nierenzellen von Opossums zeigte, dass Insulin den Natrium-Wasserstoff-Austauscher stimuliert und so vermehrt Natrium rückresorbiert wird [49]. Insulin hemmt über den IRS1 und Akt-Signalweg die Gluconeogenese [39]. In IRS1- und IRS2-defizienten Ratten wurde herausgefunden, dass IRS1 und Akt vermehrt für Transportprozesse im proximalen Tubulus, und IRS2 für die Glucoseaufnahme in die Fettzellen verantwortlich sind [48].

Bei adipösen Typ 2-Diabetikern wurde beobachtet, dass eine Hyperinsulinämie zur vermehrten Natriumrückresorption mit daraus resultierender Hypertonie führt [50-53]. Unterschiedliche Tiermodelle bestätigen dies und zeigten, dass eine Hyperinsulinämie in Anwesenheit einer Hyperglykämie im proximalen Tubulus die Rückresorption von Natrium fördert [42, 54-56]. Dies geschieht über die zwei erläuterten SGK1- und IRS2-Akt-Signalwege.

### **Phosphat**

Dass Insulin die Phosphatrückresorption über die vermehrte Stimulation von dem Natrium-Phosphat-Kotransporter Typ I im proximalen Tubulus stimuliert, ist schon länger bekannt [42, 55, 57]. Insulin stimuliert zusätzlich die Serin-/Threonine Kinase mammalian target of rapamycin (mTOR), welche wiederum den Natrium-Phosphat-Kotransporter Typ IIa stimuliert [58] und somit eine Anti-Phosphaturie bewirkt.

Insulin wirkt auch über die Hemmung von FGF-23 dem renalen Phosphatverlust entgegen [59], denn FGF-23 fördert die Phosphaturie, indem es die Reabsorption von Phosphat über die Natrium-Phosphat-Kotransporter hemmt [60].

### ***1.3.1.3 Auswirkungen der Insulinresistenz auf Transportprozesse im proximalen Tubulus***

#### **Glucose**

Der proximale Tubulus wird nur teilweise von der Insulinresistenz beeinträchtigt: Die IRS1-Signalwege sind gehemmt während die IRS2-Signalwege erhalten sind [39]. Über den IRS1-Signalweg kann Insulin deshalb nicht mehr die Gluconeogenese hemmen [39]. Eine verminderte IRS1-Expression könnte deshalb der Grund für die unkontrollierte Gluconeogenese in den proximalen Tubuluszellen sein [6]. Eine hohe Aktivität der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase in insulinresistenten Zellen bestätigte dies [6, 61]. Dies zeigt, dass der proximale Tubulus resistent gegenüber der, die Gluconeogenese supprimierenden, Insulinwirkung ist [6].

Der Glucose-Transport scheint von der Insulinresistenz unbeeinflusst: In Typ 2-Diabetes mellitus-Patienten wird vermehrt Glucose über SGLT1 und 2 aufgenommen [6, 62].

#### **Natrium**

In Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty Rat (OLETF) Ratten und insulinresistenten Menschen blieb die insulinabhängige IRS2- und AKT-vermittelte Aktivierung von Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter unbeeinträchtigt, während die IRS2-AKT-vermittelte Glucoseaufnahme in die Fettzellen vermindert war [48]. Außerdem fand sich sowohl in OLETF als auch in insulinresistenten Menschen eine normale IRS2-Expression in der Nierenrinde [48]. Dies könnte den ungehemmten Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter erklären [48, 53]. Die Tatsache, dass IRS2-Akt-vermittelte Transportprozesse in insulinresistenten Menschen und Tieren unverändert abliefen, unterstützt die Theorie, dass der proximale Tubulus teilweise von der Insulinresistenz verschont bleibt [48, 53].

#### **Phosphat**

Inwieweit die Insulinresistenz den Phosphattransport beeinträchtigt und ob die Insulin-induzierte Anti-Phosphaturie auch im Falle der Insulinresistenz vorhanden ist, ist noch nicht geklärt.

In einigen Tierversuchen wie zum Beispiel in Fröschen mit Rapamycin induzierter mTOR-Inhibierung wurde eine gesteigerte Phosphatexkretion beobachtet [58]. Auch insulinresistente Glykogen Synthase Kinase- Mäuse (GSK3) zeigten eine durch gestörtes Insulinsignaling vermittelte Hyperphosphaturie bedingt durch verminderte Exprimierung der Natrium-Phosphat-Kotransporter und verminderte Phosphatrückresorption [63].

### **1.3.2 Henle-Schleife**

#### **1.3.2.1 Physiologie**

Im dünnen absteigenden Teil der Henle-Schleife werden über Aquaporine ca. 20 % des Wassers, ca. 25 % des Natriums und ca. 35 % des Chlorids rückresorbiert [7, 43]. Des Weiteren befinden sich viele Chloridkanäle (CLC-KA), über die Chloridionen rückresorbiert werden, und Natrium passiv mitdiffundiert [7, 43]. Im dicken wasserundurchlässigem aufsteigenden Teil der Henle-Schleife werden Natrium, Kalium und Chlorid durch den Na-K-2Cl-Kotransporter rückresorbiert [7, 43]. Hier sitzen auch basolateral calciumsensitive Rezeptoren, sogenannte CaSR [7, 43]. Die CaSR hemmen im Falle einer Hypercalciämie den Na-K-2Cl-Kotransporter [7, 43]. Dadurch entsteht ein weniger positives Potenzial im Lumen und Calcium wird weniger rückresorbiert. Etwa 25 % des Calciums und 75 % des Magnesiums werden nämlich durch das positive Potenzial im Lumen parazellulär rückresorbiert [7, 43]. Calcitriol fördert die renale, Parathormon und Somatotropin die enterale Magnesiumaufnahme. Unter Calcitonin wird vermehrt Magnesium sezerniert [7, 43].

### 1.3.2.2 Wirkung von Insulin auf Transportprozesse in der Henle-Schleife

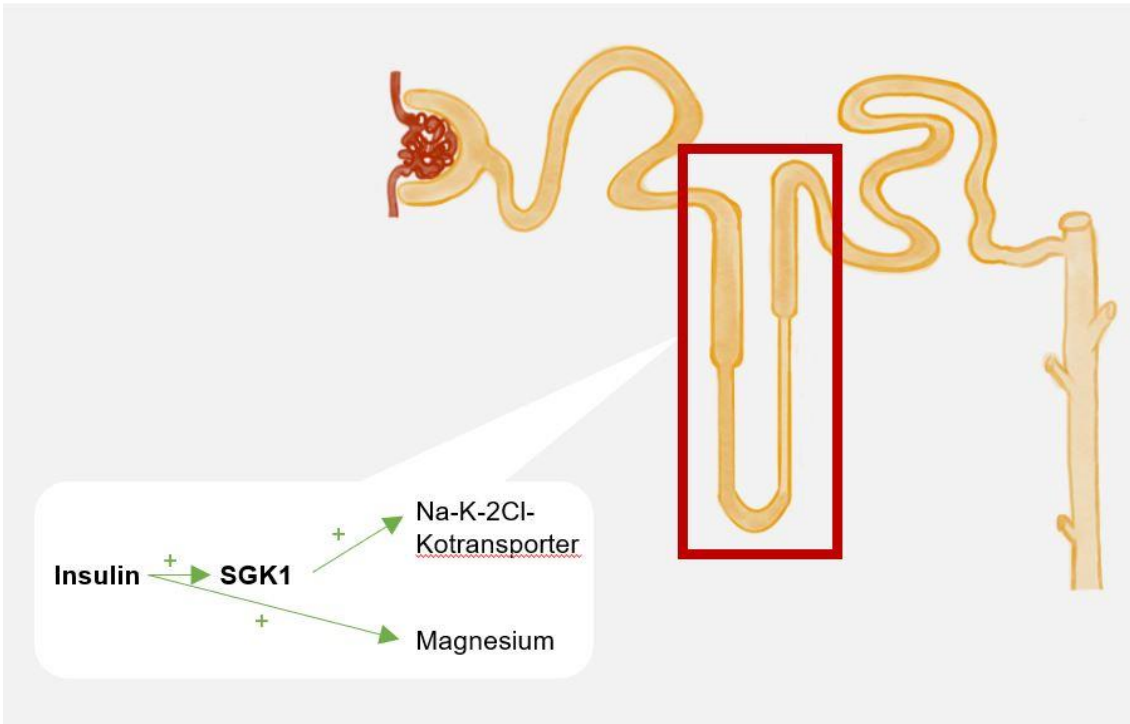


Abbildung 3: Einfluss von Insulin auf Transportvorgänge in der Henle-Schleife

Dargestellt werden die insulinabhängige Magnesiumrückresorption und SGK1-vermittelte Aktivierung der NKCC2 in der Henle-Schleife.

#### **Natrium, Kalium und Chlorid**

Im aufsteigenden Teil wird SGK1-vermittelt der NKCC2 aktiviert [29]. Dies führt zu einer vermehrten Rückresorption von Natrium, Kalium und Chlorid.

#### **Magnesium**

Insulin fördert die Magnesiumrückresorption in der Henle-Schleife [64, 65], hier wird der größte Anteil des filtrierten Magnesiums rückresorbiert.

### 1.3.2.3 Auswirkungen der Insulinresistenz auf Transportprozesse in der Henle-Schleife

#### **Natrium, Kalium und Chlorid**

Die Folgen der Insulinresistenz auf den NKCC2 sind noch unklar.

#### **Magnesium**

Die Insulinresistenz führt zu einer erhöhten Magnesiumexkretion. Grund hierfür ist eine verminderte Rückresorption im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife und im distalen Tubulus [64, 65]. Der genaue Pathomechanismus dahinter ist noch nicht geklärt.

### **1.3.3 Distaler Tubulus**

#### **1.3.3.1 Physiologie**

Im distalen Tubulus wird ein sehr geringer Teil des Natriums (ca. 5 %) und des Chlorids über den NaCl- Kotransporter und je 10 % des Calciums und Magnesiums über Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily V member 5 (TRPV5) und Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily M Member 6 (TRPM6) rückresorbiert [7, 43]. Aldosteron wirkt hier als wichtiger Regulator der Elektrolytresorption. Es fördert die Natrium- und Chloridaufnahme und die Kaliumsekretion über den epithelialen Natriumkanal (ENaC) und dem Kaliumkanal (ROMK) [7, 43]. Der distale Tubulus besitzt Zellen, die mit den reninproduzierenden Zellen der Arteriolen kommunizieren [7, 43]. Sinkt die GFR oder die Natrium- und Chloridkonzentration, wird vermehrt Renin ausgeschüttet [7, 43]. Renin spaltet Angiotensinogen in Angiotensin I, dies wiederum wird vom Angiotensin Converting Enzyme (ACE) in Angiotensin II umgewandelt [7, 43]. Angiotensin II wirkt stärker in der Vas efferens als in der Vas afferens: Durch Vasokonstriktion im Vas efferens und Dilatation im Vas afferens kommt es zur Steigerung der GFR [7, 43]. Angiotensin II fördert außerdem die ADH-Ausschüttung, wodurch die Natriumkonzentration steigt [7, 43]. Klinisch zeigen sich die Folgen des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) in einer Blutvolumen und -drucksteigerung.

### 1.3.3.2 Wirkung von Insulin auf Transportprozesse im distalen Tubulus

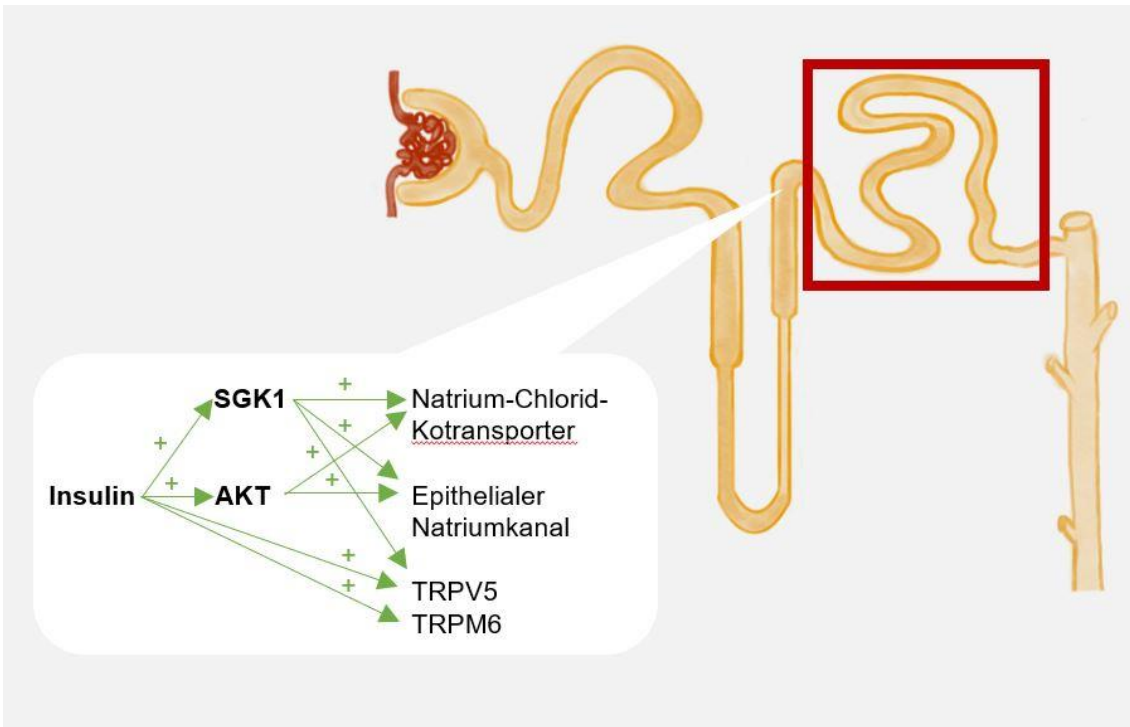


Abbildung 4: Einfluss von Insulin auf Transportvorgänge im distalen Tubulus

Schematische Übersicht der insulinabhängigen SGK1- und Akt-vermittelten Signalwege im distalen Tubulus.

#### Natrium, Kalium und Chlorid

Im distalen Tubulus stimuliert Akt insulinabhängig wie SGK1 den NCC [48].

Wie bereits beschrieben, aktiviert Insulin bei Hyperglykämien vermehrt SGK1 [29]. SGK1 führt zu vermehrtem Einbau von ENaC und NCC und somit zur anti-Natriurese [28, 48, 66]. Ein hoher Blutzuckerspiegel allein kann auch die SGK1-Spiegel erhöhen, was die Natriumretention zusätzlich verstärkt [29]. Neben einem erhöhtem Blutzuckerspiegel ist auch Aldosteron ein Stimulator für die SGK1-Wirkung [6]. Somit führt die insulinvermittelte SGK1-Aktivierung über verschiedene Mechanismen zur Natriumretention und Kaliumexkretion [29, 67]. Demnach bewirkt Insulin vor allem im distalen Tubulus und im Sammelrohr eine vermehrte Natriumrückresorption.

Auch Akt kann im distalen Tubulus den NCC stimulieren [48]. Die with-no-lysine-Kinase 3 (WNK3) bewirkt den Einbau des NCC in die Zellmembran, die



with-no-lysine-Kinase 4 (WNK4) hemmt diese Kanäle [48, 68]. Der Akt-WNK-Signalweg ist noch nicht gänzlich verstanden [48, 68].

### **Calcium**

SGK1 verstärkt außerdem die Calciumrückresorption, indem es den TRPV5 stimuliert [29].

### **Magnesium**

Insulin fördert die Rückresorption von Magnesium über Stimulation des TRPM6 im distalen Tubulus [64, 65].

### ***1.3.3.3 Auswirkungen der Insulinresistenz auf Transportprozesse im distalen Tubulus***

#### **Natrium**

Im Rahmen der Insulinresistenz kommt es zur verminderter Expression von ENaC und verminderter Aktivität der NCC im distalen Tubulus [28, 29]. Dies führt zu vermehrtem Natrium- und Chloridverlust. Die Hypernatriurie wird aufgrund der passenderen Natriurese-Thematik im Kapitel 1.3.4 Sammelrohr dieser Arbeit besprochen.

#### **Calcium**

SGK1-Knock-out-Mäuse besitzen weniger TRPV5 [28]. In den SGK1-defizienten Mäusen finden sich dennoch eine erniedrigte Calciumexkretion [28]. Durch die fehlende SGK1-vermittelte Anregung der TRPV5 wäre normalerweise ein hoher Calciumverlust mit dem Urin zu erwarten [28, 29]. Dies trifft aber nicht zu, weil durch hohe Natriumverluste, durch fehlende ENaC- und NaCl-Kotransporter-Stimulation, das Extrazelluläre Volumen sinkt [28, 29]. Beide Transporter werden durch Aldosteron stark stimuliert, um dem Natriumverlust entgegenzuwirken [28, 29]. Dadurch wird vor allem im proximalen Tubulus und weniger im aufsteigenden Teil der Henle-Schleife mehr Natrium aufgenommen und mit dem Natrium auch Calcium [28, 29]. Demnach wird weniger Calcium mit dem Urin ausgeschieden. Eine SGK1-Defizienz resultiert somit in einer erniedrigten Calcium-, aber erhöhten Natriumexkretion [28, 29].

Im Gegensatz zu den SGK1-defizienten Mäusen zeigten die GSK3- Mäuse erhöhte Calciumexkretionswerte [63]. Dies könnte daran liegen, dass durch die Hyperphosphaturie das Parathormon vermindert ausgeschüttet wird [63]. Parathormon stimuliert die Calcitriolausschüttung und beide stimulieren gemeinsam die Calciumrückresorption über den TRPV5 im distalen Tubulus [63]. Kompensiert wird die Phosphaturie und Calciurie wahrscheinlich durch Mobilisierung von Calcium und Phosphat aus den Knochen, denn diese Mäuse wiesen eine verminderte Knochendichte auf [63]. Ein Knochenabbau ist aufgrund der erniedrigten Parathormonplasmakonzentrationen nicht zu erwarten [63]. Eine andere Arbeit mit Akt2-Knock-out-Mäusen zeigte eine vermehrte Natriurese, Calciurese und Hyperphosphaturie [69].

#### **1.3.4 Sammelrohr**

##### **1.3.4.1 Physiologie**

Über den im Sammelrohr befindlichen epithelialen Natriumkanal (ENaC) wird das restliche Natrium rückresorbiert [7, 43]. Im Sammelrohr wird etwa 14 % des Wassers über Aquaporine antidiuretisches Hormon-abhängig rückresorbiert, und die Harnkonzentration adjustiert [7, 43].

Der Körper verliert kaum Natrium und Chlorid über die Niere. Ungefähr 5 % des filtrierten Calciums und nur 1 % des Wassers wird ausgeschieden [7, 43]. Ein Zehntel des Kaliums wird im Sammelrohr über Kalium-Kanäle, Renal Outer Medullary Potassium Channel (ROMK), sezerniert [7, 43]. Im Vergleich zu den anderen Elektrolyten gelangt somit sehr viel des filtrierten Kaliums in den Endharn. 5-20 % des Phosphats [7, 43] und ca. 5 % des Magnesiums [70] werden renal ausgeschieden.

### 1.3.4.2 Wirkung von Insulin auf Transportprozesse im Sammelrohr

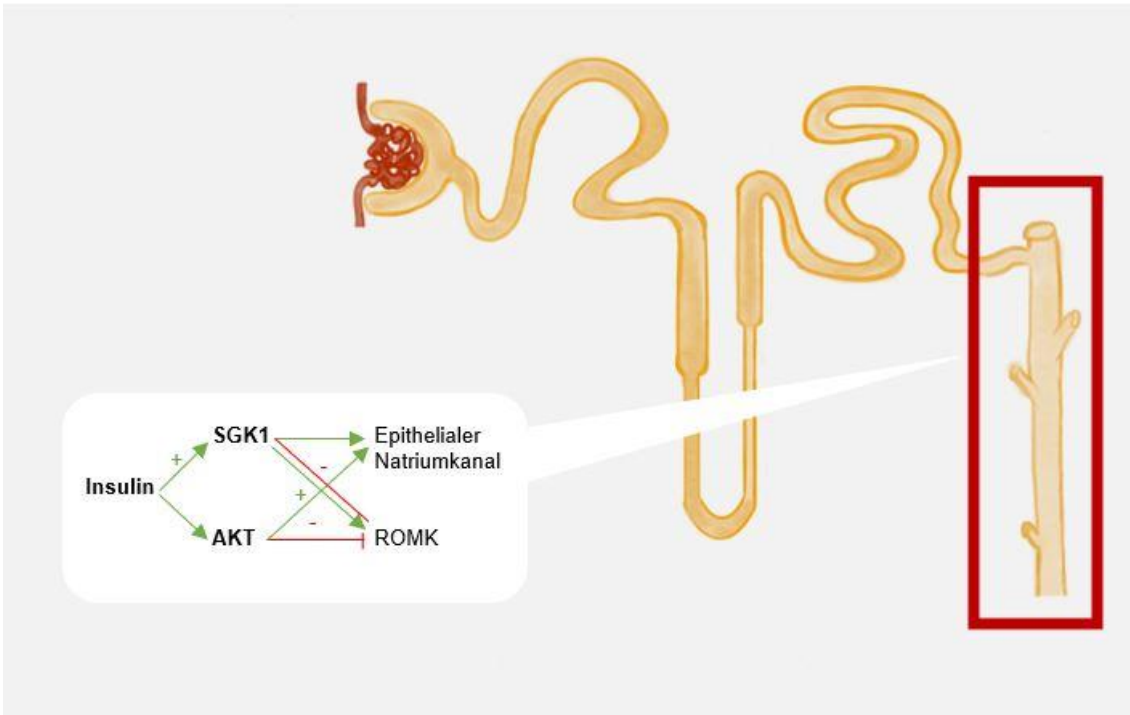


Abbildung 5: Einfluss von Insulin auf Transportvorgänge im Sammelrohr

Dargestellt werden insulinabhängige Aktivierung der ENaC und Hemmung der ROMK im Sammelrohr.

#### Natrium

Im Sammelrohr werden insulinabhängig und SGK1-vermittelt vermehrt ENaC exprimiert [29, 48].

#### Kalium

SGK1 spielt außerdem eine wichtige Rolle in der Insulinabhängigen Aufnahme von Kalium in die Zelle [28, 29]. SGK1 kann, beeinflusst durch Aldosteron, die ROMK-Kanäle stimulieren, im Sammelrohr jedoch kooperieren AKT und SGK1 und hemmen insulingetriggert die ROMK1-Kanäle [29, 48]. Daher besteht die berechtigte Annahme, dass durch den Insulineffekt die Kaliumexkretion sinkt [28, 29, 71]. In diesen Pathomechanismen sind auch with-no-lysine-Kinasen (WNK-Kinasen) beteiligt: Insulin aktiviert mittels der PI3-Kinase mTORC2, was über die Aktivierung des SGK1- und Akt-WNK Signalwegs zur ROMK-Hemmung führt [72].

### **1.3.4.3 Auswirkungen der Insulinresistenz auf Transportprozesse im Sammelrohr**

#### **Natrium und Chlorid**

Eine defiziente SGK1-Ausschüttung führt dazu, dass ENaC im Sammelrohr und in den ENaC-exprimierenden distalen Tubuluszellen und NCC im distalen Tubulus weniger aktiv sind [28, 29]. Außerdem fördert SGK1 im Gehirn den Salzappetit, welcher im Falle der Insulinresistenz sistiert [28]. Durch diese beiden Faktoren verliert der Körper viel Natrium und das extrazelluläre Volumen sinkt. Ein fallendes Herzzeitvolumen und der damit verbundene Blutdruckabfall kurbeln kompensatorisch das RAAS an [28]. Aldosteron arbeitet zum Teil SGK1-abhängig, aber auch SGK1-unabhängig, Insulin und ADH sind in ihrem Wirkmechanismus jedoch vollständig von der SGK1-Signalkaskade abhängig [28, 29, 73].

Der Hyperaldosteronismus kann die im Rahmen der Insulinresistenz verminderte SGK1-Wirkung etwas kompensieren und aktiviert die ENaC Kanäle, die ROMK und die Na/K/ATPase [28, 73]. Deshalb waren bei SGK1-knock-out Mäusen die Natriumrückresorption unter salzreicher Ernährung unverändert [28]. Unter salzarmer Diät war die Natriumexkretion trotz erhöhter Plasmaaldosteronwerte und proximal-tubulärer Natriumrückresorption sehr hoch [28]. Der Grund dafür ist könnte eine verminderter NaCl-Kotransport im distalen Tubulus sein [28, 29].

In insulinresistenten Mäusen konnte gezeigt werden, dass unter der Insulinresistenz weniger ENaCs in den Sammelrohr-Zellen eingebaut wurden [74]. In einem Tiermodell zeigten Insulin-Rezeptor-defiziente Knock-out-Mäuse ebenfalls eine erhöhte Natriumexkretion [75].

Der distale Tubulus und das Sammelrohr scheinen von der Insulinresistenz beeinflusst zu werden, da sie im Rahmen der Insulinresistenz über den Urin vermehrt Natrium sezernieren.

#### **Kalium**

In SGK1-Knock-Out-Mäusen wurde eine erhöhte ROMK-Dichte beobachtet [71]. In SGK1-defizienten Mäusen fiel aber die Aktivierung der ROMK gering aus [28]. Dies lässt vermuten, dass die Sammelrohrzellen entweder nicht von der Insulinresistenz betroffen sind oder weitere Mechanismen hinter der Regulierung des Kaliumhaushaltes stecken.

SGK1 knock-out Mäuse entwickelten eine Hyperkaliämie, weil Kalium nicht ausreichend ausgeschieden wurde, obwohl genügend Kalium im Körper vorhanden war [28, 29]. Trotz kompensatorisch hoher Plasma-Aldosteronwerte zeigte sich eine niedrige Kaliumexkretion [28, 29, 71]. Eine SGK1-Defizienz resultiert somit in einer erniedrigten Kaliumexkretion [28, 29].

#### **1.4 FRAGESTELLUNG DER DISSERTATION**

Seit der Entdeckung und Definition des Begriffes Insulinresistenz wurde in den letzten Jahren viel geforscht, um Pathomechanismen der Insulinresistenz zu verstehen. Während man lange Zeit den Fokus auf die klassischen insulinsensitiven Organe wie Leber, Skelettmuskulatur und Fettgewebe richtete, weiß man heute, dass Insulin in zahlreichen anderen Zellstrukturen modulierend wirkt. Bisher ist noch nicht geklärt, ob Insulin ein Regulator in der Niere und die Niere somit ein insulinsensitives Organ ist. Bekannt ist, dass in der Niere beide Insulinrezeptoren existieren. Daraus resultierend stellt sich die Frage, ob die Niere im Rahmen einer Insulinresistenz genauso resistent gegenüber Insulin, wie andere insulinsensitive Zellen in der Leber, Muskulatur und Fettgewebe, ist. Diese ist in der aktuellen Forschung noch unbeantwortet. Zudem ist ebenfalls unklar, welche Nierenzellen von der Resistenz betroffen sind. Deswegen soll in dieser Arbeit unter Verwendung von insulinresistenten Leptin-defizienten Mäusen die Auswirkung der Insulinresistenz auf renal tubuläre Funktionen, insbesondere auf den Elektrolyttransport, untersucht werden. Ziel dieser Arbeit ist es, die Auswirkung der akuten Insulinwirkung auf den Transport von Natrium, Kalium, Calcium, Phosphat und Magnesium in insulinsensitiven und insulinresistenten Mäusen zu untersuchen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

---

### 2.1 MATERIAL

*Tabelle 1: Geräte*

Eppendorf® Original Model 4780 Repeating Pipette	Eppendorf AG
Eppendorf Research® (0,5 µl -10 µl)	Eppendorf AG
Eppendorf Research® (10 µl -100 µl)	Eppendorf AG
Eppendorf Research® (1000 µl)	Eppendorf AG
Eppendorf Research® (20 µl -200 µl)	Eppendorf AG
Eppendorf Research® plus (0,1 µl -2,5 µl)	Eppendorf AG
Eppendorf Research® plus (100 µl- 1000 µl)	Eppendorf AG
Eppendorf Research® plus (2 µl -20 µl)	Eppendorf AG
Eppendorf Research® pro 20-300µl (multi-channel)	Eppendorf AG
Flammenphotometer EFUX 5057	Eppendorf AG
Hybridization Oven/Shaker	Amersham Life Science
IL GEM® Premier 3000	Instrumentation Laboratory GmbH
Kern PCB 100-3 Präzisionswaage	KERN
Labnet Vortex VX100	Labnet International, Inc
Liebherr Comfort Kühlschrank 2-8°C	Liebherr
Liebherr Gefrierschrank -24°C	Liebherr
Megafuge 2.0R	Heraeus Instruments
Mikrotiterplatten-Lesegerät	
Stoppuhr	

*Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien*

AESCULAP®- Messer	BRAUN
Blutgaskapillaren 280 µl	Hirschmann® Laborgeräte

CELLSTAR® PP-Test tubes, 15 ml	Greiner Bio-One GmbH
CELLSTAR® TUBES, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH
CONTOUR® NEXT Blutzuckermessgerät	BAYER AG
CONTOUR® NEXT Sensoren für die Blutzuckerbestimmung	BAYER AG
epT.I.P.S. Standard 20-300 µl	Eppendorf AG
Haematokrit Kapillaren 75 µl	Hirschmann® Laborgeräte
INJEKT F Feindosierungsspr. 1 ml	BRAUN
Mincaps® end to end IN20 °C	Hirschmann® Laborgeräte
Nitrile Powder-Free Medical Examination Gloves	Abena A/S
Pipettenspitze 10 µl	SARSTEDT AG & Co. KG
Pipettenspitze 1000 µl	SARSTEDT AG & Co. KG
Pipettenspitze 200 µl	SARSTEDT AG & Co. KG
Reaction Tubes 2 ml	Greiner Bio-One GmbH
Reagiergefäß 0,5 ml	SARSTEDT AG & Co. KG
Rotilabo®- Schnappdeckelfläschchen ND22	Carl Roth GmbH und Co. KG
Sterican® Einmalkanülen 30 G 1/2	BRAUN

*Tabelle 3: Kits*

Aldosteron ELISA	IBL INTERNATIONAL GMBH
Ampuwa®	Fresenius Kabi Deutschland GmbH
Aqua Dest	
Isotonische Kochsalzlösung NaCl 0,9 %, 100 ml	Fresenius Kabi Deutschland GmbH
LT-SYS® Creatinin Jaffé, flüssig (LT-CR 0121)	Labor + Technik Eberhard Lehmann GmbH
LT-SYS® Glucose Hexokinase (LT-GLH 202)	Labor + Technik Eberhard Lehmann GmbH
LT-SYS® Magnesium (LT-MG 0100)	Labor + Technik Eberhard

				Lehmann GmbH
LT-SYS® 0100)	Phosphor	anorganisch	(LT-PH	Labor + Technik Eberhard Lehmann GmbH

*Tabelle 4: Medikamente*

Isofluran CP® 1 ml/ml	cp-pharma® BURG DORF
Glucose G- 40 % Infusionslösung	BRAUN
NovoRapid® Penfill® 100 Einheiten/ml	Novo Nordisk Pharma GmbH
Isotonische Kochsalzlösung NaCl 0,9 %, 100 ml	Fresenius Kabi Deutschland GmbH

*Tabelle 5: Tierhaltung*

Espen-Tiereinstreu AB	AsBe-Wood GmbH
Leitungswasser	Stadtwerke Tübingen
ssniff® Futtermittel für Ratten und Mäuse	ssniff® Spezialdiäten GmbH
Typ I und II Käfige	



## **2.2 METHODEN**

### **2.2.1 Tiermodell und Tierhaltung**

#### **2.2.1.1 Tiermodell**

Die Tierexperimente wurden an adipösen Leptin-defizienten BTBR-Mäuse  $Lep^{ob/ob}$  (im Folgenden: KO-Mäuse) und ihren schlanken Wildtyp-Kontrollen BTBR  $Lep^{wt/wt}$  (im Folgenden: WT-Mäuse) im Alter von 35 bis 50 Tagen durchgeführt. BTBR steht für Black and Tan Brachyuric Mice. Um sowohl BTBR  $Lep^{ob/ob}$ -Mäuse als auch BTBR  $Lep^{wt/wt}$ -Mäuse zu erhalten, wurden heterozygote BTBR  $Lep^{wt/ob}$ -Weibchen mit BTBR  $Lep^{wt/ob}$ -Männchen verpaart. Die Wurfgröße betrug um die 6 Jungen. Leptin ist ein im Hypothalamus Sättigungsgefühl auslösendes und Hungergefühl unterdrückendes Hormon [76-78]. Durch fehlendes Leptin entwickeln die Tiere ab dem Alter von 30 Tagen eine Adipositas, eine Hyperglykämie und Hyperinsulinämie (siehe Kapitel 3.1 Wachstum, Fress- und Trinkverhalten) [76, 79]. Die Hyperinsulinämie unterdrückt die mRNA Expression des Insulin-Rezeptor-Substrat 2 [76, 80]. All diese Faktoren führen zur Insulinresistenz, welche mit dem Alter fortschreitet. Ihr metabolisches Syndrom wird mit einer eintretenden Fettstoffwechselstörung vervollständigt [76, 80-83]. Eine diabetische Nephropathie entwickeln sie im Alter von 144 Tagen [84].

Das eintretende metabolische Syndrom ähnelt stark dem menschlichen Diabetes mellitus und das Tier besitzt dem Menschen analoge Organstrukturen, deshalb ist dieses Mausmodell besonders geeignet, um Fragen der Insulinresistenz zu untersuchen.

#### **2.2.1.2 Tierhaltung**

Die genetisch veränderten Mäuse (BTBR  $Lep^{ob/ob}$ ) und ihren Wildtypen (BTBR  $Lep^{wt/wt}$ ) wurden bis zum Alter von ca. 27- 30 Tagen in Typ II long Käfigen in gleichgeschlechtlichen Gruppen gehalten. Es wurden sowohl männliche als auch weibliche Versuchstiere verwendet.

Die Tiere hatten mit Ausnahme der Fastenzeiten ad libitum Zugang zu Futter und Trinken und wurden in Typ I Einzelkäfigen mit Streu (Espenholz), einem

Käfig-Accessoire (rotes Haus und/oder Holzröhrchen) und Nestbaumaterial (Zellulose) bei 22-24 °C bei regelmäßigem Hygienemonitoring gehalten. Mit einer Hellphase von 12h/ Tag wurde ein konstanter Tag- Nacht-Rhythmus sichergestellt.

Die Versuche wurden an 35-50 Tage alten Tieren durchgeführt. Die maximale Beobachtungszeit betrug 150 Tage. Im Alter von 150 Tagen wurden die Tiere tierschutzkonform euthanasiert.

Die Studie wurde unter der Nummer M 1/17 durch das Regierungspräsidium Tübingen genehmigt. Die Zuchttiere stammen aus dem Universitätsklinikum Freiburg und wurden freundlicherweise von Herrn PD Dr. Florian Grahammer (Universitätsklinik Hamburg) zur Verfügung gestellt.

### **2.2.2 Studienaufbau**

Der experimentelle Teil der Studie beinhaltet eine Vorbereitungsphase und zwei, durch einen eintägigen Erholungstag getrennte, Interventionstage. Zunächst wurde in der Vorbereitungsphase das Gewicht, Trink- und Fressverhalten untersucht und ein Blutzuckermonitoring durchgeführt. Ab dem Alter von 27 Tagen wurden die Mäuse regelmäßig über einen Zeitraum von 123 Tagen gewogen. Spätestens ab dem Alter von 30 Tagen wurden sie in Einzelkäfigen gehalten, um so die Fress- und Trinkmenge individuell zu messen. Das Blutzuckermonitoring und Glucose- sowohl Insulintoleranztests erlaubten, das Alter der Mäuse, in welchem zum einem die Insulinresistenz vorhanden ist, zum anderen aber der Nüchternblutzucker beider Gruppen nach 6 h Fasten nicht über 250 mg/dl beträgt, um die Beeinflussung der Messergebnisse durch Effekte der Glukosurie zu verhindern, zu erfassen.

### **2.2.3 Experimente und Probengewinnung**

Zur Untersuchung der Fragestellung wurden Versuchstiere im Alter von 35 bis 50 Tagen wurde Vehikel intraperitoneal (0,9 % NaCl, 15 µl/g KG) und im Abstand von zwei Tagen Insulin intraperitoneal (0,1 mU/g KG) verabreicht und der Urin jeweils über 2 Stunden gesammelt.

Zur Vorbereitung wurden die Mäuse spätestens im Alter von 30 Tagen aber mindestens 1 Woche vor Versuchsbeginn getrennt und zur Akklimation in Typ I Einzelkäfige gesetzt, weil die Experimente in Einzelkäfige stattfanden.

### 2.2.3.1 Versuchsablauf: Intraperitoneale Injektion von NaCl und Insulin

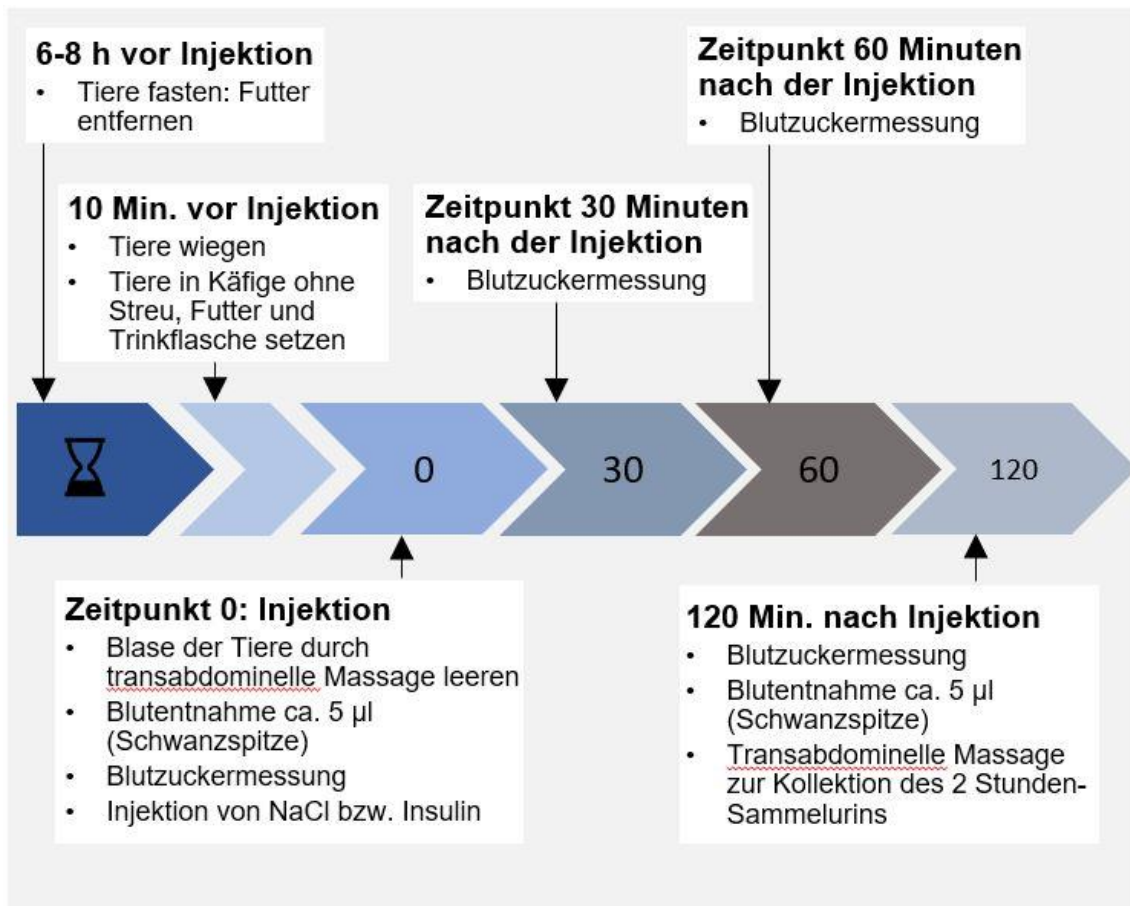


Abbildung 6: Studiendesign: Zeitlicher Ablauf der Interventionstage

Dargestellt ist der Versuchsablauf der intraperitonealen Vehikel- und Insulin-Injektion mit anschließender Probenkollektion. Abgebildet ist der Versuchsablauf der intraperitonealen Insulin-Injektion mit anschließender Probenkollektion.

Am Morgen eines Versuchstages wurde um 8:00 Uhr das Futter aus dem Käfig entfernt, während der Fastenzeit hatten die Mäuse weiterhin Zugang zu Leitungswasser. Nach sechs Stunden Fasten wurden die Mäuse gewogen und in Einzelkäfige ohne Streu gesetzt, welche durch ein bis zwei Tücher abgedeckt wurden, um den Mäusen einen Rückzugsort zu gewährleisten.

Nach einer transabdominellen Blasenmassage zur Blasenentleerung, wurde der gewonnene Urin verworfen. Danach wurde eine Blutprobe von ca. 5 µl aus dem Schwanz in eine Hämatokritkapillare entnommen. Nachdem die Blutentnahme erfolgte und der Blutzucker zum Zeitpunkt 0 aus dem Schwanz gemessen wurde, konnte gewichtsadaptiert am ersten Versuchstag 0,9 % NaCl und am

folgenden Versuchstag Insulin aspart (0,1 mU/g KG) mit einer 30 G Einmalkanüle intraperitoneal in den linken Unterbauch injiziert.

Für die Injektion wurden an ersten Tag pro Gramm Körpergewicht 15 µl isotonische Kochsalzlösung injiziert. Zur Injektion am zweiten Interventionstag wurde einige Minuten vor Versuchsbeginn eine Lösung erstellt. Insulin aspart und NaCl 0,9 % wurden so gemischt, dass in 15 µl Lösung 0,1 mU Insulin enthalten und somit wurden pro Gramm Körpergewicht 0,1 mU Insulin injiziert. Für die intraperitoneale Injektion wurde Insulin-Aspart (NovoRapid®) verwendet. Insulin-Aspart ist ein kurzwirksames Insulin. Es wirkt bereits nach ca. 15 Minuten für eine Dauer von ca 2-3 Stunden. Die maximale Wirkung nach subkutaner Gabe erreicht Insulin-Aspart beim Menschen nach ca. 1 Stunde [85]. Die tatsächlich injizierte Menge variiert an beiden Versuchstagen minimal, da immer auf- bzw abgerundet wird.

Der Blutzucker wurde dann in der ersten Stunde in halbstündlichem Abstand (0 Minuten, 30 Minuten, 60 Minuten), danach in stündlichem Abstand aus wenigen Tropfen Blut aus dem Schwanz gemessen (nach 120 Minuten). Nach diesem zweistündigen Versuch wurde erneute eine Blutprobe entnommen und um Urinproben zu gewinnen wurde die Blase mittels transabdomineller Massage entleert und eventuell der Urin bei spontaner Blasenentleerung im Käfig mittels Pipette kollektiert. Der Sammelurin von 2h wurde bei - 20°C eingefroren. Die Blutproben wurden 15 Minuten lang bei 1892 G (3000 rpm) zentrifugiert, um das Plasma zu separieren und bei - 20°C einzufrieren.

Die Blutproben von 6 Mäusen, welche am Ende vor Tötung der Mäuse entnommen wurden, wurden ca. 30 Minuten bei 725 G (1891 rpm) zentrifugiert, um das Plasma von den festen Blutbestandteilen zu trennen, um es dann bei bei - 20°C für weitere Forschungsvorhaben einzufrieren.

## **2.2.4 Parameter und Messungen**

### **2.2.4.1 Klinische Chemie**

Aus dem 2 Stunden- Sammelurin wurden die Elektrolyte Phosphat, Natrium, Kalium, Calcium, Magnesium und das Kohlenhydrat Glucose bestimmt. Diese

Messwerte wurden auf das gemessene Kreatinin, das Urinvolumen, auf das an dem Tag gewogene Körpergewicht, die errechnete Fressmenge, die pro Körpergewicht ausgeschiedene Kreatininmenge und das pro Körpergewicht ausgeschiedene Urinvolumen normiert.

Die Bestimmung von Kreatinin, Phosphat, Magnesium und Glucose wurde mit Hilfe der LT-SYS® Kits durchgeführt.

### **Urin Kreatinin- LT-SYS® Creatinin Kit; Jaffé, kinetisch ohne Enteiweißung (LT-CR 0121)**

In dem Kit zur Messung von Creatinin im Urin sind Natronlauge, Pikrinsäure und eine Standardlösung mit einer Kreatininkonzentration von 2,00 mg/dl (177 µmol/l) enthalten.

Die Kreatininmessung nach der Jaffé Methode beruht auf der Komplexbildung von Pikrinsäure mit Kreatinin im alkalischen Milieu [86]. Der entstehende dunkelgelbe Farbkomplex kann welcher photometrisch quantifiziert werden [86].

Zur Vorbereitung der Arbeitslösung werden 1 Teil Natronlauge (c = 300 mmol/l) und Natriumdihydrogenphosphat (c = 25 mmol/l) und 1 Teil Pikrinsäure (c = 8,7 mmol/l) gemischt [86]. Zu Beginn werden die Urinproben auf das 20-fache verdünnt. Einige Urinproben mussten auf das Zehnfache bzw. Fünffache verdünnt werden, damit zuverlässige Ergebnisse erzielt werden. Nun werden in die Küvetten 10 µl des Leerwertes (Ampuwa), der Standardlösung und der Urinproben pipettiert. Nach dem Pipettieren von 200 µl der working solution in die Küvetten mit den Proben, wird die Lösung mit Hilfe eines Vortex Geräts verwirbelt. Sofort im Anschluss und nach weiteren 8 Minuten wird die Extinktion bei  $\lambda = 490$  nm gemessen [86]. Die Kreatininkonzentration wird nach folgender Formel berechnet:

$$c[\text{Kreatinin}] = \frac{\Delta \text{Extinktion} [\text{Probe}]}{\Delta \text{Extinktion} [\text{Standard}]} \times c[\text{Standard}]$$

Die obere Nachweisgrenze liegt bei 300 mg/dl, die untere Nachweisgrenze bei 0,03 mg/dl. Bis zur oberen Nachweisgrenze verhält sich die Kurve der Konzentration linear.

## **Plasma und Urin Phosphat- LT-SYS® Phosphor Kit; anorganisch (LT-PH 0100)**

Die Phosphatbestimmung aus dem Urin und Plasma wurde mit dem Kit LT-SYS® Phosphor Kit durchgeführt. In dem Kit zur Messung von Phosphat im Urin sind eine gebrauchsfertige Reagenzlösung, bestehend aus Ammoniummolybdate ( $c = 12 \text{ mmol/l}$ ) und Schwefelsäure ( $c = 2,2 \text{ mol/l}$ ), und eine Standardlösung mit einer Phosphatkonzentration von  $1,29 \text{ mmol/l}$  ( $4 \text{ mg/dl}$ ) enthalten.

Diese Messung ist photometrisch möglich, weil Phosphat in Gegenwart von Sulfonysäure an Ammonium bindet [87]. Die Farbentwicklung des Komplexes wird bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 340 \text{ nm}$  gemessen [87].

Zunächst werden  $3 \mu\text{l}$  des Leerwertes (Ampuwa), der Standardlösung, der Urinproben (verdünnt 1:20) und der Plasmaproben (unverdünnt) in Küvetten pipettiert. Nun werden  $300 \mu\text{l}$  der Reagenzlösung hinzugefügt und die Küvetten werden bei Raumtemperatur 10 Minuten inkubiert.

Die Lösungen sind 30 Minuten lang stabil, nach 10 Minuten, aber spätestens 30 Minuten wird die Extinktion gegen den Luftleerwert bei  $340 \text{ nm}$  gemessen [87]. Der Phosphatgehalt errechnet sich anhand folgender Formel:

$$c[\textit{Phosphat}] = \frac{\Delta \textit{Extinktion} [\textit{Probe}]}{\Delta \textit{Extinktion} [\textit{Standard}]} \times c[\textit{Standard}]$$

Auch hier waren einige Urinproben zu stark verdünnt, denn die gemessenen Werte waren nicht innerhalb der oberen und unteren Nachweisgrenze. Deshalb wurden einige Proben erneut bei einer Fünffachen Verdünnung oder komplett unverdünnt gemessen.

## **Urin Magnesium- LT-SYS® Magnesium (LT-MG 0100)**

Die Magnesiumbestimmung aus dem Urin wurde mit dem Kit LT-SYS® Magnesium durchgeführt. In dem Kit zur Messung von Magnesium im Urin sind eine gebrauchsfertige Reagenzlösung, bestehend aus Trispuffer ( $c = 250$

mmol/l) und Xylidylblau ( $c = 1 \text{ mmol/l}$ ), und eine Standardlösung mit einer Magnesiumkonzentration von  $0,82 \text{ mmol/l}$  ( $2,00 \text{ mg/dl}$ ) enthalten.

Magnesium reagiert im alkalischen Milieu mit Xylidblau zu einem Chelatkomplex [88]. Die Extinktion des Chelatkomplexes wird photometrisch gemessen und steigt proportional zur Magnesiumkonzentration in der Urinprobe [88]. Um Interaktionen mit Calcium zu vermeiden, werden in dieser Messung die Ionen mit EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure) komplexiert [88].

Das Prinzip dieser Messung ähnelt der Phosphatmessung. Zunächst werden  $3 \mu\text{l}$  des Leerwertes (Ampuwa), der Standardlösung, der Urinproben (verdünnt 1:10) in Küvetten pipettiert. Nun werden  $300 \mu\text{l}$  der Reagenzlösung hinzugefügt und die Küvetten werden bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert.

Nach 5 Minuten wird die Extinktion der Proben gegen den Reagenzleerwert bei  $520 \text{ nm}$  gemessen. Der Magnesiumgehalt errechnet sich aus folgender Formel:

$$c[\text{Magnesium}] = \frac{\Delta \text{Extinktion} [\text{Probe}]}{\Delta \text{Extinktion} [\text{Standard}]} \times c[\text{Standard}]$$

### **Urin Glucose - LT-SYS® Glucose Hexokinase (LT-GLH 202)**

Die Glucosebestimmung aus dem Urin wurde mit dem Kit LT-SYS® Glucose Hexokinase durchgeführt. In dem Kit zur Messung von Glucose im Urin sind zwei gebrauchsfertige Reagenzlösungen (Reagenz 1 und Reagenz 2) und eine Standardlösung mit einer Glucosekonzentration von  $100 \text{ mg/dl}$  enthalten. Reagenz 1 beinhaltet Trisphosphat ( $c = 100 \text{ mmol/l}$ ,  $\text{pH } 7,8$ ), Magnesiumionen ( $c = 4 \text{ mmol/l}$ ), Adenosintriphosphat (ATP) ( $c = 2,1 \text{ mmol/l}$ ) und Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD) ( $c = 2,1 \text{ mmol/l}$ ). Reagenz 2 beinhaltet Magnesiumionen ( $c = 4 \text{ mmol/l}$ ), Hexokinase ( $c > 7,5 \text{ kU/l}$ ) und Glucose-6-phosphatdehydrogenase ( $c > 7,5 \text{ kU/L}$ ).

Diese Messmethode bestimmt den Glucosegehalt einer Probe mit Hilfe einer enzymatischen Reaktion mit der Hexokinase (Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase) [89]. Glucose reagiert zunächst mit ATP zu Glucose-6-phosphat und Adenosindiphosphat (ADP) [89]. Glucose-6-phosphat reagiert



weiter mit NAD<sup>+</sup> zu Glucunat-6-P und der reduzierten Form des NAD<sup>+</sup>, dem Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NADH), und Wasserstoff (H<sup>+</sup>) [89]. Die spezifische Absorption bei der Reduzierung von NAD zu NADH kann photometrisch bei 340 nm bestimmt werden [89].

Zunächst werden 2 µl des Leerwertes (Ampuwa), der Standardlösung, der Urinproben (unverdünnt) in Küvetten pipettiert. Nun werden 200 µl der Reagenzlösung 1 hinzugefügt und die Küvetten werden bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert.

Nach 5 Minuten werden 50 µl der Reagenzlösung 2 hinzugefügt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert [89]. Die Extinktion der Proben werden innerhalb von 30 Minuten gegen den Reagenzleerwert bei 340 nm gemessen [89]. Der Glucosegehalt errechnet sich aus folgender Formel:

$$c[\text{Glucose}] = \frac{\Delta \text{Extinktion} [\text{Probe}] - \Delta \text{Extinktion} [\text{Leerwert}]}{\Delta \text{Extinktion} [\text{Standard}] - \Delta \text{Extinktion} [\text{Leerwert}]} \times 100$$

### **Urin Natrium, Kalium und Calcium- Flammenphotometrie**

Bei der Messung von Elektrolytkonzentrationen Natrium, Kalium und Calcium im Urin wurde der Flammenphotometer EFUX 5057 genutzt.

Die zu messende Probe wird mit Pressluft vernebelt und mit dem Brenngas (Acetylgas) zusammen in die Flamme zugeführt. Somit werden die Elektronen auf ein höheres Energieniveau befördert, welches sie aber nur für kurze Zeit halten können [90]. Bei Übergang in das ursprünglichere niedrigere Energieniveau wird Energie frei, welche als Strahlung einer spezifischen Wellenlänge sichtbar wird [90]. Verschiedene Elektrolyte der Alkali-Gruppe verändern somit die Farbe der Flamme.

Bei dieser Messung wird die Lichtquelle in die verschiedenen Wellenlängen separiert, damit nur die für das Atom charakteristische Wellenlänge gemessen wird.

Die Konzentrationen der meisten Proben wurden vollautomatisiert bestimmt. Bei 14 Proben lagen die Konzentrationen außerhalb des außerhalb der

Referenzbereiche für Na<sup>+</sup>: 10,0 - 300,0 mmol/l, K<sup>+</sup>: 5,0 - 200,0 mmol/l und Ca<sup>2+</sup>: 0,5 - 20,0 mmol/l. Deshalb wurden diese erneut manuell nachgemessen.

### **Blutgasanalysen**

Am Ende der Versuchsreihe, wurde in eine Blutgaskapillare ca. 150 µl frisches Kapillarblut gewonnen. Direkt im Anschluss wurden mithilfe des Automaten IL GEM® Premier 3000 (Instrumentation Laboratory GmbH) folgende Parameter bestimmt und berechnet: pH, pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub> [mmHg], Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> (pH 7,4), HCO<sub>3</sub> (Bikarbonat), Standard-HCO<sub>3</sub> (Standard-Bikarbonat), Base Excess [mmol/l], Hämatokrit [%], cHbc (kalkulierte Hämoglobinkonzentration) [g/dl], SO<sub>2</sub>c (kalkulierte Sauerstoffsättigung) [%].

### **Messung der Gewichts-, Fress- und Trinkwerte**

Für die Untersuchung des Gewichtsverlauf, Futter- und Trinkverhalten dieses Mausmodells, wurden die Tiere ab dem Alter von 30 bis 150 Tagen regelmäßig gewogen.

Um die gesamte Fressmenge zu ermitteln wurde an bestimmten Tagen das Futter, der in den Einzelkäfigen sitzenden Mäuse, gewogen. Im nächsten Schritt wurde die gewogene Fressmenge auf das Körpergewicht bezogen, indem die Fressmenge durch das Körpergewicht der Maus am selben Tag dividiert wurde.

Die Trinkmenge wurde ebenfalls vorab gemessen und dann durch Division auf das Körpergewicht der Maus normiert.

#### **2.2.5 Ergebnisanalyse**

Alle Werte werden in der Regel als Mittelwerte inklusiver Standardfehler des Mittelwerts ( $\pm$ SEM) gezeigt, Abweichungen werden angegeben. Die Anzahl n ist definiert durch die Anzahl der Versuchstiere.

Zunächst erfolgte die Testung auf Normalverteilung mittels Anderson-Darling Test D'Agostino & Pearson Test, Shapiro-Wilk Test und Kolmogorov-Smirnov Test. Im Falle einer Normalverteilung wurde ein ANOVA, Brown-Forsythe Test, Bartlett's Test zur Varianzanalyse und ein Holm-Sidak's multiple comparisons Test, Sidak's multiple comparasion Test, unpaired t- Test oder Extra sum-of-

squares F Test zur Signifikanzanalyse durchgeführt. Zeigte jedoch einer der vier oben genannten Tests keine Normalverteilung, wurde der Mann Whitney Test angewandt. Ein P- Wert  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant gewertet. Die gesamte Datenanalyse erfolgte mit Hilfe von Microsoft Office Excel 2010 und GraphPad Prism 8 Graphpad Software Inc.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 WACHSTUM, FRESS- UND TRINKVERHALTEN UND BLUTZUCKER

##### 3.1.1 Gewicht

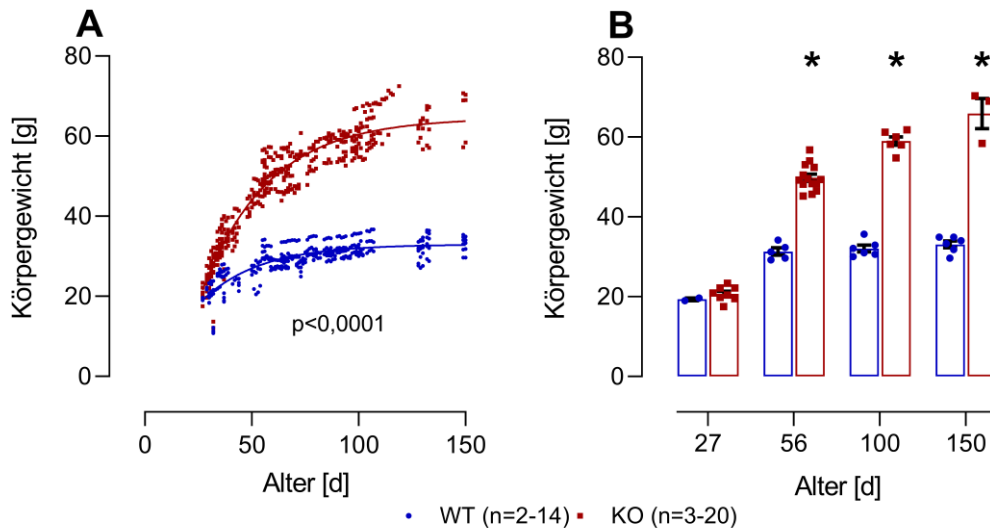


Abbildung 7: Körpergewicht im Verlauf von 123 Tagen

Dargestellt werden die über einen Zeitraum von 123 Tagen gemessenen Körpergewichtswerte von WT-Mäusen  $n=19$  (blau) und KO-Mäusen  $n=34$  (rot) in [g] mit Trendlinie (A) und die Mittelwerte  $\pm$  SEM in einem Balkendiagramm an den Tagen 27, 56, 100, 150 in [g] (B).

\*: sign. Unterschied Körpergewicht der WT-Mäuse vs. KO-Mäuse zum jeweiligen Zeitpunkt ( $p < 0,05$ )

Nach dem Absetzen der Mäuse im Alter von 27 Tagen wogen die WT-Mäuse durchschnittlich  $19,35 \pm 0,35$  g und die KO-Mäuse durchschnittlich  $20,74 \pm 0,66$  g. Es bestand keine signifikante Gewichtsdivergenz. Beide Genotypen nahmen im Verlauf an Gewicht zu. Ab einem Alter von 30 Tagen zeigten sich die ersten signifikanten Unterschiede im Körpergewicht beider Gruppen. Im Alter von 56 Tagen wogen WT-Mäuse durchschnittlich  $31,32 \pm 0,905$  g und KO-Mäuse  $49,99 \pm 1,03$  g ( $p < 0,0001$ , unpaired t-Test). Im Alter von 100 Tagen wog eine KO-Maus im Durchschnitt  $59,45 \pm 1,59$  g und somit nahezu doppelt so viel wie eine gleichaltrige WT-Maus mit einem durchschnittlichen Gewicht von  $32,05 \pm 0,84$  g ( $p < 0,0001$ , unpaired t-Test).

Die Wachstumskurven bewegten sich nach einem ähnlichen Ausgangspunkt auseinander. Die Wachstumskurven waren also signifikant unterschiedlich

( $p < 0,05$  Extra sum-of-squares F Test). Im Alter von 150 Tagen wogen die WT-Tiere durchschnittlich  $33,1 \pm 0,83\text{g}$  und somit weiterhin signifikant weniger als die KO-Mäuse mit einem Gewicht von  $65,9 \pm 3,77\text{ g}$  an Tag 150 ( $p < 0,05$  unpaired t-Test).

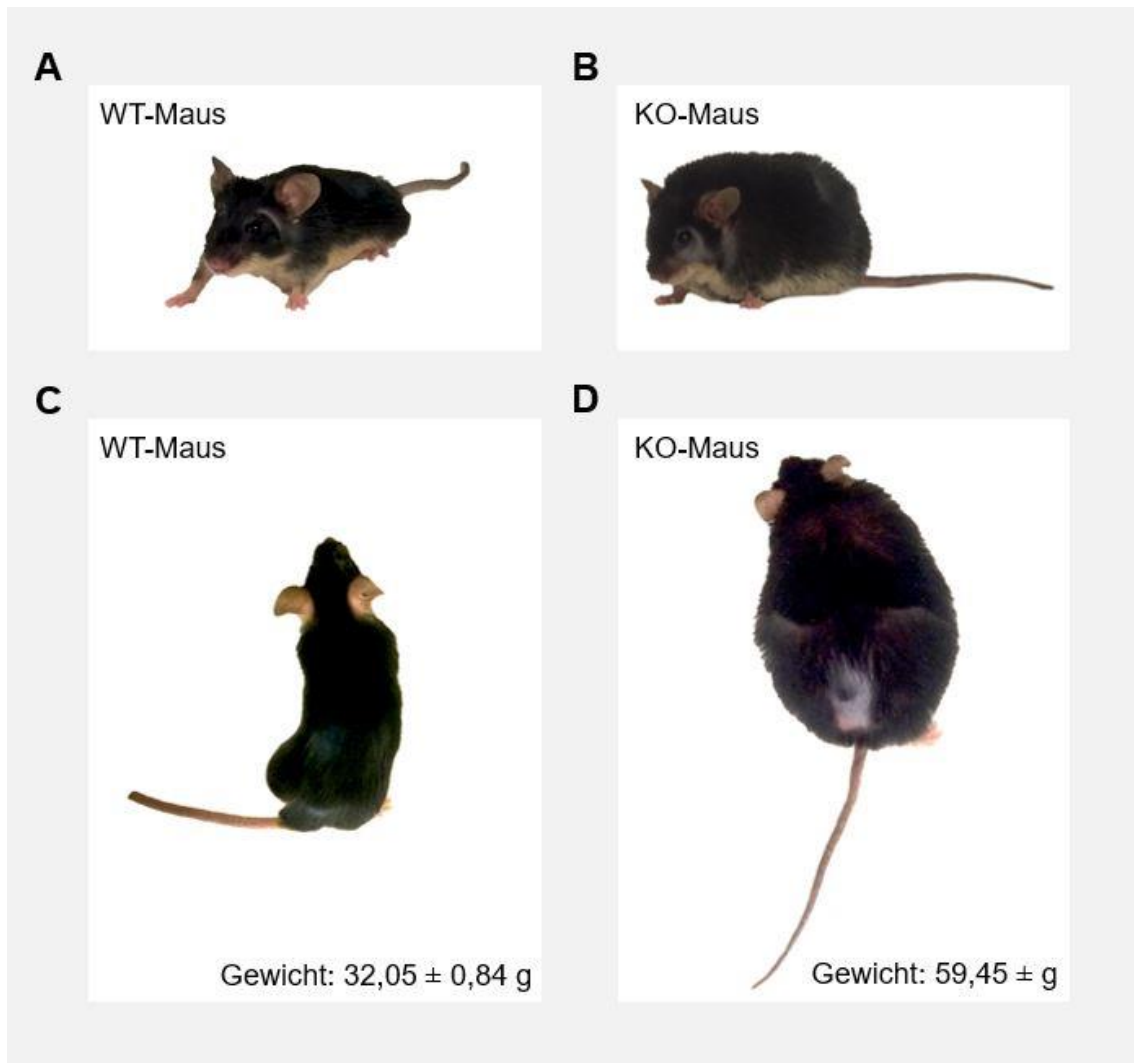


Abbildung 8: Fotografische Dokumentation einer WT- und einer KO-Maus

Dargestellt ist eine WT-Maus in A, C und eine KO-Maus in B, D im Alter von 100 Tagen.

Klinisch imponierten die KO-Mäuse mit einem ausladenden Abdomen und verstrichener Taille.

### 3.1.2 Fress- und Trinkverhalten

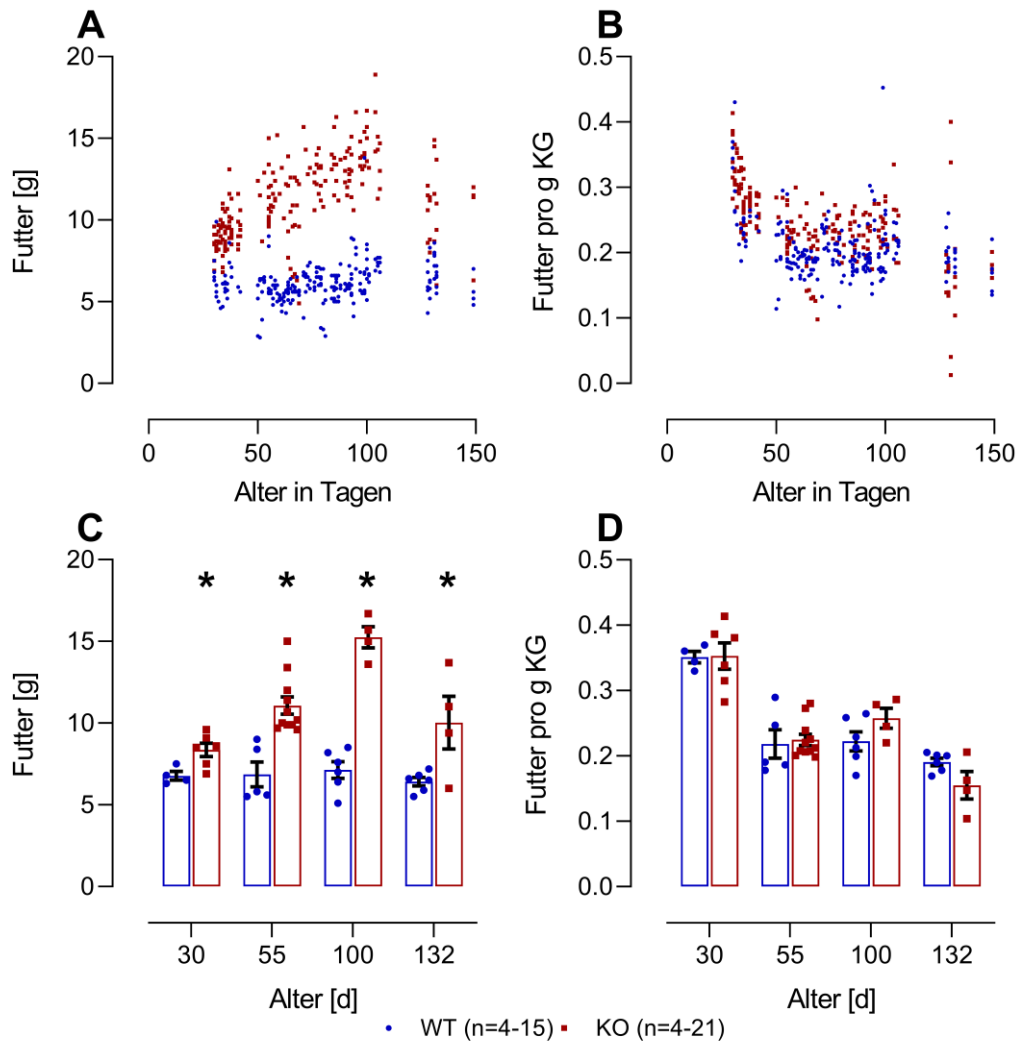


Abbildung 9: Fressmenge im Verlauf von 120 Tagen

Abgebildet sind die über einen Zeitraum von 120 Tagen gemessene absolute Fressmenge von WT-Mäusen  $n=4-15$  (blau) und KO-Mäusen  $n=4-21$  (rot) in [g] (A) und die auf das Körpergewicht normierte Fressmenge in der Einheit pro g KG (B). Die jeweiligen Mittelwerte  $\pm$  SEM der absoluten Fressmenge sind in C und der gewichtsbezogenen Fressmenge sind in D in einem Balkendiagramm an den Tagen 30, 55, 100 und 132 dargestellt.

\*: sign. Unterschied der absolute Fressmenge der WT-Mäuse vs. absolute Fressmenge der KO-Mäuse zum jeweiligen Zeitpunkt ( $p < 0,05$ )

Bereits im Alter von 30 Tagen fraßen KO-Mäuse durchschnittlich  $8,37 \pm 0,4$  g Futter und somit mehr als WT-Mäuse, die im Durchschnitt  $6,78 \pm 0,26$  g Futter

fraßen ( $p=0,0205$ , unpaired t- Test). Auch im Alter von 55 Tagen sah man signifikante Unterschiede im Fressverhalten:  $11,07 \pm 0,53$  g Futter im Vergleich zu  $6,86 \pm 0,76$  g Futter ( $p=0,0005$ , unpaired t- Test). Im Alter von 100 Tagen fraßen KO-Mäuse doppelt so viel wie WT-Mäuse nämlich durchschnittlich  $15,25 \pm 0,65$  g Futter im Vergleich zu  $7,13 \pm 0,51$  g Futter ( $p<0,0001$ , unpaired t- Test). Eine KO-Maus wog im Alter von 100 Tagen ca.  $59,45 \pm 1,59$  g und fraß somit eine Futtermenge, die ca. einem Viertel ihres Körpergewichts entspricht. Im Alter von 132 Tagen fraßen KO-Mäuse weiterhin signifikant mehr ( $10,03 \pm 1,61$  g) als die WT-Mäuse ( $6,42 \pm 0,25$  g) ( $p=0,0249$ , unpaired t-Test). Die Fresskurve der KO-Mäuse stieg mit fortschreitendem Alter und zeigte mehr Dynamik als die Fresskurve der WT-Mäuse, welche sich in dem Bereich zwischen 5 und 7 g bewegte und parallel zur x-Achse verlief.

In dem Zeitraum von 30-50 Tagen fraßen beide Gruppen bezogen auf ihr Körpergewicht viel, hier nahm auch die Gewichtskurve mit steigendem Alter zu (vergleiche Abbildung 7 Körpergewicht im Verlauf von 123 Tagen).

Die Fressmenge bezogen auf das Körpergewicht zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

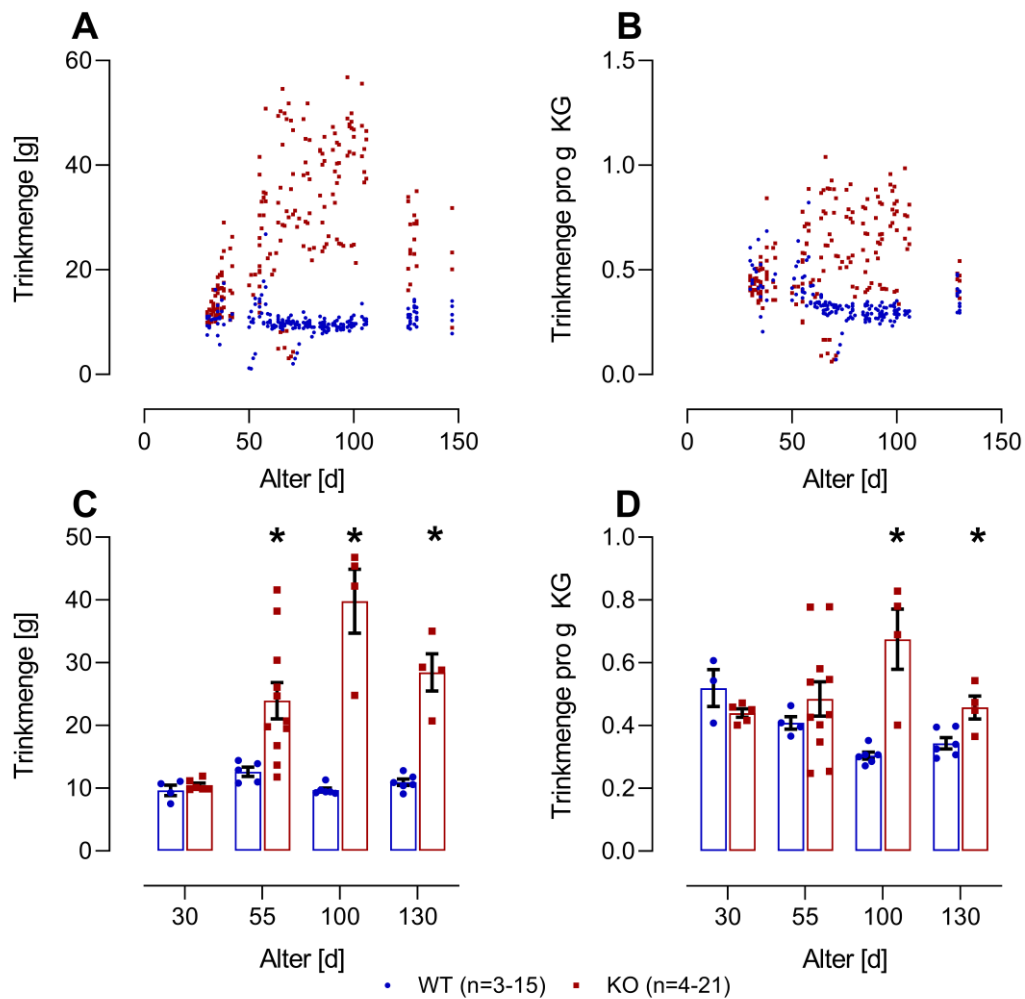


Abbildung 10: Trinkmenge im Verlauf von 120 Tagen

Dargestellt werden die über einen Zeitraum von 120 Tagen gemessene absolute Trinkmenge von WT-Mäusen  $n=33-15$  (blau) und KO-Mäusen  $n=4-21$  (rot) in der Einheit g (A) und die auf das Körpergewicht bezogene Trinkmenge in der Einheit pro g KG (B). Die Mittelwerte  $\pm$ SEM der absoluten Trinkmenge sind in C und die der gewichtsbezogenen Trinkmenge sind in D in einem Balkendiagramm an den Tagen 30, 55, 100 und 130 abgebildet.

\*: sign. Unterschied WT-Mäuse vs. Trinkmenge der KO-Mäuse zum jeweiligen Zeitpunkt ( $p < 0,05$ )

KO-Mäuse tranken im Alter von 55 Tagen doppelt so viel wie WT-Mäuse ( $23,94 \pm 2,88$  ml im Vergleich zu  $12,6 \pm 0,74$  ml,  $p=0,0215$  Mann Whitney Test) und im Alter von 100 Tagen viermal so viel ( $39,80$  ml  $\pm 5,09$  ml im Vergleich zu  $9,72$  ml  $\pm 0,32$  ml,  $p=0,0095$  unpaired t-Test). Im Alter von 130 Tagen tranken KO-



Mäuse durchschnittlich  $28,45 \text{ ml} \pm 2,94 \text{ ml}$  und somit weiterhin signifikant mehr als WT-Mäuse, welche in diesem Alter täglich ca.  $10,93 \text{ ml} \pm 0,52 \text{ ml}$  tranken ( $p < 0,0001$ , unpaired t- Test).

Die Trinkmenge bezogen auf das Körpergewicht zeigte an Tag 100 ( $p = 0,0013$  unpaired t- Test) und Tag 130 ( $p = 0,0142$  unpaired t- Test) signifikante Unterschiede, demnach tranken KO-Mäuse mit fortschreitendem Alter auch in Relation zu ihrem Gewicht mehr als WT-Mäuse. Parallel zur steigenden Trinkmenge zeigte sich ein hoher Gelegenheitsblutzucker (siehe Abbildung 12: Gelegenheitsblutzucker im Verlauf von 90 Tagen).

Zur Veranschaulichung der massiven Unterschiede der totalen Trinkmenge sieht man auf den Fotos die Trinkmenge von Mäusen im Alter von 100 Tagen, Tag 1 bis Tag 3 nach Auffüllen der Flaschen.

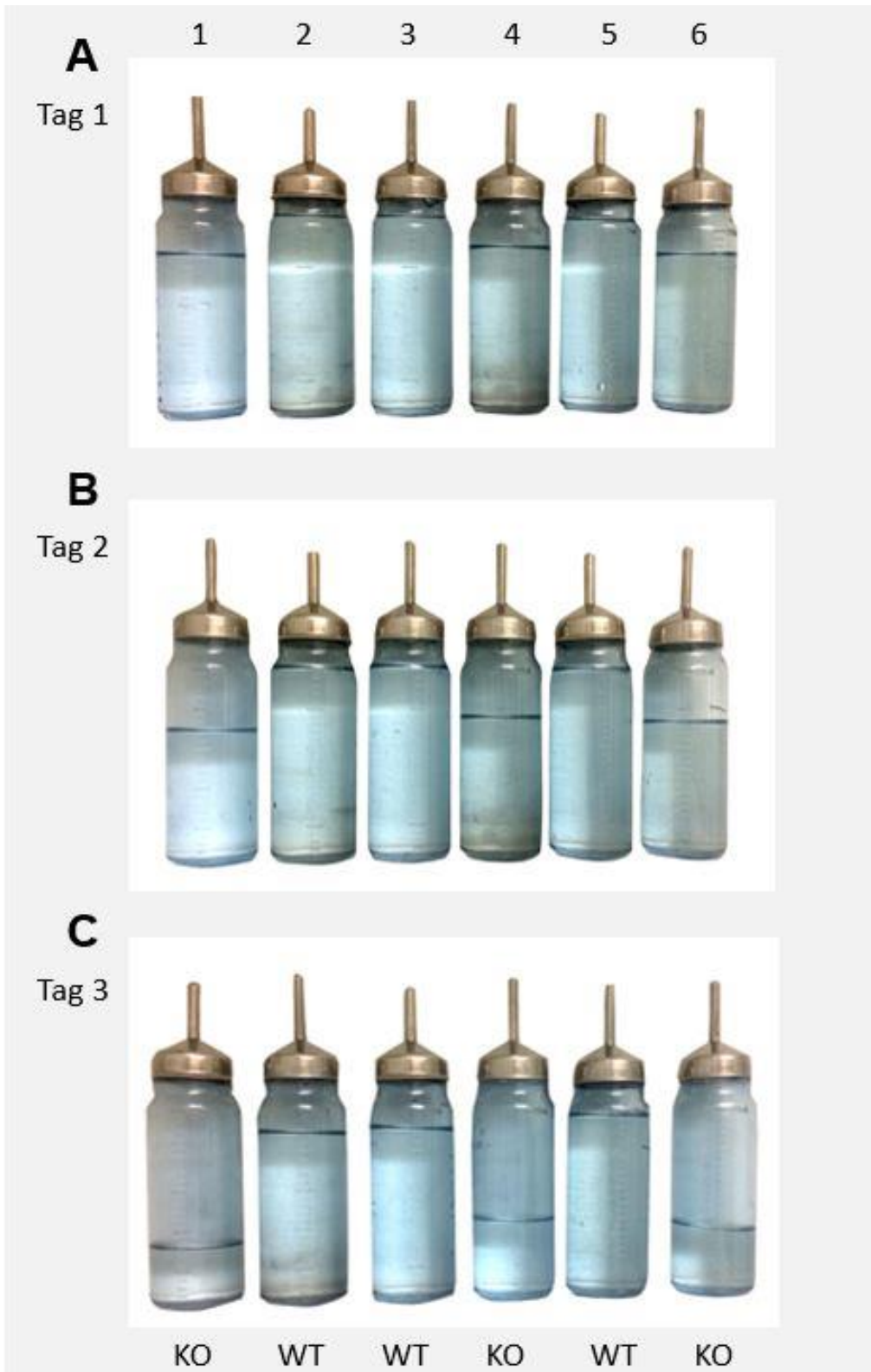


Abbildung 11: Trinkflaschen der KO- und WT-Mäuse

Dargestellt werden die Trinkflaschen der WT- und KO-Mäuse ein Tag (A), zwei Tage (B) und drei Tage (C) nach Auffüllen der Trinkflaschen. Flaschen von links nach rechts 2,3,5 gehören WT-Mäusen und Flaschen 1,4,6 gehören KO-Mäusen.

### 3.1.3 Blutzucker

Der Blutzucker (BZ) der Mäuse wurde zu verschiedenen Zeitpunkten und unterschiedlichen Rahmenbedingungen gemessen. Zum einen wurde der Gelegenheitsblutzucker zufällig und zum anderen nach Fasten von >12 h d.h. über Nacht bestimmt. Zuletzt fasteten die Mäuse tagsüber 6- 8 h lang und danach wurde der Blutzucker gemessen.

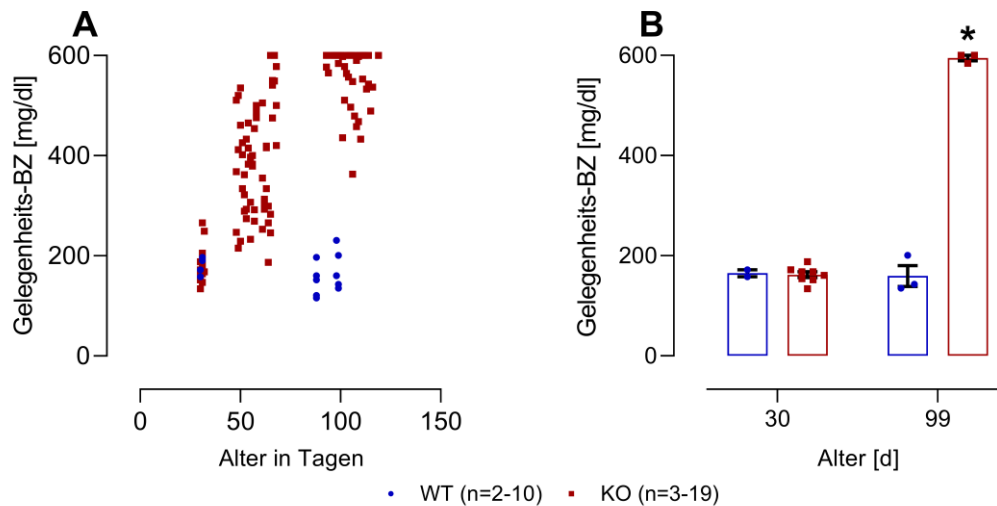


Abbildung 12: Gelegenheitsblutzucker im Verlauf über 90 Tage

Auf dem Diagramm in A sind die Gelegenheits- Blutzuckerwerte in der Einheit mg/dl von 10 WT-Mäusen und 19 KO-Mäusen über einen Zeitraum von Tag 30 bis Tag 120 aufgetragen und in B Mittelwerte  $\pm$ SEM an den Tagen 30 und 99(n(WT)=5, n(KO)=11) sichtbar. Das Gerät misst bis 600 mg/dl, alle Werte, die darüber liegen werden als H1 angezeigt und wurden als 600 mg/dl eingetragen.

\*: sign. Unterschied Gelegenheitsblutzucker der WT-Mäuse vs. Gelegenheitsblutzucker der KO-Mäuse an Tag 99 ( $p < 0,05$ )

Während sich der Gelegenheitsblutzucker der WT-Mäuse unabhängig vom Alter nahezu durchgehend zwischen 150 und 250 mg/dl hielt, befanden sich die Gelegenheitsblutzuckerwerte der KO-Mäuse ab dem Alter von 51 Tagen mindestens über 250 mg/dl.

Im Alter von 30 Tagen zeigten WT- und KO-Mäuse einen vergleichbaren Gelegenheitsblutzucker von durchschnittlich  $165 \pm 7$  mg/dl (WT-Mäuse) und  $162 \pm 5,7$  mg/dl (KO-Mäuse). Im Alter von 99 Tagen war der

Gelegenheitsblutzucker der KO-Mäuse mit durchschnittlich  $594,7 \pm 5,3$  mg/dl mindestens dreifach höher als der der WT-Mäuse mit einem Gelegenheitsblutzucker von  $159,7 \pm 20,8$  mg/dl ( $p < 0,0001$ , unpaired t-Test).

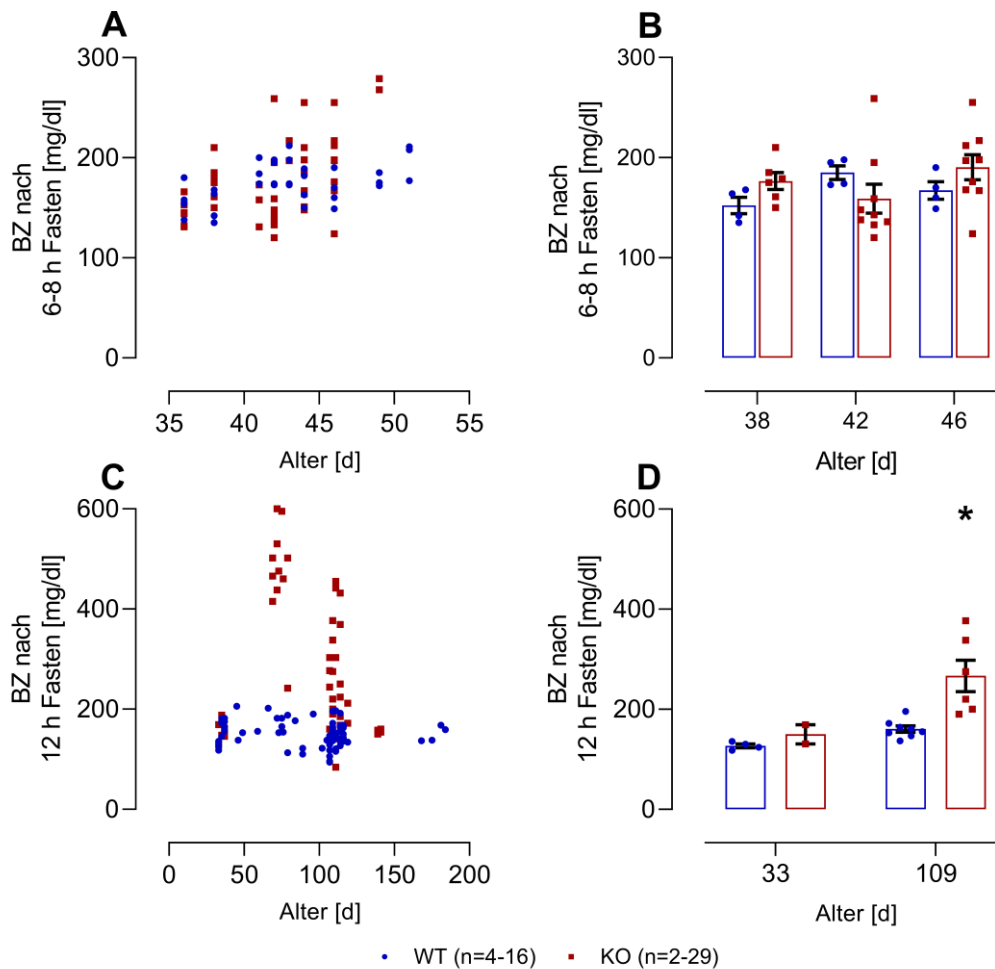


Abbildung 13: Nüchternblutzucker nach 6-8 h und nach 12 h Fasten

Dargestellt werden in A und B der Blutzuckerwerte der WT- und KO-Mäuse nach 6-8 h Fasten und in C und D die Blutzuckerwerte der WT- und KO-Mäuse nach Fasten über Nacht in der Einheit mg/dl ( $n(\text{WT})=4-16$ ,  $n(\text{KO})=2-29$ ).

\*: sign. Unterschied des Blutzuckers nach 12 h Fasten der WT-Mäuse vs. KO-Mäuse an Tag 109 ( $p < 0,05$ )

Im Alter von 36-52 Tagen fasteten die Tiere 6-8 h. Hierbei zeigten sich in den Blutzuckerwerten beider Gruppen keine signifikanten Auffälligkeiten.

Die Tiere fasteten über Nacht durchschnittlich >12 h. Der gemessene Nüchternblutzucker zeigte, dass im Alter von 33 Tagen sowohl die KO- als auch WT-Mäuse auf das Fasten mit einem Blutzuckerabfall reagierten und am Morgen einen durchschnittlichen BZ von  $127 \pm 3,9$  mg/dl und  $150 \pm 19$  mg/dl aufwiesen. Im Alter von 109 Tagen reagierte der Blutzucker der KO-Mäuse auf Fasten mit einem geringeren Abfall als die, der WT-Mäuse, denn die Blutzuckerwerte am Morgen betragen durchschnittlich  $266,7 \pm 31,5$  mg/dl und waren signifikant höher als die der WT-Mäuse mit  $160,6 \pm 6,3$  mg/dl ( $p= 0,0025$  unpaired t-Test). Ältere KO-Mäuse hatten im Alter von 139 Tagen einen durchschnittlichen Nüchtern- BZ von  $154 \pm 4$  mg/dl.

### 3.2 INSULIN-TOLERANZTEST, BLUTZUCKER, KREATININ UND URINVOLUMEN NACH NaCl- UND INSULIN-INJEKTION

#### 3.2.1 Blutzuckerwerte nach NaCl- und Insulin-Injektion

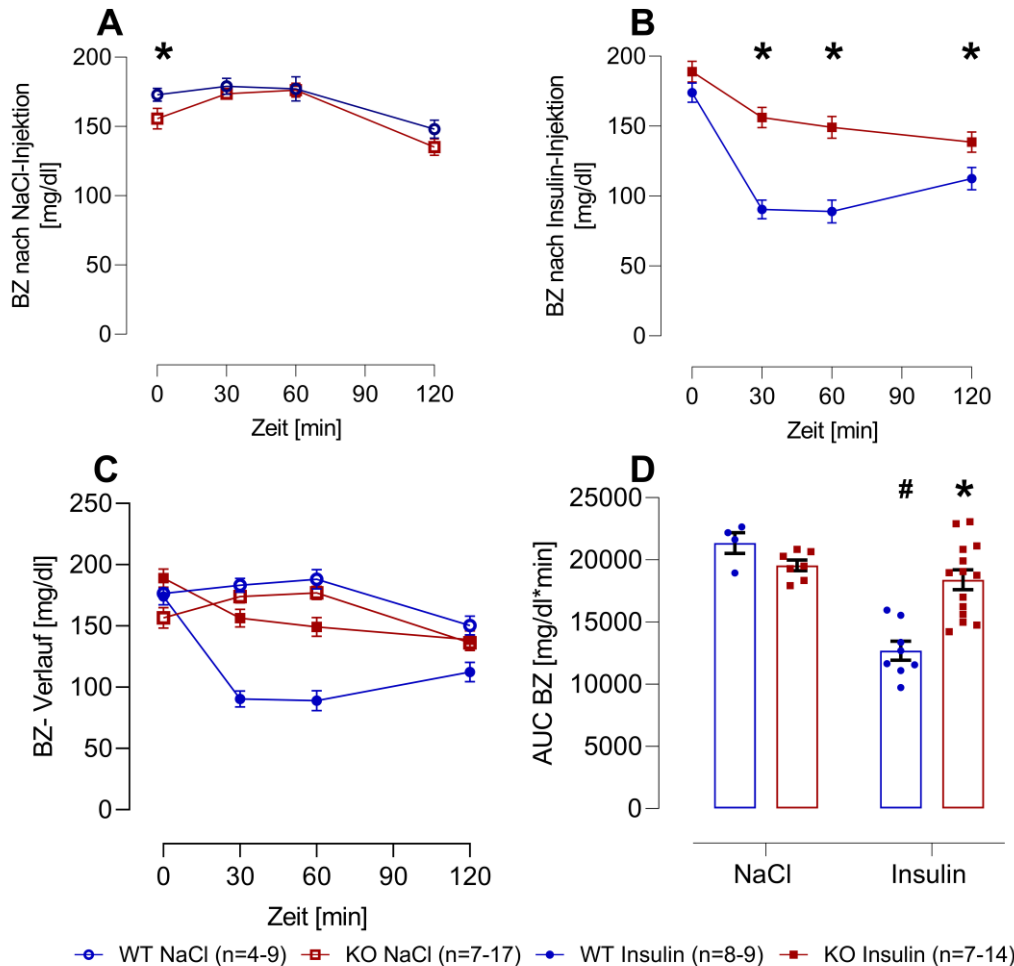


Abbildung 14: Blutzuckerwerte im Verlauf von 2h nach intraperitonealer Injektion von NaCl und Insulin (IPITT)

Dargestellt sind die Blutzuckerwerte gemessen zum Zeitpunkt 0, 30, 60 und 120 Minuten nach Injektion von Gabe von NaCl in A und von Insulin in B. Zusammengefasst werden die Kurven in der Einheit mg/dl in C und das Balkendiagramm D zeigt die Fläche unterhalb der Kurve (AUC) nach NaCl und Insulingabe der WT-Mäuse (blau) und KO-Mäuse(rot) in der Einheit mg/dl\*min.

\*: sign. Unterschied WT-Mäuse vs. KO-Mäuse zum jeweiligen Zeitpunkt ( $p < 0,05$ ) #: sign. Unterschied AUC der WT-Mäuse nach Insulininjektion vs. AUC der KO-Mäuse nach Insulininjektion ( $p < 0,05$ )

An dem Versuchstag der Vehikel-Injektion (NaCl) starten die WT-Mäuse mit einem höheren Blutzuckerspiegel von  $172,8 \pm 4,68$  mg/dl als die KO-Mäuse mit  $155,7 \pm 7,35$  mg/dl ( $p < 0,05$  Mann Whitney Test). Zunächst stieg der Blutzucker beider Gruppen in der ersten Stunde leicht an und fiel dann unter den Ausgangswert beider Gruppen. Die weiteren Verlaufsblutzuckerwerte beider Gruppen zeigten keine großen Unterschiede auf.

Unter der Gabe von Insulin fiel der Blutzucker der WT-Mäuse in den ersten 30 min von  $173,9 \pm 6,83$  mg/dl auf  $90,4 \pm 6,63$  mg/dl. In dieser ersten halben Stunde fielen die Blutzuckerwerte der WT-Mäuse stärker als die der KO-Mäuse, dieser fiel durchschnittlich von  $189 \pm 7,47$  mg/dl auf  $156,3 \pm 7,22$  mg/dl ( $p < 0,05$  unpaired t-Test). Im Verlauf der nächsten 30 Minuten (Messpunkt 60 Min.) und 60 Minuten (Messpunkt 120 Min.) blieben die durchschnittlichen Blutzuckerwerte der WT-Mäuse signifikant unter denen, der KO-Mäuse ( $p < 0,05$  unpaired t-Test). Die Kurve der KO-Mäuse verlief wesentlich flacher als die der WT-Mäuse.

Die Fläche unter der Kurve nach NaCl- Injektion der WT-Mäuse war signifikant größer als die AUC nach Insulingabe ( $p < 0,05$  Sidak`s multiple comparasions test). Außerdem war die AUC der WT-Mäuse nach Insulin- Injektion wesentlich kleiner als die AUC ihrer Vergleichsgruppe nach Insulin- Injektion ( $p < 0,05$  Sidak`s multiple comparasions test).

### 3.2.2 Blutzuckerabfall nach Zeit und nach injizierter Insulinmenge

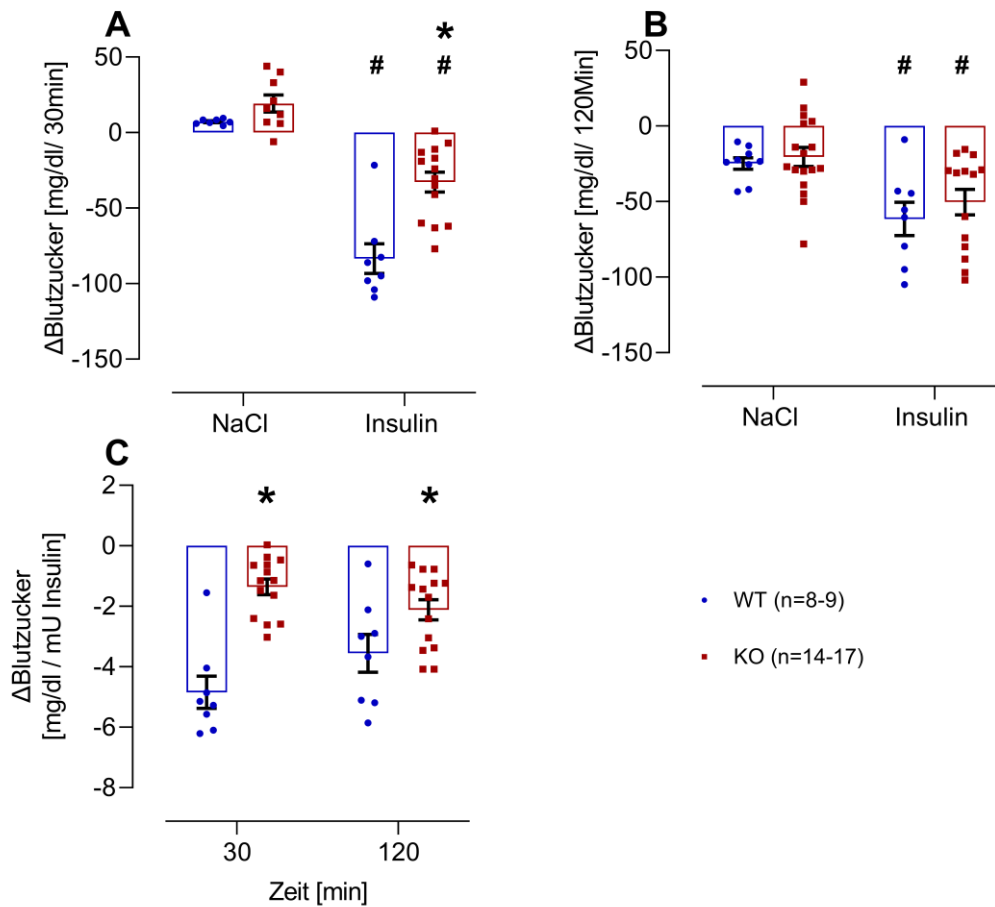


Abbildung 15: Insulinwirkung auf den Blutzucker

A zeigt den Blutzuckerabfall der WT-Mäuse (blau) und der KO-Mäuse (rot) innerhalb der ersten 30 Minuten nach intraperitonealer NaCl-Injektion (links) und Insulin-Injektion rechts. Der absolute Blutzuckerabfall während des gesamten Versuchsablaufs von 120 Minuten wird in B dargestellt. Der pro injizierte mU Insulin abfallende Blutzuckerwert ist in C ablesbar.

\*: sign. Unterschied WT-Mäuse vs. KO-Mäuse ( $p < 0,05$ ); #: sign. Unterschied nach intraperitonealer NaCl-Injektion vs. nach intraperitonealer Insulin-Injektion.

In beiden Gruppen fiel der Blutzucker nach 30 Minuten unter Insulingabe im Vergleich zur NaCl-Gabe (WT:  $p < 0,05$  Mann Whitney Test; KO:  $p < 0,005$  unpaired t-Test). Unter der Gabe von Insulin fiel der Blutzucker der WT-Mäuse innerhalb der ersten halben Stunde um  $83,5 \pm 9,8$  mg/dl und somit signifikant



stärker als der, der KO-Mäusen mit einem Abfall von  $32,7 \pm 6,5$  mg/dl ( $p < 0,05$  Mann Whitney Test).

Der Blutzucker der WT-Mäuse fiel und der der Gabe von NaCl nach 120 Minuten durchschnittlich um  $24,8 \pm 3,8$  mg/dl, während er unter der Gabe von Insulin nach 120 Minuten einen signifikant größeren Abfall um  $61,5 \pm 10,9$  mg/dl zeigte ( $p < 0,05$  unpaired t-Test). Unter der Gabe von NaCl fiel der BZ der KO-Tiere nach 120 Minuten durchschnittlich um  $20,5 \pm 6,3$  mg/dl, während unter der Gabe von Insulin ein signifikant größerer Abfall um  $50,4 \pm 8,5$  zu verzeichnen war ( $p < 0,05$  Mann Whitney Test). Der signifikante Blutzuckerabfall nach Insulingabe der WT-Mäuse im Vergleich zu den KO-Mäusen, welcher sich in den 30 Minuten zeigte, war nach 120 Minuten nicht mehr sichtbar. Demnach zeigte sich die Insulinwirkung nach 30 Minuten deutlicher als nach 120 Minuten

Eine injizierte mU Insulin bewirkte in den WT-Mäusen sowohl nach 30 Minuten als auch nach 120 Minuten einen stärkeren Abfall des Blutzuckers im Vergleich zu den KO-Mäusen (30 Minuten:  $p < 0,05$  Mann Whitney Test; 120 Minuten:  $p < 0,05$  unpaired T-Test). Im Umkehrschluss brauchten die KO-Mäuse mehr mU Insulin, um denselben Abfall im Blutzuckerspiegel zu erzielen wie ihre Vergleichsgruppe.

### 3.2.3 Kreatininkonzentration, Kreatininexkretion und Urinvolumen

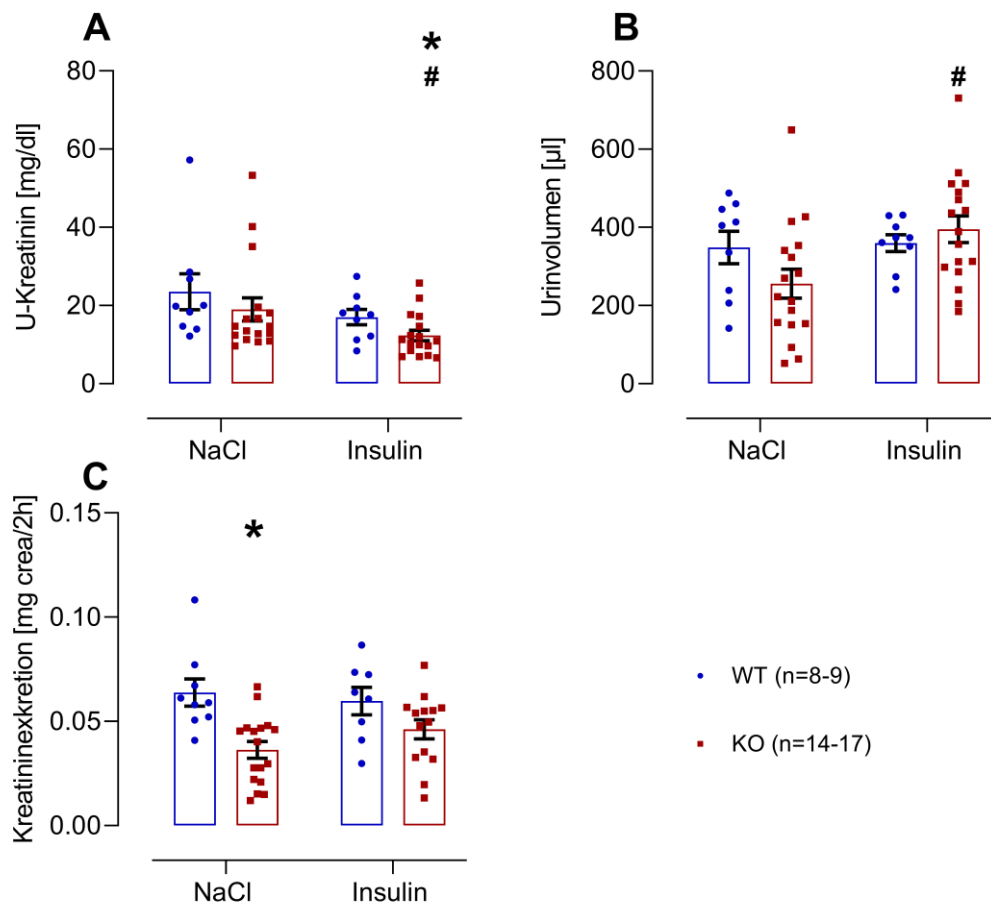


Abbildung 16: Kreatininkonzentration, Kreatininexkretion und Urinvolumen

Dargestellt in A ist die Urin-Kreatininkonzentration der WT-Mäuse (blau; n=8-9) und KO-Mäuse (rot; n=14-17) unter der Gabe von NaCl (links) und Insulin (rechts) als Mittelwerte  $\pm$ SEM in der Einheit mg/dl. In B abgebildet ist das absolute Urinvolumen in [ $\mu$ l] und in C die Kreatininexkretion über 2 Stunden in [mg crea/2h].

\*: sign. Unterschied WT-Mäuse vs. KO-Mäuse ( $p < 0,05$ ); #: sign. Unterschied der KO-Mäuse nach NaCl-Injektion vs. KO-Mäuse nach Insulin-Injektion ( $p < 0,05$ )

Die durchschnittliche Urin-Kreatininkonzentration der KO-Mäuse betrug nach Vehikelgabe  $19 \pm 2,95$  mg/dl und nach Insulingabe  $12,3 \pm 1,33$  mg/dl. Demnach sank die Konzentration unter der Gabe von Insulin ( $p < 0,05$ , Mann Whitney Test). Insgesamt war die Urin-Kreatininkonzentration der KO-Mäuse nach Insulin-Injektion geringer als die der WT-Mäuse ( $p < 0,05$ , Mann Whitney Test). Während die Urin-Kreatininkonzentration der KO-Mäuse unter Insulin sank,

stieg das absolute Urinvolumen der KO-Mäuse von  $0,26 \pm 0,03$  g [ $\mu$ l] nach NaCl-Injektion auf  $0,34 \pm 0,04$  g [ $\mu$ l] nach Insulin-Injektion ( $p < 0,05$ , Sidak`s multiple comparasion Test). Das über 2 Stunden kollektierte Urinvolumen wurde auf die Kreatininausscheidung normiert, damit Aussagen über die ausgeschiedene Kreatininmenge getroffen werden können. Nach NaCl-Injektion war Kreatininexkretion der WT-Mäuse über 2h ist höher als das der KO-Mäuse ( $p < 0,05$ , Sidak`s multiple comparasion Test).

### 3.3 URIN-ELEKTROLYTAUSSCHIEDUNG BEIM INTRAPERITONEALEM INSULINTOLERANZTEST

#### 3.3.1 Glucosurie beim intraperitonealem Insulintoleranztest

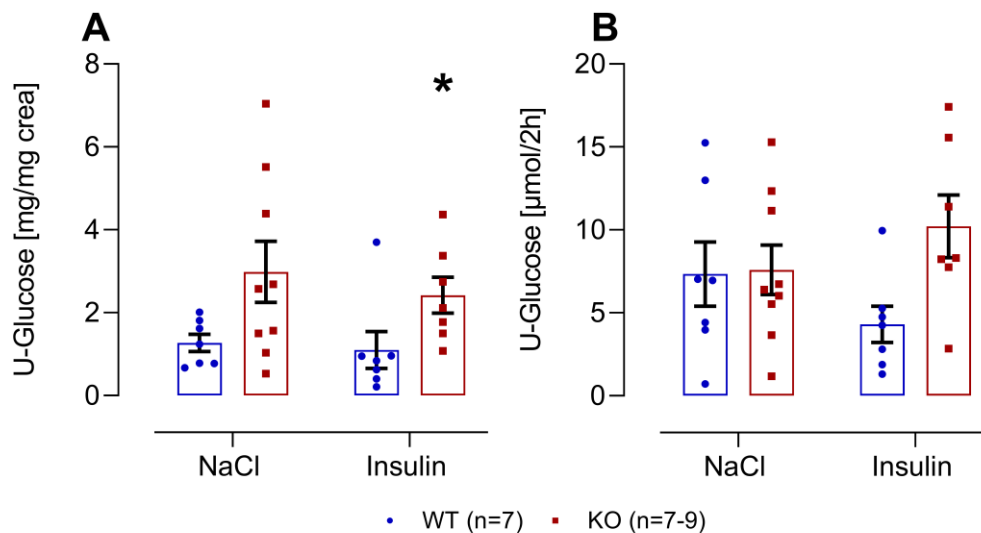


Abbildung 17: Glucoseexkretion im Urin

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$ SEM der Glucoseexkretion der WT-Mäuse  $n=7$  (blau) und der KO-Mäuse  $n=7-9$  (rot) nach NaCl- (links) und Insulin-Injektion (rechts) in der Einheit mg/ mg Kreatinin (A) und in der Einheit  $\mu$ mol/ 2h (B).

\*:  $p < 0,05$ , Urin-Glucose der WT-Mäuse vs. der KO-Mäuse unter Insulin Injektion

Die photometrisch bestimmte Glucosekonzentration im Urin wurde auf das Kreatinin und auf das Urinvolumen normiert dargestellt. Nach Insulingabe verloren die WT-Mäuse weniger Glucose über Urin als die KO-Mäuse:  $1 \pm 0,2$  mg/ mg crea vs.  $2,9 \pm 0,74$  mg/ mg crea ( $p < 0,05$ , Mann Whitney Test).

### 3.3.2 Natriurese beim intraperitonealem Insulintoleranztest

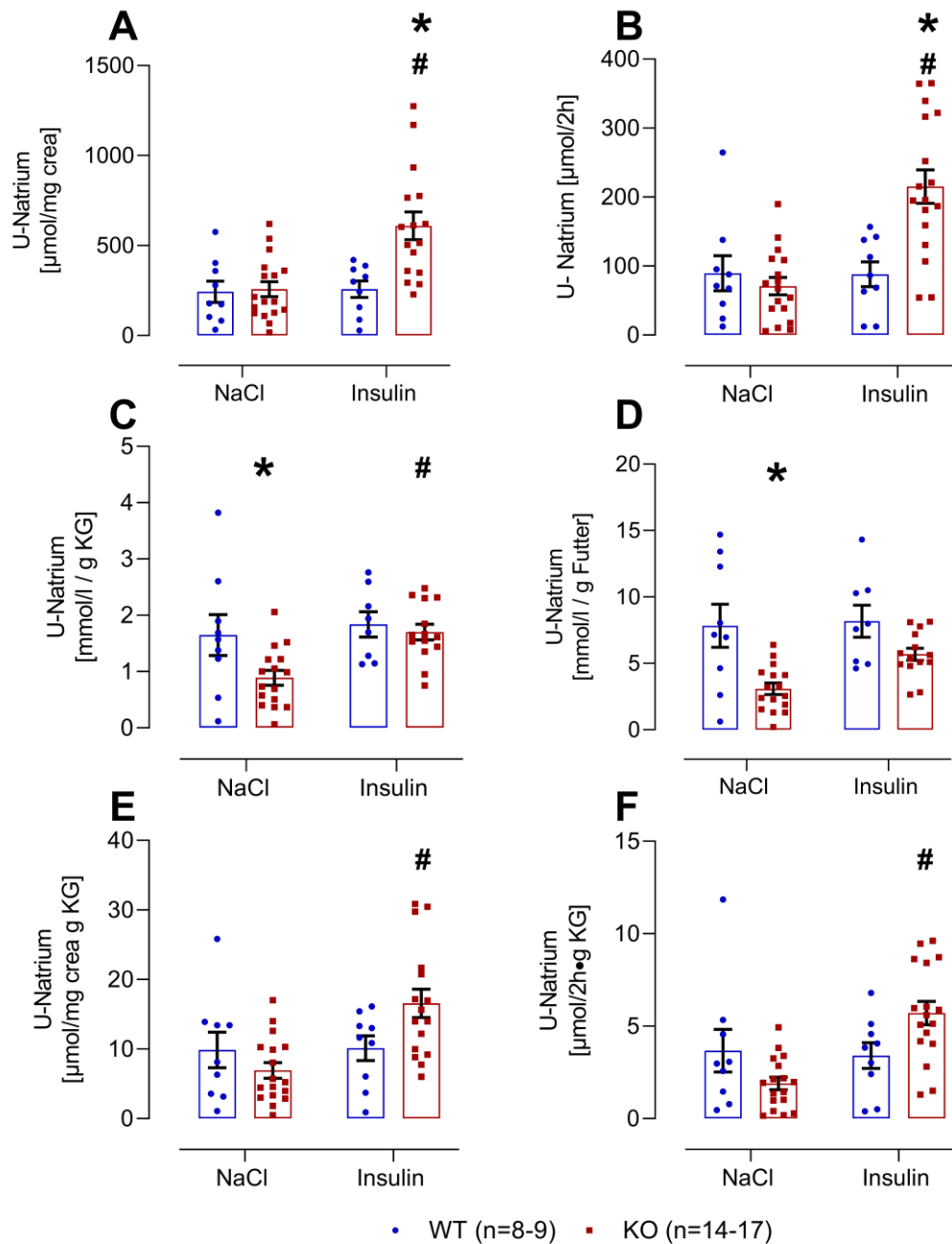


Abbildung 18: Natriumexkretion im Urin

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$ SEM der Natriumexkretion der WT-Mäuse n=8-9 (blau) und der KO-Mäuse n=14-17 (rot) über 2 h unter der Gabe von NaCl (links) und Insulin (rechts) in [ $\mu\text{mol}/\text{mg crea}$ ] (A), [ $\mu\text{mol}/ 2 \text{ h}$ ] (B), [ $\text{mmol}/\text{l} / \text{g KG}$ ] (C), [ $\text{mmol}/\text{l} / \text{g Futter}$ ] (D), [ $\mu\text{mol}/\text{mg crea g KG}$ ] (E) und [ $\mu\text{mol}/ 2 \text{ h} \cdot \text{g KG}$ ] (F).

\*: sign. Unterschied WT-Mäuse vs. der KO-Mäuse; #: sign. Unterschied der KO-Mäuse nach intraperitonealer NaCl-Injektion vs. nach intraperitonealer Insulin-Injektion

Die Natriumexkretion der KO-Mäuse nach Insulin-Injektion war im Vergleich zur NaCl-Injektion sowohl normiert auf die ausgeschiedene Kreatininmenge (A) als auch normiert auf die absolute Urinausscheidung (B) doppelt so hoch wie unter der NaCl-Injektion (#,  $p < 0,05$ , Sidak's multiple comparisons Test). Dieser Unterschied persistierte auch bei zusätzlicher Normierung auf das Körpergewicht (C) auf das Kreatinin pro g KG (E) und auf das 2-h-Urinvolumen pro g KG (F).

Außerdem verloren KO-Mäuse unter Insulingabe mit  $609,3 \pm 77,36 \mu\text{mol/mg crea}$  mehr als doppelt so viel Natrium über den Urin wie WT-Mäuse mit einem Natriumgehalt von  $258 \pm 46,13 \mu\text{mol/mg crea}$  (\*,  $p < 0,05$  Sidak's multiple comparisons Test). Diese Veränderungen waren auch in der auf das Urinvolumen normierten Darstellung in B zu finden. Hingegen war unter der Gabe von NaCl die Natriumexkretion der KO-Mäuse geringer als die der WT-Mäuse (C, D) (\*,  $p < 0,05$ , Sidak's multiple comparisons Test).

### 3.3.3 Kaliurie beim intraperitonealem Insulintoleranztest

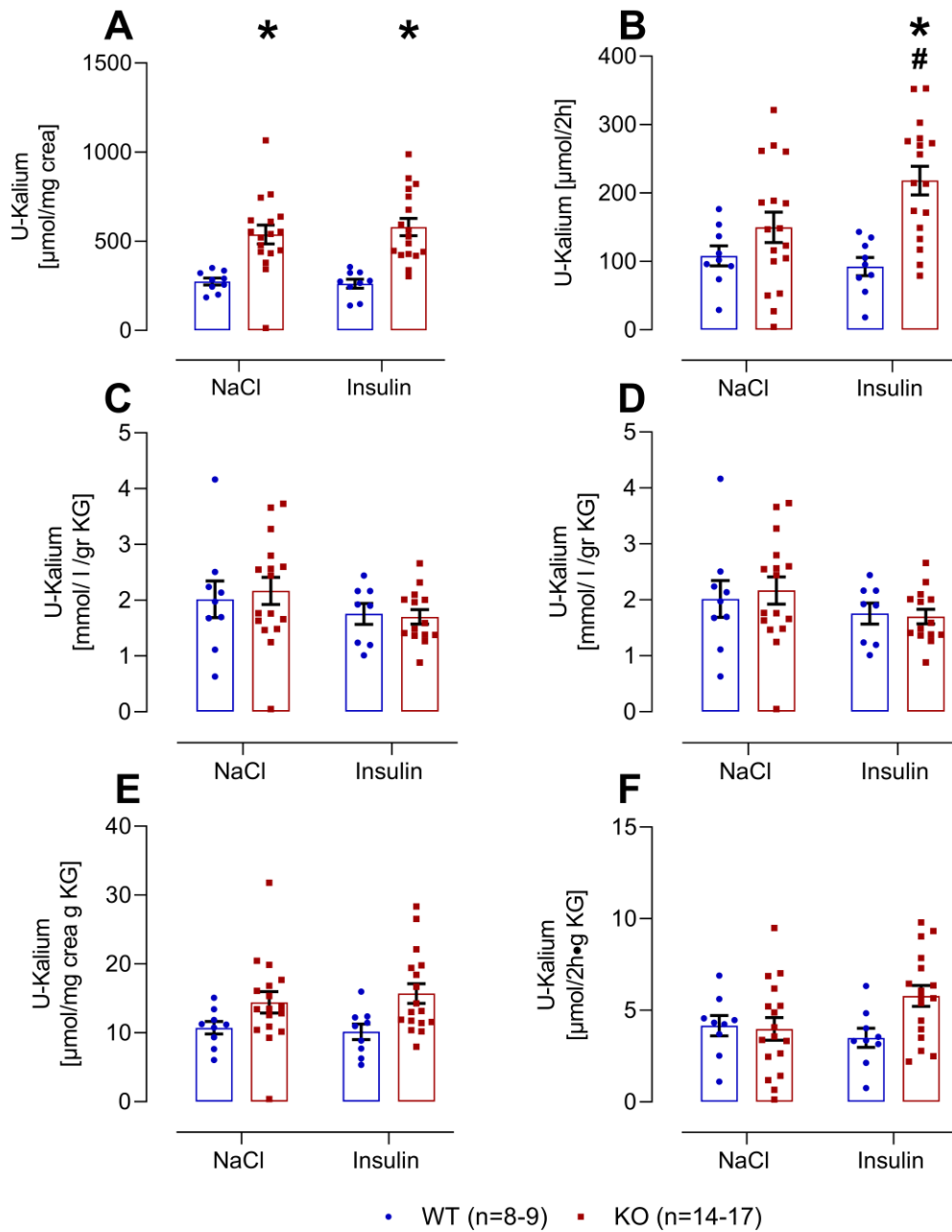


Abbildung 19: Kaliumexkretion im Urin

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$ SEM der Kaliumausscheidung im Urin der WT-Mäuse n=8-9 (blau) und der KO-Mäuse n=14-17 (rot) über 2 h unter der Gabe von NaCl (links) und Insulin (rechts) in [ $\mu\text{mol}/\text{mg crea}$ ] (A), [ $\mu\text{mol}/2\text{h}$ ] (B), [ $\text{mmol}/\text{l}/\text{g KG}$ ] (C), [ $\text{mmol}/\text{l}/\text{g KG}$ ] (D), [ $\mu\text{mol}/\text{mg crea g KG}$ ] (E) und [ $\mu\text{mol}/2\text{h} \cdot \text{g KG}$ ].

\*: sign. Unterschied WT-Mäuse vs. KO-Mäuse ( $p < 0,05$ ); #:  $p < 0,05$  Kaliumexkretion der KO-Mäuse nach intraperitonealer NaCl-Injektion vs. nach intraperitonealer Insulin-Injektion

Die Kaliumexkretion der KO-Mäuse im Urin war im Vergleich zu den WT-Mäusen unter NaCl- als auch unter Insulingabe höher. Sie verloren nahezu doppelt so viel Kalium über den Urin wie die WT-Mäuse ( $274,4 \pm 19,24 \mu\text{mol/mg crea}$  vs.  $538 \pm 53 \mu\text{mol/mg crea}$  nach NaCl-Injektion und  $261,7 \pm 25,07 \mu\text{mol/mg crea}$  vs.  $579,7 \pm 48,6 \mu\text{mol/mg crea}$  nach Insulin-Injektion) ( $p < 0,05$ , Sidak's multiple comparisons Test). Diese signifikant höhere Ausscheidung von Kalium über den Urin zeigte sich sowohl in der auf die ausgeschiedene Kreatininmenge normierten Darstellung (A), als auch in der absoluten Urinausscheidung, hier allerdings nur nach Insulin-Injektion (B) ( $p < 0,05$ , Sidak's multiple comparisons Test).

Außerdem stieg die Kaliumexkretion der KO-Mäuse unter Insulin-Injektion von  $149,8 \pm 22,23 \mu\text{mol/ 2 h}$  nach NaCl-Injektion auf  $218 \pm 20,85 \mu\text{mol/ 2 h}$  ( $p < 0,05$ , Sidak's multiple comparisons Test).

### 3.3.4 U-Natrium zu U-Kalium-Quotient beim intraperitonealem Insulintoleranztest

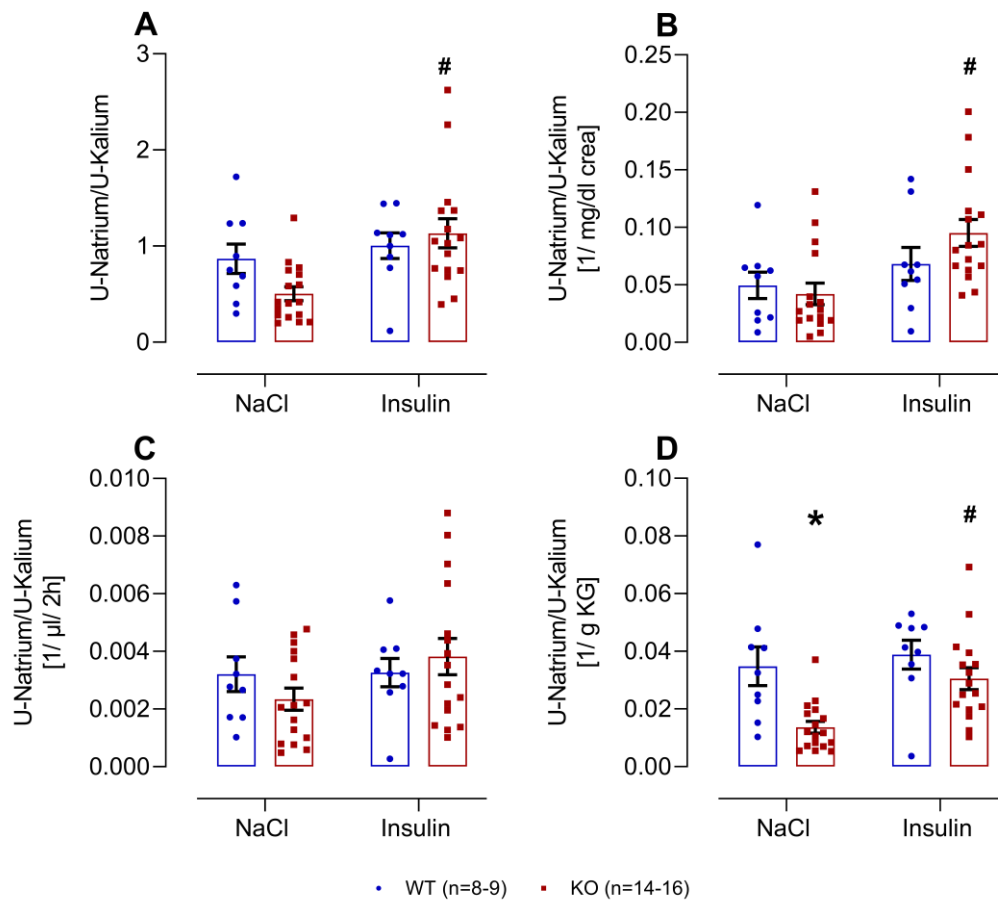


Abbildung 20: Urin-Natrium zu Urin-Kalium-Ratio

Dargestellt ist die Urin-Natriumkonzentration im Verhältnis zur Urin-Kaliumkonzentration der WT-Mäuse (blau; n=8-9) und KO-Mäuse (rot; n=14-16) unter der Gabe von NaCl (links) und Insulin (rechts) als Mittelwerte  $\pm$ SEM in A und in den Einheiten [1/ mg/dl crea] (B), [1/ µl/ 2 h] (C), [1/ g KG] (D).

\*: sign. Unterschied WT-Mäuse vs. KO-Mäuse ( $p < 0,05$ ); #: sign. Unterschied der KO-Mäuse nach NaCl-Injektion vs. KO-Mäuse nach Insulin-Injektion ( $p < 0,05$ )

Der Quotient von Urin-Natrium und Urin-Kalium der KO-Mäuse stieg unter Insulin-Injektion in A und sowohl in der auf die ausgeschiedene Kreatininmenge normierten Darstellung (B), als auch bezogen auf das Körpergewicht (D) (#,  $p < 0,05$ , Mann Whitney Test). Außerdem war die Natrium-Kalium-Ratio der KO-Mäuse im Urin im Vergleich zu den WT-Mäusen nach NaCl-Injektion geringer (\*,  $p < 0,05$ , Mann Whitney Test).



### 3.3.5 Calciurie beim intraperitonealem Insulintoleranztest

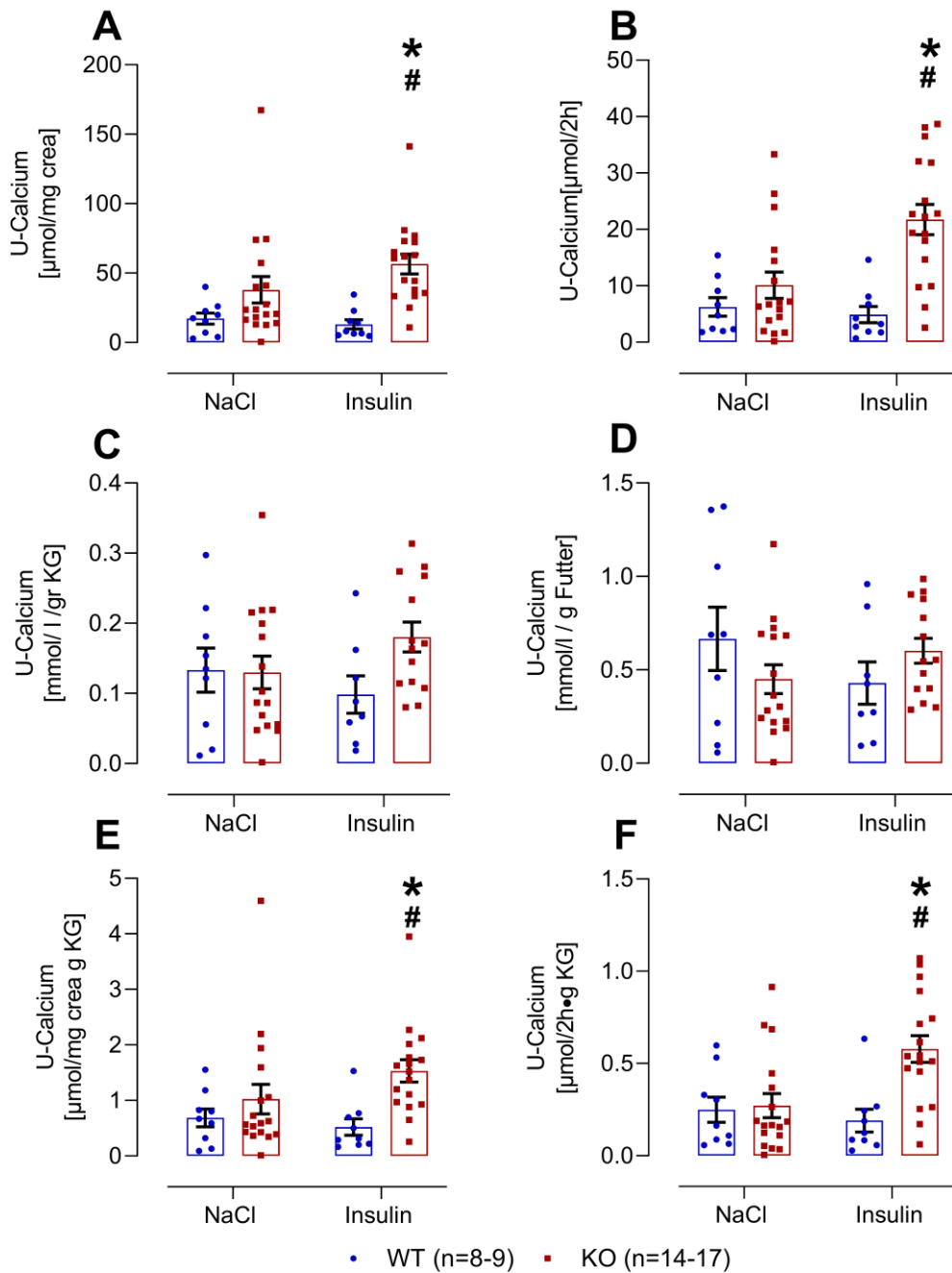


Abbildung 21: Calciumexkretion im Urin

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$ SEM der Calciumexkretion der WT-Mäuse n=8-9 (blau) und der KO-Mäuse n=14-17 (rot) über 2 h unter der Gabe von NaCl (links) und Insulin (rechts) in [ $\mu\text{mol}/\text{mg crea}$ ] (A), [ $\mu\text{mol}/ 2 \text{ h}$ ] (B), [ $\text{mmol}/\text{l} / \text{g KG}$ ] (C), [ $\text{mmol}/\text{l} / \text{g Futter}$ ] (D), [ $\mu\text{mol}/\text{mg crea g KG}$ ] (E) und [ $\mu\text{mol}/ 2 \text{ h} \cdot \text{g KG}$ ] .

\*: sign. Unterschied WT-Mäuse vs. KO-Mäuse ( $p < 0,05$ ); #:  $p < 0,05$  Calciumexkretion der KO-Mäuse nach intraperitonealer NaCl-Injektion vs. nach intraperitonealer Insulin-Injektion

Die Calciumexkretion der KO-Mäuse stieg nach der Insulin-Injektion im Vergleich zur NaCl-Injektion um  $18,6 \mu\text{mol}/\text{mg}$  crea nämlich von  $37,9 \pm 9,58 \mu\text{mol}/\text{mg}$  crea auf  $56,5 \pm 7,19 \mu\text{mol}/\text{mg}$  crea. Diese Beobachtung wird in B bestätigt: Hier stieg die Calciumkonzentration im 2-Stunden-Sammelurin nach Insulin-Injektion auf das Doppelte: von  $10,1 \pm 2,34 \mu\text{mol}/2 \text{ h}$  auf  $21,7 \pm 2,69 \mu\text{mol}/2 \text{ h}$ . Diese Ergebnisse persistierten auch in der auf das Kreatinin pro g KG und Urinvolumen pro g KG normierten Darstellungen in E und F (#, °:  $p < 0,05$  Mann Whitney Test).

Insgesamt betrug die Calciumausscheidung der KO-Mäuse unter Insulingabe mit  $56,5 \pm 7,19 \mu\text{mol}/\text{mg}$  crea vs.  $13,1 \pm 3,35 \text{ mg}$  crea mehr als das Dreifache (A), mit  $21,4 \pm 2,67 \mu\text{mol}/2 \text{ h}$  vs.  $4,88 \pm 1,45 \mu\text{mol}/2 \text{ h}$  sogar das Vierfache in (B), mit  $1,53 \pm 0,2 \mu\text{mol}/\text{mg}$  crea g KG vs.  $0,52 \pm 0,15 \mu\text{mol}/\text{mg}$  crea g KG (E) und mit  $0,59 \pm 0,07 \mu\text{mol}/2 \text{ h}^* \text{ g}$  KG vs.  $0,19 \pm 0,06 \mu\text{mol}/2 \text{ h}^* \text{ g}$  KG das Dreifache (F) des Calciumgehalt im Urin der WT-Mäuse (\*, §:  $p < 0,05$  Mann Whitney Test).

### 3.3.6 Phosphaturie beim intraperitonealem Insulintoleranztest

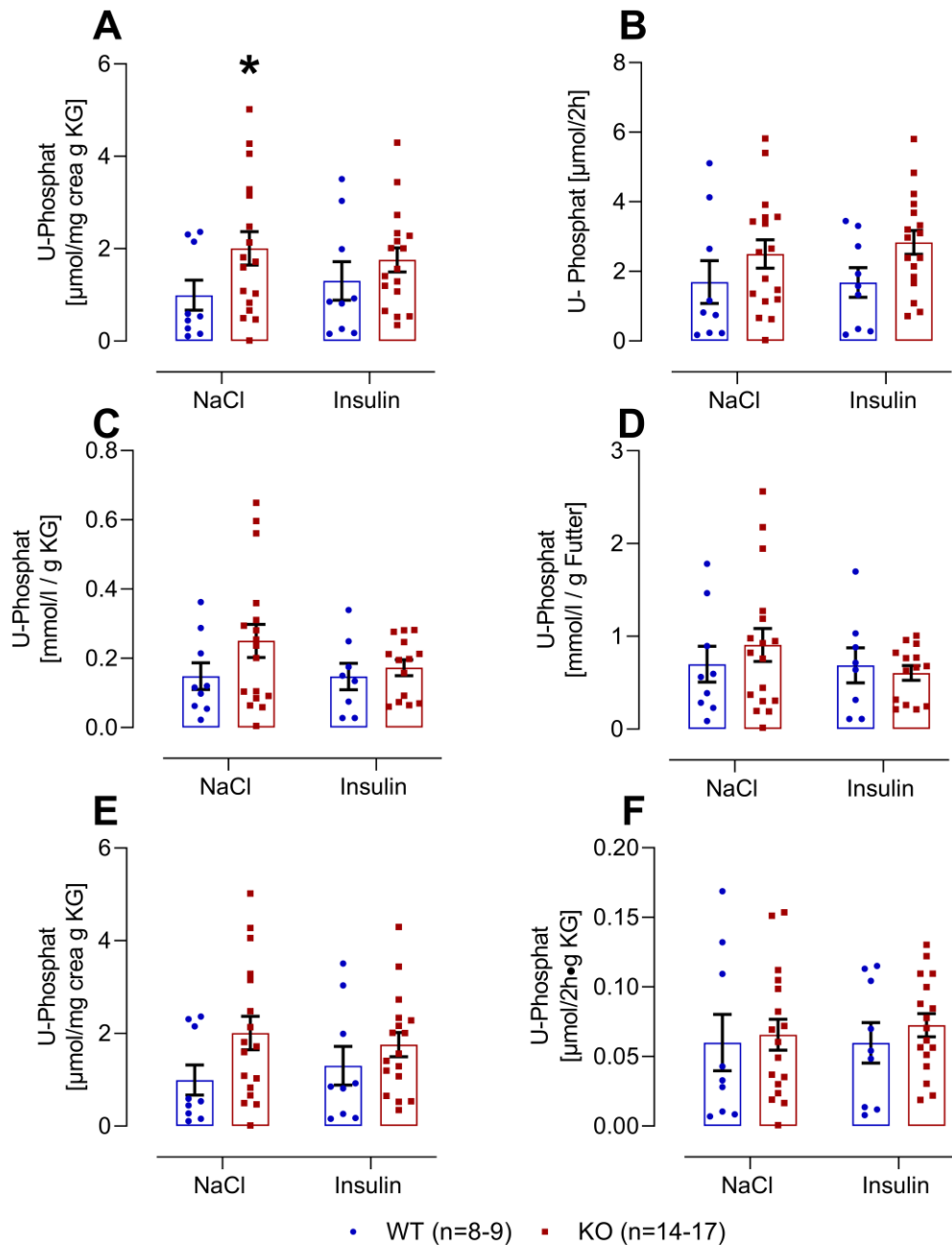


Abbildung 22: Phosphatexkretion im Urin

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$ SEM der Phosphatausscheidung der WT-Mäuse (rot) und der KO-Mäuse über 2 h unter der Gabe von NaCl (links) und Insulin (rechts) in [ $\mu\text{mol}/\text{mg crea}$ ] (A), [ $\mu\text{mol}/2\text{ h}$ ] (B), [ $\text{mmol}/\text{l} / \text{g KG}$ ] (C), [ $\text{mmol}/\text{l} / \text{g Futter}$ ] (D), [ $\mu\text{mol}/\text{mg crea g KG}$ ] (E) und [ $\mu\text{mol}/2\text{ h} \cdot \text{g KG}$ ].

\*:  $p < 0,05$ , Phosphatexkretion der WT-Mäuse vs. der KO-Mäuse nach intraperitonealer NaCl- Injektion.

KO-Mäuse verloren unter der Gabe von NaCl mehr Phosphat über den Urin als ihre Vergleichsgruppe:  $76,17 \pm 13,57 \mu\text{mol/mg crea}$  vs.  $27,39 \pm 9,3 \mu\text{mol/mg crea}$  ( $p < 0,05$ , Mann Whitney Test).

### 3.3.7 Magnesiurie beim intraperitonealem Insulintoleranztest

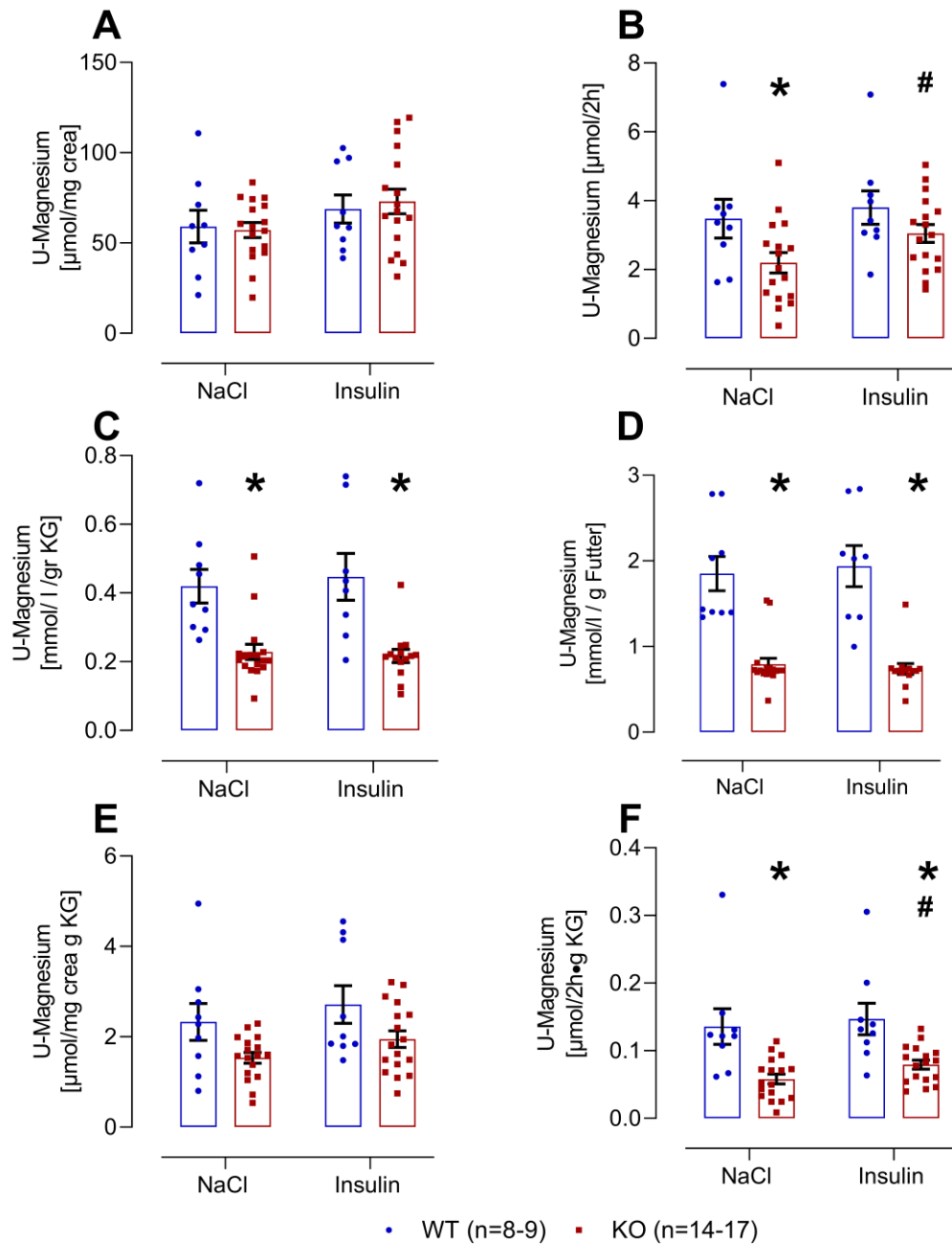


Abbildung 23: Magnesiumexkretion im Urin

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$ SEM der Magnesiumexkretion der WT-Mäuse n=8-9 (blau) und der KO-Mäuse n=14-17 (rot) über 2 h unter der Gabe von NaCl (links) und Insulin (rechts) in  $[\mu\text{mol}/\text{mg crea}]$  (A),  $[\mu\text{mol}/ 2 \text{ h}]$  (B),  $[\text{mmol}/\text{l} \text{ g KG}]$  (C),  $[\text{mmol}/\text{l} \text{ g Futter}]$  (D),  $[\mu\text{mol}/\text{mg crea g KG}]$  (E) und  $[\mu\text{mol}/ 2 \text{ h} \cdot \text{g KG}]$ .

\*:  $p < 0,05$  sign. Unterschied WT-Mäuse vs. KO-Mäuse ( $p < 0,05$ ); #:  $p < 0,05$  Magnesiumexkretion der KO-Mäuse nach intraperitonealer NaCl-Injektion vs. nach intraperitonealer Insulin- Injektion

WT-Mäuse wiesen mit Ausnahme der auf das Kreatinin und auf das Kreatinin pro g KG normierten Werte nahezu durchgehend eine höhere Magnesiumexkretion im Urin als KO-Mäuse sowohl nach NaCl- als auch nach Insulin-Injektion (\*:  $p < 0,05$  Mann Whitney Test). WT-Mäuse verloren signifikant mehr Magnesium über den Urin als KO-Mäuse.

Unter der Gabe von Insulin stieg die Magnesiumexkretion der KO-Mäuse von  $2,2 \pm 0,3 \mu\text{mol}/ 2 \text{ h}$  auf  $3,05 \pm 0,26 \mu\text{mol}/ 2 \text{ h}$  in B und von  $0,06 \pm 0,007 \mu\text{mol}/ 2 \text{ h}^* \text{ g KG}$  auf  $0,08 \pm 0,006 \mu\text{mol}/ 2 \text{ h}^* \text{ g KG}$  in F ( #:  $p < 0,05$  unpaired t-Test).

### **3.3.8 Zusammenfassung der Ergebnisse**

Nach Insulingabe fanden sich keine signifikanten Änderungen der Urinausscheidung von Natrium, Kalium, Calcium, Magnesium und Phosphat bei WT-Mäusen im Vergleich zur Vehikelgabe.

Bei den KO-Mäusen fand sich hingegen nach Insulingabe eine erhöhte absolute Urinausscheidung [ $\mu\text{mol}/ 2\text{h}$ ] von Natrium, Kalium, Calcium, Magnesium die Phosphatausscheidung veränderte sich nicht. Für Natrium und Calcium persistierte diese Änderung nach Normierungen auf die ausgeschiedene Kreatininmenge ( $\mu\text{mol}/ \text{mg crea}$ ), auf die Kreatininmenge pro Gramm Körpergewicht [ $\mu\text{mol}/\text{mg crea g KG}$ ] und auf die absolute Urinausscheidung pro Gramm Körpergewicht [ $\mu\text{mol}/ 2 \text{ h}^* \text{ g KG}$ ]. Bei Magnesium persistierte diese Änderung nach Normierung auf die absolute Urinausscheidung pro Gramm Körpergewicht [ $\mu\text{mol}/ 2 \text{ h}^* \text{ g KG}$ ].

## 4 DISKUSSION

---

Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen der Insulinresistenz auf renal-tubuläre Transportprozesse zu untersuchen. Dies geschah, indem gesunden und insulinresistenten Mäusen ein kurz wirksames Insulin injiziert wurde und daraufhin der Urin analysiert wurde.

### 4.1 TIERMODELL ZUR UNTERSUCHUNG DER INSULINRESISTENZ

#### 4.1.1 Verlauf des Mausmodells

Anhand des täglichen Wiegens des Körpergewichts, der Trinkmenge, des Futters und Blutzuckermessungen konnte der Verlauf der Krankheitsentwicklung in den Mäusen beobachtet werden.

#### Körpergewicht

Bereits kurze Zeit nach Absetzen der Tiere zeigten sich signifikante Unterschiede im Körpergewicht der beiden Gruppen. Mit steigendem Alter konnte man ein steigendes Gewicht und eine steigende Gelegenheitsblutzuckerwerte, insbesondere der KO-Tiere, verzeichnen. Das Körpergewicht der Lep<sup>ob/ob</sup>-Mäuse betrug fast das Zweifache ihrer Wildtyp-Geschwister. Andere Arbeiten bestätigen diese Ergebnisse und fanden sogar, verglichen mit den WT-Mäusen, ein dreifach erhöhtes Körpergewicht [91, 92]. Der steigende Blutzucker ist auf den Leptin-Defekt und der zugrundeliegenden übermäßigen Nahrungsaufnahme zurückzuführen. Aufgrund steigender Blutzuckerwerte kommt zu einer Hyperinsulinämie. Die Hyperinsulinämie beeinflusst das Fressverhalten positiv und ist verantwortlich für das steigende Körpergewicht. In Lep<sup>ob/ob</sup>-Mäusen finden sich bereits ab dem Alter von 14 Tagen hohe Plasmainsulinspiegel [91, 93].

#### Fress- und Trinkmenge

Das Fress- und Trinkverhalten zeigte, dass KO-Tiere, in Bezug auf ihr Körpergewicht, nicht viel mehr fressen als WT-Tiere, aber signifikant mehr trinken. Es war zu erwarten, dass mit steigendem Körpergewicht auch die Fressmenge steigt, doch die signifikant höhere Trinkmenge richtet den Blick auf

das Urinvolumen und den Blutzucker. Mit spontanen als auch Nüchtern-Blutzuckermessungen konnte gezeigt werden, dass KO-Mäuse wahrscheinlich durch die Glukosurie-bedingte Polyurie einen signifikant höheren Flüssigkeitsumsatz haben und daher mehr trinken als ihre Vergleichsgruppe. Es kommt mit steigenden Blutzuckerwerten zur Hyperfiltration und Polyurie, die sich in abnormen Durst und Trinkmenge zeigt.

#### **4.1.2 Bestimmung des Zeitpunkts und der Fastendauer für die Durchführung des Experimentes**

Da in dieser Arbeit vor allem Elektrolyte im Urin untersucht werden sollten und verfälschende Effekte einer Glukosurie ausgeschlossen werden mussten, galt es einen zu hohen Blutzucker und die daraus resultierende Glukosurie zu vermeiden.

Für die Durchführung der Experimente war ein zu hoher Blutzucker, definiert als ein Blutzucker größer 250 mg/dl, ein Ausschlusskriterium für die Studie. Daher wurden nur Tiere in diese eingeschlossen, die ein äquivalentes Alter hatten und im 6h Fasten-Versuch einen Blutzucker von unter 250 mg/dl aufwiesen.

Der Zeitraum, in dem die Mäuse 30 bis 150 Tage alt sind, wurde intensiv untersucht, um den Zeitraum herauszufinden, an dem sowohl WT-Mäuse als auch KO-Mäuse einen Blutzucker von unter 250 mg/dl haben. Nach Gelegenheitsblutzucker- und Nüchternblutzuckermessungen ließ sich der Zeitraum auf das Alter zwischen 35 und 50 Tage eingrenzen. Ließ man sie in dem Alter Übernachtfasten, reagierten die WT-Mäuse hochsensibel auf die Insulininjektion mit Hypoglykämien und Krampfanfällen. Wählte man einen früheren Zeitpunkt Alter <35 Tagen, war der Ausgangsblutzucker der WT-Mäuse selbst nach 6 h Fasten zu niedrig für eine Insulininjektion und die KO-Mäuse waren zu diesem Zeitpunkt nicht krank genug, da sie noch keine Insulinresistenz zeigten. Ab einem Alter von mehr als 50 Tagen lagen die Blutzuckerwerte der KO-Mäuse nach sechsständigem Fasten schon über 250 mg/dl. Verlängerte man die Fastenzeit der älteren Tiere auf über > 12 h, zeigte sich folgendes Phänomen: Mit steigendem Alter hatten die KO-Mäuse nach



Fasten von > 12 h einen niedrigen Ausgangsblutzuckerwert und sie reagierten sensibel auf die Insulininjektion.

Der Zeitraum, in dem sowohl die WT-Mäuse die Insulininjektion tolerieren als auch die KO-Mäuse insulinresistent genug, aber noch keinen Blutzucker über 250 mg/dl aufwiesen, ist demnach das Alter von 35 – 50 Tagen. In der untersuchten Kohorte im Alter von 35 - 50 Tage sieht man zum einen keine signifikanten Unterschiede im Blutzucker der beiden Gruppen und zum anderen zeigen KO-Mäuse hier eine Insulinresistenz, wohingegen WT-Mäuse stabil genug sind, um ihnen Insulin zu injizieren.

Nachdem der Alterszeitraum festgelegt wurde, wurde untersucht, wie lange die Tiere fasten sollen. Ließ man sie in > 12 h Fasten, war der Ausgangsblutzucker der WT-Mäuse zu niedrig und sie reagierten auf die Insulininjektion hochsensibel mit Hypoglykämien und Krampfanfällen.

Die Fastendauer wurde auf 6 h festgelegt, da diese Zeit ausreichte, um den Blutzucker der KO-Tiere unter 250 mg/dl zu reduzieren aber auch den Blutzucker der WT-Tiere nicht zu stark zu senken.

#### **4.1.3 Tiermodelle im Vergleich und die Parallelen zum Menschen**

Da die Insulinresistenz als komplexe Erkrankung den gesamten Organismus betrifft, werden seit einigen Jahren Mausmodelle zur Diabetesforschung genutzt. Hier unterscheidet man nach ihrer Ätiologie zwei Gruppen: Mäuse mit genetisch- und Mäuse mit einem durch eine fettreiche Ernährung-induziertem Typ 2-Diabetes mellitus. Linien, die für das Modell der diet-induced obesity (DIO) verwendet werden sind vor allem die AKR/J-, die DBA/2J- und die C57BL/6J-Mauslinien, während letztere am häufigsten verwendet wird [94].

Bei den genetisch veränderten Mäusen und Ratten unterscheidet man die Leptin-defizienten Lep<sup>ob/ob</sup>-Mäuse von den Tieren, die einen Leptin-Rezeptor-Defekt aufweisen. Zu den Mäusen mit einem Leptin-Rezeptor-Defekt zählen: Lep<sup>db/db</sup>-Mäuse, Zucker fatty rats, Zucker diabetic fatty rats (ZDF-Ratten), spontane hypertensive/NIH corpulent rats (SHR/N-cp-Ratten) und CP-Gen-

mutierte korpulente Ratten (JCR:LA-cp-Ratten) [91]. Diese werden häufig für pharmazeutische Experimente genutzt [91].

Seit der Entdeckung des Leptin-defizienten Mausmodells in 1949 [76, 77], werden die Lep<sup>ob/ob</sup>-Mäuse und ihre Wildtypen für Untersuchungen der Ursachen der Insulinresistenz und ihrer Folgen genutzt. Leptin-defiziente Mäuse und Mäuse mit Leptin-Rezeptor-Defekt entwickeln eine Hyperphagie mit Adipositas, Dyslipidämie, Hyperglykämie und Hyperinsulinämie [91]. Die Leptin-Rezeptor-defizienten Lepr<sup>db/db</sup>-Mäuse entwickeln im Vergleich zu den Lep<sup>ob/ob</sup>-Mäusen zusätzlich eine Pankreasbetazelldestruktion und eine schwerwiegende diabetische Nephropathie [91]. Die diabetische Nephropathie der Leptin-defizienten Mäuse verläuft im Vergleich zu den Leptin-Rezeptor-defizienten Lepr<sup>db/db</sup>-Mäusen milder [91].

Zucker fatty rats und Zucker diabetic fatty rats (ZDF) entwickeln ebenfalls eine Insulinresistenz und Dyslipidämie [91]. Während nur die männlichen Zucker fatty rats erhöhte Blutzuckerwerte aufzeigen, sind die ZDF Ratten aufgrund einer Pankreasinsuffizienz hyperglykämisch [91].

Spontan hypertensive/NIH corpulent (SHR/N-cp)-Ratten und JCR:LA-cp Ratten sind zwei weitere Tiermodelle, die für die Diabetesforschung eingesetzt werden. Sie zeigten nach dem Fasten jedoch keine erhöhten Blutzuckerwerte und gerieten deshalb immer mehr in den Hintergrund [91].

### **BTBR Lep<sup>ob/ob</sup> Maus und der Mensch: Gemeinsamkeiten und Unterschiede**

BTBR-Mäuse sind von Natur aus insulinresistent und zeigen Hyperinsulinämien auf [84, 95]. Der zusätzliche Leptin-Defekt der BTBR Lep<sup>ob/ob</sup>-Mäuse führt zur Hyperphagie und zur raschen Gewichtszunahme [76]. Die daraufhin folgenden Pathologien, wie eine chronische Hyperglykämie, Adipositas und Dyslipidämie, sind gut mit der Insulinresistenz in Typ 2-Diabetes mellitus-Patienten vergleichbar [76].

Während die Mausmodelle den Diabetes mellitus nur auf einen Gendefekt, dem pathologischen Leptin-Signaling, reduzieren, ist die Erkrankung genetisch und pathophysiologisch erheblich komplexer. Im menschlichen Diabetes spielt

Leptin eine eher untergeordnete Rolle. In einem idealen Tiermodell zur Untersuchung der Insulinresistenz wären der Typ 2-Diabetes mellitus und die Insulinresistenz nicht nur auf einen Gendefekt, sondern vielmehr auf viele unterschiedliche Gendefekte zurückzuführen. Es wurden bereits mehrere mutierte Genloci in Menschen mit Typ 2-Diabetes mellitus entdeckt. Der Typ 2-Diabetes mellitus ist ein Mosaik aus multiplen Pathologien basierend auf gestörter Insulin- und Glukagonsekretion und -wirkung.

Beim menschlichen Diabetes mellitus geht die Insulinresistenz dem Auftreten der ersten Symptome Monate bis zu Jahre voraus und entwickelt sich meist nicht so schnell wie im Tiermodell. Menschen mit Diabetes mellitus weisen beispielsweise nicht so rasch eine Hyperglykämie wie die KO-Mäuse auf, allerdings ist darauf zu verweisen, dass sich Krankheiten in Tiermodellen häufig schneller entwickeln und eine höhere Progredienz zeigen.

Zusätzlich spielen bei der Diabetesentstehung und dem Krankheitsverlauf viele verschiedene Faktoren eine Rolle. Die Insulinresistenz wird im Menschen nicht nur durch die übermäßige Nahrungszufuhr wie in diesem Mausmodell, sondern auch durch Bewegungsmangel, Inflammation und Adipositas negativ beeinflusst. Vervollständigt würde ein ideales Tiermodell mit einer in Folge auftretender Hyperlipidämie, Adipositas, hoher proinflammatorischer Zytokinlevel und oxidativem Stress. Die meisten dieser Charakteristika finden sich in der BTBR Lep<sup>ob/ob</sup>-Maus. Bei der Maus geschieht dies rasch und nahezu gleichzeitig, während die unterschiedlichen Pathologien beim Menschen zeitlich versetzt und nur bei starker Ausprägung der Erkrankung parallel verlaufen.

Die Hyperglykämien und die Pathologien an der Niere, wie beispielsweise die diabetische Nephropathie, ist in der BTBR Lep<sup>ob/ob</sup>-Maus, verglichen mit den anderen diabetischen Mausmodellen, weniger stark ausgeprägt [91]. Da in dieser Arbeit insbesondere das Tubulussystem untersucht werden sollte, war es wichtig, extreme Hyperglykämien und stark fortgeschrittene Nephropathien zu verhindern, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Dies konnte mit den Leptin-defizienten Mäusen, im Gegensatz zu den anderen Leptin-defizienten und Leptin-Rezeptor-defizienten Mäusen und Ratten sichergestellt werden.

Trotz einiger weniger Unterschiede ähnelt die Krankheitsarchitektur in den BTBR Lep<sup>ob/ob</sup>-Mäuse stark den im menschlichen Körper ablaufenden Mechanismen, weshalb die BTBR Lep<sup>ob/ob</sup>-Mäuse für die Untersuchung der Insulinresistenz gut geeignet sind. Somit gehört das in dieser Arbeit verwendete Mausmodell zu einer Stärke dieser Studie.

#### **4.2 AUSWIRKUNGEN DER INSULINRESISTENZ AUF DEN BLUTZUCKER**

Zum Vergleich der Elektrolytausscheidung im Urin wurde der Ansatz intraperitonealen Injektion von NaCl und Insulin gewählt, sodass die Werte im Verlauf verglichen werden konnten. Essenziell war es hierbei, die Insulinresistenz der KO-Mäuse mit einem intraperitonealen Insulin-Toleranz-Test zu überprüfen.

Die Blutzuckerwerte beider Gruppen stiegen in der ersten Stunde nach der NaCl-Injektion leicht an und fielen dann unter den Ausgangsblutzuckerwert. Dies ist damit zu erklären, dass die Tiere durch die intraperitoneale Injektion eine Stressreaktion zeigten, welche verbunden mit einer erhöhten Cortisolausschüttung zu einer Mobilisation von Glucose aus den Speichern in die Blutbahn führten. Der Abfall im Verlauf ist auf das Fasten der Tiere während des Versuches zurückzuführen. Die Blutzuckerwerte beider Gruppen vor der Insulininjektion unterschieden sich nicht. Die WT-Mäuse reagierten auf die Injektion mit einem stärkeren Blutzuckerabfall als die KO-Mäuse und der Blutzucker fiel in der ersten halben Stunde und Stunde deutlich. Die AUC der WT-Mäuse ist signifikant kleiner als die der KO-Mäuse. Die KO-Mäuse zeigten auch nach der Kontrollinjektion mit NaCl einen Blutzuckerabfall äquivalent zum Abfall nach Insulininjektion. Dies weist daraufhin, dass Insulin in den KO-Mäusen nicht denselben Blutzuckermanipulierenden Effekt hat wie in den WK-Kontrollmäusen. Somit wurde gezeigt, dass die KO-Mäuse zu dem Zeitpunkt des Versuches insulinresistent sind. Aus diesem Grund war die Bedingung für die Untersuchung der Auswirkungen der Insulinresistenz an der Niere gegeben. Ganz im Sinne der Insulinresistenz zeigte sich, dass die KO-Mäuse pro injizierte mU Insulin einen signifikant geringeren Blutzuckerabfall als WT-Mäuse verzeichneten.

### **4.3 AUSWIRKUNGEN DER INSULINRESISTENZ AUF TRANSPORTPROZESSE**

#### **4.3.1 Effekte einer akuten Insulingabe auf Transportprozesse im proximalen Tubulus gesunder und insulinresistenter Mäuse**

##### **Glucose**

Die ausgeschiedene Glucosemenge war zwischen den jeweiligen Genotypen und verschiedenen Behandlungen, bis auf eine nach Insulingabe verminderte Glucoseexkretion der WT-Mäuse, vergleichbar, so dass davon ausgegangen werden kann, dass es nicht zu verfälschenden Effekten durch eine Glucosurie gekommen ist. Insulin fördert bekanntlich den Glucose-Transport über SGLT1 und SGLT2. Dieser Wirkung konnte nicht beobachtet werden.

##### **Natrium**

Die Natriumexkretion der WT-Mäuse änderte sich unter der Insulingabe nicht. Demnach beeinflusst Insulin den tubulären Transport von Natrium in Nieren insulinempfindlicher WT-Mäuse nicht. Bei den KO-Mäusen fand sich im Vergleich zur Vehikelgabe nach Insulingabe eine erhöhte absolute Urinausscheidung von Natrium. Diese Änderungen fanden sich auch nach Normierungen auf die ausgeschiedene Kreatininmenge ( $\mu\text{mol}/\text{mg crea}$ ), auf die Kreatininmenge pro Gramm Körpergewicht [ $\mu\text{mol}/\text{mg crea g KG}$ ] und auf die absolute Urinausscheidung pro Gramm Körpergewicht [ $\mu\text{mol}/2\text{ h}^* \text{ g KG}$ ].

In verschiedenen Studien ließ sich eine vermehrte Natriumrückresorption und somit der Anti-Natriurese-Effekt von Insulin in insulinresistenten Menschen und Tieren beobachten [51, 53, 96]. In insulinresistenten Ratten [6, 97] und Mäusen [6, 75] zeigte sich eine durch Insulin-induzierte geringere Natriumausscheidung über den Urin. Eine Hyperinsulinämie müsste dementsprechend trotz Insulinresistenz die Natriumrückresorption massiv antreiben. Rocchini et al. dokumentierten genau diesen Effekt und beschrieben eine erniedrigte Natriumexkretion in übergewichtigen Typ 2-Diabetes mellitus-Patienten [6, 50]. Auch in diabetischen Hunden wurde im proximalen und distalen Tubulus vermehrt Natrium rückresorbiert, was zur erniedrigten Natriumexkretion führt [98].

Bisher ist bekannt, dass in der insulinresistenten Niere das IRS1-Signaling gehemmt wird, das IRS2-Signaling jedoch ungehemmt abläuft [39]. Der Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter arbeitet, dank des IRS2-Signalings, auch im Rahmen der Insulinresistenz in Menschen ungehemmt weiter [39]. Eine Studie mit insulinresistenten Ratten und Diabetes mellitus-Patienten mit Nephropathie unterstützt diese Aussage und konnte nachweisen, dass IRS2, welches zuständig für die Natriumrückresorption im proximalen Tubulus ist, im Rahmen der Insulinresistenz vollständig erhalten ist, während IRS1 im Cortex vermindert exprimiert wird [52, 53]. Der Insulinabhängige Natriumtransport läuft demnach, im Status der Insulinresistenz im proximalen Tubulus, ungestört ab [52, 53].

Weitere Arbeiten [28, 66, 99] fanden eine vermehrte Expression von SGK1 im proximalen und distalen Tubulus von insulinresistenten Mäusen vor [6]. SGK1 fördert die Natriumrückresorption über den NHE [29].

Demnach könnten einige Tubuluszellen, insbesondere der proximale Tubulus, in ihren Transportmechanismen nicht von der Insulinresistenz beeinflusst werden, denn trotz Insulinresistenz führen die hohen Insulinspiegel zur vermehrter Natriumrückresorption.

Um die hohen Natriumverluste, die in dieser vorliegenden Studie auftraten, zu erklären, lassen sich mehrere Hypothesen aufstellen. Eine davon ist die Hypothese, dass aufgrund der Glukosurie mehr Natrium ausgeschieden wird. Hunde mit Diabetes, welche zuvor eine Natriurese aufwiesen, wurden mit Insulin behandelt und trotz Hyperglykämie verringerte sich ihre Natriumexkretion [98]. Manhiani et al. entkräften somit die Vorstellung, dass die Hypernatriurie durch die Glucose-induzierte Osmose bedingt ist [98].

Eine weitere Erklärung könnte die fehlende insulin-induzierte Vasodilation liefern. Infolgedessen führte die Hyperinsulinämie aufgrund der Insulinresistenz nicht zur Vasodilatation und demnach kam es nicht zum Blutdruckabfall, was zur vermehrter Natriumrückresorption führen kann. Aufschlussreich wäre es, eine kontinuierliche Blutdruckmessung der KO- und WT-Mäuse durchzuführen oder auch die ADH-Level zu bestimmen, um eine mögliche Hypertonie zu diagnostizieren. Es ist nicht auszuschließen, dass sie durch den Stress der

Injektion, der Haltung in einer neuen Umgebung und der halbstündlichen bzw. stündlichen Blutzuckermessungen, hypertone waren. Eine andere Arbeit zeigte, dass Insulin-Rezeptor-defiziente Knock-out-Mäuse vermehrt Natrium sezernierten und trotzdem einen Bluthochdruck entwickelten [75]. Dies könnte auch daran liegen, dass durch die Insulinresistenz die NO-vermittelte Vasodilatation wegfällt [100].

Es besteht Grund zur Annahme, dass die Hypernatriurie durch die Injektion herbeigeführte Hypervolämie herbeigeführt wird, denn 15 µl pro Gramm Körpergewicht stellt eine Belastung für den Flüssigkeitshaushalt einer Maus dar. Dies war unvermeidbar, da die Voraussetzung für die Messungen der Elektrolyte ein bestimmtes Urinvolumen war und die Mäuse nicht genug Urin produzierten, wenn die Injektionsmenge 15 µl pro Gramm Körpergewicht unterschritt. Zusätzlich ist auch nicht zu erwarten, dass die 0,9-prozentige NaCl-Lösung den Natriumhaushalt in dieser Weise beeinträchtigt. Andere Injektionslösungen, wie zum Beispiel ein Gemisch aus Insulin und destilliertem Wasser, waren keine anderweitige Option.

### **Phosphat**

Ein Insulineffekt auf die tubuläre Ausscheidung des Phosphats ist nicht zu beobachten. Es zeigten sich keinerlei Unterschiede zwischen den Genotypen und den Behandlungen.

Frühere Arbeiten zeigen, dass Insulin die Phosphatrückresorption fördert und es im Falle der Insulinresistenz zur Phosphaturie kommt [63]. Nach der NaCl-Injektion zeigten die KO-Mäuse im Vergleich zu den WT-Mäusen eine signifikant höhere Phosphatexkretion. Allerdings blieb dieser Effekt nach Insulingabe aus. Es konnte in den Versuchsreihen keine Kausalität zwischen Insulin-Injektion und vermehrter Phosphatexkretion oder -rückresorption hergestellt werden.

Die Phosphaturie könnte auch eine Folge von der Glucosurie oder der Natriurie mit Volumenverlust sein [69]. Die Parathormonkonzentrationen im Plasma der Akt2-Knock-out-Mäuse waren niedrig, die Calcitriollevel wahrscheinlich

kompensatorisch erhöht [69]. In diesem Tiermodell war zudem die Knochendichte vermindert [69].

Der Phosphathaushalt unterliegt vielen unterschiedlichen hormonellen Regelkreisen im Körper. Es könnte sein, dass Insulin als einzelner Faktor nicht sehr stark in dieses System eingreift. In dieser Studie nicht als Messwert aufgegriffen und ausgewertet, aber aufschlussreich in diesem Zusammenhang wären die PTH-, Vitamin D-, Calcitriol- und Fibroblasten-Wachstumsfaktor 23-Level (FGF23). FGF23 ist verantwortlich für die Hemmung der Phosphatabsorption im proximalen Tubulus.

Des Weiteren stellten Jehle et. al fest, dass Vitamin D im Rahmen der Insulinresistenz eine wichtige Rolle spielt. Eine Vitamin D3 Substitution könnte positive Effekte auf die Insulinsensitivität und somit auf den Krankheitsverlauf des Typ 2-Diabetes mellitus haben [101].

Außerdem kann die selektive Insulinresistenz verantwortlich für die in dieser Arbeit ausbleibenden Hyperphosphaturie sein. In insulinresistenten Ratten waren lediglich die Glomeruli, nicht aber der Tubulus von der Insulinresistenz beeinträchtigt [6, 97]. Eine Erklärung hierfür könnte nun darin bestehen, dass Abschnitte des Tubulus zu unterschiedlichen Krankheitsstadien von der Insulinresistenz beeinflusst werden. Hierbei sind nicht nur die Abschnitte, sondern bereits die einzelnen Transporter in der Ausprägung der Insulinresistenz unterschiedlich.

#### **4.3.2 Effekte einer akuten Insulingabe auf Transportprozesse in der Henle-Schleife und im distalen Tubulus gesunder und insulinresistenter Mäuse**

##### **Magnesium**

Bei den KO-Mäusen zeigte sich nach Insulingabe eine erhöhte absolute Urinausscheidung von Magnesium, welche auch nach Normierung auf die absolute Urinausscheidung pro Gramm Körpergewicht [ $\mu\text{mol}/ 2 \text{ h} * \text{g KG}$ ] persistierte.



Eine aufgrund der Insulinresistenz erhöhte Urin-Magnesiumkonzentration wurde bereits in anderen Forschungsarbeiten beschrieben und war demnach zu erwarten. In übergewichtigen Ratten mit Diabetes wurde eine verminderte Expression des Transporters TRPM6 im distalen Tubulus entdeckt [64]. Ferner wurde eine Glukosurie und somit die osmotische Diurese als Grund für den Magnesiumverlust bei Menschen mit einem Typ 2-Diabetes mellitus diskutiert [64, 65, 102]. Eine Glukosurie wurde in dieser Arbeit ausgeschlossen. Demnach bleibt eine vermehrte Magnesiumrückresorption sehr wahrscheinlich wegen fehlender Stimulation des TRPM6 aufgrund der Insulinresistenz aus.

### **Calcium**

Es konnte gezeigt werden, dass die Calciumexkretion der KO-Mäuse unter Insulin-Injektion größer ist als die der WT-Mäuse. Die KO-Mäuse zeigten nach Insulingabe eine erhöhte absolute Urinausscheidung von Calcium. Diese Ergebnisse persistierten nach Normierungen auf die ausgeschiedene Kreatininmenge ( $\mu\text{mol}/\text{mg crea}$ ), auf die Kreatininmenge pro Gramm Körpergewicht [ $\mu\text{mol}/\text{mg crea g KG}$ ] und auf die absolute Urinausscheidung pro Gramm Körpergewicht [ $\mu\text{mol}/2\text{ h}^* \text{ g KG}$ ].

Diese Ergebnisse decken sich mit der bei Akt2-Knock-out-Mäusen [69] beobachteten Calciurie und Natriurie. Föller et al. konnten unter Verwendung von GSK3-Mäusen demonstrieren, dass die Hyperphosphaturie durch eine verminderte Parathormonausschüttung bedingt ist und dies auch der Grund für die Hypercalciurie sein könnte [63]. Parathormon und Calcitriol fördern die Calciumrückresorption über den TRPV5 im distalen Tubulus. Liborio et al. schrieben den erhöhten Calciumverlust über die Niere bei Patienten mit Akromegalie der Insulinresistenz und nicht dem Wachstumshormon zu [103]. Demnach ist der Insulineffekt auf die Zellen im distalen Tubulus aufgrund der Insulinresistenz herabgesetzt.

Calcium wird hauptsächlich über den Darm, zu ca. einem Zehntel über den Urin, aber auch über die Haut, Haare und Nägel ausgeschieden. Die über die Ernährung aufgenommene Calciummenge beeinflusst die Urin-Calciumkonzentration. Eine übermäßige Calciumzufuhr wurde durch das

standardisierte Futter vermieden und ist nicht der Grund für die erhöhte Calciumexkretion.

Ob die Calciurie durch verminderte Rückresorption aufgrund von Insulinsignaling bedingt ist, ist nicht endgültig geklärt. In dieser Versuchsreihe konnte jedoch ein Zusammenhang zwischen der Insulinresistenz und einer erhöhten Urin-Calciumkonzentration gezeigt werden. Zusätzlich sind weitere Untersuchungen, wie Parathormon- und Calcitriolkonzentrationen, im Kontext der Insulinresistenz nötig.

#### **4.3.3 Effekte einer akuten Insulingabe auf Transportprozesse im Sammelrohr gesunder und insulinresistenter Mäuse**

##### **Kalium**

Die KO-Mäusen schieden nach Insulingabe, normiert auf die absolute Urinausscheidung, vermehrt Kalium aus.

Insulin fördert über SGK1 die Kaliumausscheidung und die Aufnahme von Kalium in die Zellen. SGK1-defiziente Mäuse [28, 29, 71] konnten Kalium nicht adäquat ausscheiden oder in die Zellen aufnehmen und entwickelten eine Hyperkaliämie. Der Pathomechanismus hinter der gestörten Kaliumexkretion ist noch nicht gänzlich verstanden. Eine Erklärung hierfür könnte ein gestörtes elektrochemisches Gleichgewicht sein, wo durch eine verminderte ENaC- und Na/K/ATPase- Aktivität oder eines gestörten pHs Kalium vermindert ausgeschieden wird [28, 29, 71].

Überraschenderweise lief die Kaliumexkretion in den KO-Mäusen ungestört ab. Trotz der Insulinresistenz der KO-Mäuse, wirkte Insulin am Sammelrohr und führte eine vermehrte Kaliumexkretion herbei. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Sammelrohrzellen zumindest zu diesem Zeitpunkt nicht von der Insulinresistenz betroffen waren.

Die Hyperkaliurie wirft mit Blick auf die erhöhte Urin-Natriumkonzentration Fragen nach der Höhe des Aldosteronspiegels im Blut und die damit zusammenhängende Höhe des Blutdrucks auf. Eine erhöhte Natrium- und Kaliumexkretion war nicht zu erwarten und ist überraschend.

Ursache für die vermehrte Kaliumausscheidung kann eine Hyperkaliämie sein. Ein Hypoaldosteronismus oder eine metabolische Azidose begünstigen eine Hyperkaliämie. Durch das Fasten kann es zur leichten Azidose und somit zu einer kompensatorischen Erhöhung des Plasmakaliums kommen, was wiederum die vermehrte Ausscheidung von Kalium zur Folge hat. Darüber hinaus kann auch eine intraperitoneale Injektion Verletzung von Zellen und die massive Freisetzung von Kalium nach sich ziehen.

#### **4.4 KRITISCHE WÜRDIGUNG UND AUSBLICK**

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die akute Insulingabe den tubulären Transport der insulin sensitiven WT-Mäuse nicht beeinflusst, jedoch zur Steigerung der Urin-Natrium-, Kalium-, Calcium- und Magnesiumausscheidung der insulinresistenten KO-Mäusen führt.

In dieser Arbeit konnte durch die akute Gabe von Insulin der Effekt von Insulin am Tubulus von insulinresistenten und insulin sensitiven Mäusen untersucht werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das kurzwirksame Insulin seine Wirkung an insulin sensitiven Mäusen, im Vergleich zu insulinresistenten Tieren, stärker entfaltet. Ob das gewählte kurz wirksame Insulin eventuell zu schnell abgebaut und die Wirkung am Zielort, nämlich der Tubuluszellen, nicht entfalten konnte, bleibt unklar. Weiterhin kann für die weitere Untersuchung dieser Fragestellung eine kontinuierliche, über Tage andauernde Insulindauerinjektion hilfreich sein.

Die Insulinresistenz ist sehr individuell und komplex. Die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse weisen auf die Theorie der partiell selektiven Insulinresistenz hin: Möglicherweise sind BTBR Lep<sup>ob/ob</sup> selektiv insulinresistent und einige Transporter sind von der Insulinresistenz betroffen, während andere nicht oder noch nicht beeinträchtigt werden. Nicht jeder Transporter wäre demnach zu jedem Zeitpunkt insulinresistent und wäre eventuell auch dosisabhängig insulin sensibel oder -resistent.

Für die Ergebnisse könnte eine von der Insulinresistenz unabhängige und aufgrund des metabolischen Status der KO-Mäuse bedingte Erhöhung

bestimmter Signalproteine verantwortlich sein. Beispielsweise ist SGK1 in chronisch geschädigten Nieren stärker exprimiert als in gesunden Nieren [28, 29]. Ob dies auch andere die Signalkaskade am Tubulus beeinflussende Faktoren betrifft, ist unklar.

Die Rückresorption von Natrium, Kalium, Calcium, Magnesium und Phosphat findet an mehreren Stellen des Tubulus statt. Es ist nicht gelungen, einzelne Tubulusabschnitte komplett getrennt voneinander zu beurteilen.

#### **4.4.1 Limitationen**

##### **Methodik**

Methodische Fehler können jederzeit eine tragende Rolle spielen. Fehler in der Urinsammlung, wie beispielsweise die Verunreinigung des Urins durch den Kot, eine unvollständige Entleerung der Blase oder ungenaues Pipettieren des Urins aus den Käfigen, im Falle eines spontanen Urinabgangs, könnten Gründe für eine erhöhte Konzentration von Natrium, Kalium, Calcium und Magnesium im Urin sein. Die Wahrscheinlichkeit für diese Fehler kann man in metabolischen Käfigen minimieren, jedoch nicht komplett ausschließen. Diese Option war allerdings nicht zu jedem Zeitpunkt gegeben.

Vermutlich ist das gewählte Alter der Mäuse für die Untersuchung der tubulären Insulinresistenz ungünstig. Jedoch wurde bis zum Eintreten der diabetischen Nephropathie nicht gewartet, da man in dem Alter höhere Insulindosen injizieren müsste, um den Blutzucker unter 250 mg/dl zu senken. Diese hohen Insulindosen hätten die WT-Mäuse andererseits nicht toleriert und somit wäre die Vergleichbarkeit nicht gegeben.

Die Wahrscheinlichkeit für photometrische Messfehler ist, durch das Verwenden von Küvetten eines Herstellers, durch das saubere Verdünnen und die akkurate Durchführung der Messungen nach Anleitung, gering.

Außerdem fasteten alle Mäuse nicht genau gleich lang und wurden nicht zur exakt gleichen Zeit injiziert. Blasenentleerung und Blutzuckermessen dauerten je nach Maus ca. 30 Sekunden und bei 6 bis 8 Mäuse pro Experimenttag, führte dies dazu, dass die letzte Maus 5 Minuten länger fasten musste. Allerdings

zeigten die Nüchternblutzuckerwerte keine gravierenden Schwankungen zwischen den Tieren, die 6 Stunden und den Tieren, die 8 Stunden fasteten. Deshalb sind keine starken Schwankungen der Blutzuckerwerte durch die minimale Verzögerung von 5 Minuten zu erwarten.

### **Stichprobenumfang**

Sowohl die Tatsache, dass diese Studie eine Single-Center-Studie ist, als auch die Fallzahl sind limitierende Faktoren dieser Studie. Gleichzeitig ist letzteres auch zugleich eine Stärke dieser Studie, da bereits diese Größe des Stichprobenumfangs ausreichend für robuste, statistisch signifikante, Ergebnisse war.

### **Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen**

Weitere Experimente anderer Studien mit Insulin-Knockout-Tieren zeigten, dass hinter der Insulinresistenz ein komplexer Pathomechanismus steckt und bei der Interpretation der Ergebnisse bedacht werden muss, dass diese Tier- und Organspezifisch und nicht einfach auf den Menschen übertragbar sind [6].

#### **4.4.2 Ausblick**

##### **Therapie**

Während in dieser Versuchsreihe mit fortschreitendem Alter eine immer höhere Insulininjektion für die Senkung des Blutzuckers der KO-Mäuse erforderlich war, zeigte das Intervallfasten weitaus größere Erfolge und führte zu einer starken Senkung des Blutzuckers. Dies ist auch auf den Menschen zu übertragen. In der heutigen Zeit stößt das Intervallfasten auf positive Resonanz. Studien zeigen, dass sich Intervallfasten nicht nur positiv auf die Insulinresistenz und Diabetes mellitus auswirkt, sondern auch das kardiovaskuläre Risiko senkt [104]. In diesen Experimenten nicht genutzt, aber auch eine wirksame Methode zur Behandlung der Insulinresistenz, ist die Gewichtsreduktion. Eine kausale Beziehung zwischen Gewichtsreduktion und Insulinsensitivität ist aus anderen Studien bekannt [6, 105]. Hierbei spielen auch das viszerale Fett und die Leber eine wichtige Rolle: Patienten mit einer Fettleber und erhöhtem viszeralem Fett profitierten einer massiven Gewichtsreduktion [6, 106, 107].

Ferner zeigten die Ergebnisse der Tierexperimente einen erhöhten Verlust von Natrium, Kalium, Calcium und Magnesium. Da die orale Aufnahme von Natrium und Kalium in der Regel durch die Ernährung gedeckt ist, gilt es, einer möglichen therapeutischen Substitution von Calcium und Magnesium Aufmerksamkeit zu schenken.

Niedrige Magnesiumlevel könnten bei der Entstehung der Insulinresistenz eine Rolle spielen [64]. Eine orale Magnesiumsubstitution wirkt sich positiv auf die Insulinresistenz aus [64]. Bisher gibt es Hinweise auf eine inverse Assoziation zwischen Plasmamagnesiumlevel und der Insulinresistenz in Menschen mit einem Typ 2-Diabetes mellitus [108]. Zukünftig könnte diese in der Behandlung von Typ 2-Diabetes mellitus-Patienten, vor allem jener mit einer Hypomagnesiämie, an Bedeutung gewinnen. Noch ist nicht geklärt, inwieweit die Substitution bereits im Status der Insulinresistenz und noch vor Entstehung des Diabetes hilfreich ist.

Auch Calcium spielt im Insulinsignaling eine wichtige Rolle. In Tierexperimenten beeinflusste eine Calciumrestriktion die Entstehung der Insulinresistenz negativ [109]. Außerdem zeigte sich eine gestörte Interaktion zwischen dem Endoplasmatischen Retikulum und den Mitochondrien in insulinresistenten Tieren [110]. Ob eine Substitution von Magnesium und Calcium hilfreich ist, muss weiter untersucht werden. Hierzu sind vor allem Plasmamagnesium- und Plasmacalciumspiegel zu untersuchen.

### **Gendermedizin**

Auch wenn Menschen anatomisch ähnlich aufgebaut sind, variieren zelluläre Vorgänge wohlmöglich je nach Geschlecht und Ethnie. Die Wirkung von Hormonen ist von dem ethnischen Hintergrund der Zielzelle abhängig. Gesunde Kaukasier reagierten im Vergleich zu schwarzen Menschen sensibler auf Hormone, die den Phosphathaushalt in der Niere regulieren [111]. Fraglich bleibt, ob auch die Insulinsensitivität nicht nur vom Geschlecht, sondern auch von der genetischen Herkunft abhängig ist. Auch dies ist weiter zu untersuchen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

---

Obwohl die Niere nicht zu den klassischen Zielorganen von Insulin zählt, wird der Insulinrezeptor in fast allen Zellen einschließlich des Tubulussystems exprimiert. Die Beeinflussung tubulärer Transportvorgänge durch eine akute Insulingabe ist beschrieben. Es ist jedoch nicht klar, inwieweit diese Prozesse durch das Vorliegen einer Insulinresistenz beeinflusst werden. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der Insulinresistenz auf die tubulären Transportprozesse zu untersuchen. Hierzu wurde adipösen Leptin-defiziente BTBR-Mäuse ( $Lep^{ob/ob}$ ) im Alter von 35 bis 50 Tagen und ihren schlanken Wildtyp-Kontrollen ( $Lep^{wt/wt}$ ) Vehikel (0,9 % NaCl, 15  $\mu$ l/g KG) und im Abstand von zwei Tagen Insulin intraperitoneal (0,1 mU/g KG) verabreicht und der Urin jeweils über 2 Stunden gesammelt. Aus den Urinproben wurde die Ausscheidung von  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  und  $PO_4^{3-}$  gemessen und auf Kreatinin, Urinvolumen und Körpergewicht normiert.

Im Vergleich zu den  $Lep^{wt/wt}$ -Mäusen fiel der Blutzucker der  $Lep^{ob/ob}$ -Mäuse im Rahmen ihrer Insulinresistenz weniger stark ab. Das ausgeschiedene Urinvolumen bzw. die ausgeschiedene Kreatininmenge waren zwischen den jeweiligen Genotypen und verschiedenen Behandlungen vergleichbar. Diese Arbeit zeigte, dass sich nach Insulingabe die Ausscheidung von  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  und  $PO_4^{3-}$  bei  $Lep^{wt/wt}$ -Mäusen im Vergleich zur Vehikelgabe nicht ändert. Bei den KO-Mäusen fand sich hingegen nach Insulingabe eine erhöhte absolute Urinausscheidung von  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  und  $Mg^{2+}$ , die Phosphatausscheidung veränderte sich nicht. Für Natrium und Calcium persistierte diese Änderung nach Normierungen auf die ausgeschiedene Kreatininmenge ( $\mu$ mol/ mg crea), auf die Kreatininmenge pro Gramm Körpergewicht [ $\mu$ mol/mg crea g KG] und auf die absolute Urinausscheidung pro Gramm Körpergewicht [ $\mu$ mol/ 2 h\* g KG].

In diesem Modell findet sich keine Beeinflussung des tubulären Transports durch eine akute Insulingabe bei den insulinsensitiven WT-Mäusen. Hingegen wurden die Urin-Natrium- und Calciumausscheidung bei den insulinresistenten KO-Mäusen gesteigert, was unerwartet erscheint und weiter untersucht werden muss.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

---

1. Federation, I.D., *IDF DIABETES ATLAS, Eighth edition 2017*. 2017.
2. Koch, R. *Diabetes mellitus*. 2012; Available from: [https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Themen/Chronische\\_Erkrankungen/Diabetes/Diabetes\\_node.html](https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Themen/Chronische_Erkrankungen/Diabetes/Diabetes_node.html).
3. Herold, G., *Innere Medizin 2019*. 2019: De Gruyter.
4. Boucher, J., A. Kleinridders, and C.R. Kahn, *Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014. **6**(1).
5. Cuatrecasas, P., *The insulin receptor*. Diabetes, 1972. **21**(2 Suppl): p. 396-402.
6. Artunc, F., et al., *The impact of insulin resistance on the kidney and vasculature*. Nature Reviews Nephrology, 2016. **12**(12): p. 721-737.
7. Ehmke, H., *Säure-Basen-Haushalt, Pankreashormone*, in *Duale Reihe Physiologie*, J. Behrends, et al., Editors. 2016, Georg Thieme Verlag.
8. Kellerer, M., et al., *Distinct alpha-subunit structures of human insulin receptor A and B variants determine differences in tyrosine kinase activities*. Biochemistry, 1992. **31**(19): p. 4588-96.
9. Seino, S. and G.I. Bell, *Alternative splicing of human insulin receptor messenger RNA*. Biochem Biophys Res Commun, 1989. **159**(1): p. 312-6.
10. Kasuga, M., F.A. Karlsson, and C.R. Kahn, *Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor*. Science, 1982. **215**(4529): p. 185-7.
11. Belfiore, A., et al., *Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease*. Endocr Rev, 2009. **30**(6): p. 586-623.
12. Backer, J.M., et al., *Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation*. Embo j, 1992. **11**(9): p. 3469-79.
13. Farese, R.V., M.P. Sajan, and M.L. Standaert, *Atypical protein kinase C in insulin action and insulin resistance*. Biochem Soc Trans, 2005. **33**(Pt 2): p. 350-3.
14. Sun, X.J., et al., *Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein*. Nature, 1991. **352**(6330): p. 73-7.
15. Taniguchi, C.M., B. Emanuelli, and C.R. Kahn, *Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(2): p. 85-96.
16. Manning, B.D. and A. Toker, *AKT/PKB Signaling: Navigating the Network*. Cell, 2017. **169**(3): p. 381-405.
17. Brady, M.J. and A.R. Saltiel, *The role of protein phosphatase-1 in insulin action*. Recent Prog Horm Res, 2001. **56**: p. 157-73.
18. Fang, H. and R.L. Judd, *Adiponectin Regulation and Function*. Compr Physiol, 2018. **8**(3): p. 1031-1063.
19. Heni, M., et al., *Impaired insulin action in the human brain: causes and metabolic consequences*. Nat Rev Endocrinol, 2015. **11**(12): p. 701-11.
20. Sun, D., W. Man, and L. Zhang, *Roles of Insulin Resistance, Endothelial Dysfunction and Lifestyle Changes in the Development of Cardiovascular Disease in Diabetic Patients*. Curr Drug Targets, 2017. **18**(15): p. 1792-1799.
21. Yatabe, M.S., et al., *Salt sensitivity is associated with insulin resistance, sympathetic overactivity, and decreased suppression of circulating renin activity in lean patients with essential hypertension*. Am J Clin Nutr, 2010. **92**(1): p. 77-82.
22. Zhang, T., et al., *Temporal Relationship Between Childhood Body Mass Index and Insulin and Its Impact on Adult Hypertension*. Hypertension, 2016. **68**(3): p. 818-823.
23. Karlsson, F.H., et al., *Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control*. Nature, 2013. **498**(7452): p. 99-103.



24. Nakamura, R., D.S. Emmanouel, and A.I. Katz, *Insulin binding sites in various segments of the rabbit nephron*. J Clin Invest, 1983. **72**(1): p. 388-92.
25. Hale, L.J. and R.J. Coward, *The insulin receptor and the kidney*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2013. **22**(1): p. 100-6.
26. Tejada, T., et al., *Failure to phosphorylate AKT in podocytes from mice with early diabetic nephropathy promotes cell death*. Kidney Int, 2008. **73**(12): p. 1385-93.
27. Welsh, G.I., et al., *Insulin signaling to the glomerular podocyte is critical for normal kidney function*. Cell Metab, 2010. **12**(4): p. 329-340.
28. Lang, F., F. Artunc, and V. Vallon, *The physiological impact of the serum and glucocorticoid-inducible kinase SGK1*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2009. **18**(5): p. 439-48.
29. Lang, F., D.Y. Huang, and V. Vallon, *SGK, renal function and hypertension*. J Nephrol, 2010. **23 Suppl 16**(0 16): p. S124-9.
30. Kramer, H., et al., *Waist Circumference, Body Mass Index, and ESRD in the REGARDS (Reasons for Geographic and Racial Differences in Stroke) Study*. Am J Kidney Dis, 2016. **67**(1): p. 62-9.
31. Nerpin, E., et al., *Insulin sensitivity measured with euglycemic clamp is independently associated with glomerular filtration rate in a community-based cohort*. Diabetes Care, 2008. **31**(8): p. 1550-5.
32. De Cosmo, S., et al., *Role of insulin resistance in kidney dysfunction: insights into the mechanism and epidemiological evidence*. Nephrol Dial Transplant, 2013. **28**(1): p. 29-36.
33. Novikov, A. and V. Vallon, *Sodium glucose cotransporter 2 inhibition in the diabetic kidney: an update*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2016. **25**(1): p. 50-8.
34. Ejerblad, E., et al., *Obesity and risk for chronic renal failure*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(6): p. 1695-702.
35. Fox, C.S., et al., *Predictors of new-onset kidney disease in a community-based population*. Jama, 2004. **291**(7): p. 844-50.
36. Kanasaki, K., et al., *The biological consequence of obesity on the kidney*. Nephrol Dial Transplant, 2013. **28 Suppl 4**: p. iv1-7.
37. Pinto-Sietsma, S.J., et al., *A central body fat distribution is related to renal function impairment, even in lean subjects*. Am J Kidney Dis, 2003. **41**(4): p. 733-41.
38. Ritz, E., *Metabolic syndrome and kidney disease*. Blood Purif, 2008. **26**(1): p. 59-62.
39. Horita, S., et al., *Selective Insulin Resistance in the Kidney*. Biomed Res Int, 2016. **2016**: p. 5825170.
40. Gambaro, G. and A. Trinchieri, *Recent advances in managing and understanding nephrolithiasis/nephrocalcinosis*. F1000Res, 2016. **5**.
41. Abate, N., et al., *The metabolic syndrome and uric acid nephrolithiasis: novel features of renal manifestation of insulin resistance*. Kidney Int, 2004. **65**(2): p. 386-92.
42. Baum, M., *Insulin stimulates volume absorption in the rabbit proximal convoluted tubule*. J Clin Invest, 1987. **79**(4): p. 1104-9.
43. Veelken, R. and T. Ditting, *Nephrologie*, in *Duale Reihe Innere Medizin*, K. Arastéh, et al., Editors. 2018, Georg Thieme Verlag.
44. Murer, H., et al., *Molecular aspects in the regulation of renal inorganic phosphate reabsorption: the type IIa sodium/inorganic phosphate co-transporter as the key player*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2001. **10**(5): p. 555-61.
45. Laroche, M. and J.F. Boyer, *Phosphate diabetes, tubular phosphate reabsorption and phosphatonins*. Joint Bone Spine, 2005. **72**(5): p. 376-81.
46. Murer, H., et al., *Proximal tubular phosphate reabsorption: molecular mechanisms*. Physiol Rev, 2000. **80**(4): p. 1373-409.
47. Ghezzi, C. and E.M. Wright, *Regulation of the human Na<sup>+</sup>-dependent glucose cotransporter hSGLT2*. Am J Physiol Cell Physiol, 2012. **303**(3): p. C348-54.

48. Satoh, N., et al., *Roles of Akt and SGK1 in the Regulation of Renal Tubular Transport*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 971697.
49. Klisic, J., et al., *Insulin activates Na(+)/H(+) exchanger 3: biphasic response and glucocorticoid dependence*. Am J Physiol Renal Physiol, 2002. **283**(3): p. F532-9.
50. Rocchini, A.P., et al., *Insulin and renal sodium retention in obese adolescents*. Hypertension, 1989. **14**(4): p. 367-74.
51. Skøtt, P., et al., *Effect of insulin on renal sodium handling in hyperinsulinaemic type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients with peripheral insulin resistance*. Diabetologia, 1991. **34**(4): p. 275-81.
52. Nakamura, M., et al., *Stimulatory effect of insulin on renal proximal tubule sodium transport is preserved in type 2 diabetes with nephropathy*. Biochem Biophys Res Commun, 2015. **461**(1): p. 154-8.
53. Nakamura, M., et al., *Preserved Na/HCO<sub>3</sub> cotransporter sensitivity to insulin may promote hypertension in metabolic syndrome*. Kidney Int, 2015. **87**(3): p. 535-42.
54. Takahashi, N., O. Ito, and K. Abe, *Tubular effects of insulin*. Hypertens Res, 1996. **19 Suppl 1**: p. S41-5.
55. DeFronzo, R.A., M. Goldberg, and Z.S. Agus, *The effects of glucose and insulin on renal electrolyte transport*. J Clin Invest, 1976. **58**(1): p. 83-90.
56. Nizet, A., P. Lefebvre, and J. Crabbé, *Control by insulin of sodium potassium and water excretion by the isolated dog kidney*. Pflugers Arch, 1971. **323**(1): p. 11-20.
57. Li, H., et al., *Regulation of rat Na<sup>+</sup>/Pi cotransporter-1 gene expression: the roles of glucose and insulin*. Am J Physiol, 1996. **271**(6 Pt 1): p. E1021-8.
58. Kempe, D.S., et al., *Rapamycin-induced phosphaturia*. Nephrol Dial Transplant, 2010. **25**(9): p. 2938-44.
59. Bär, L., et al., *Insulin suppresses the production of fibroblast growth factor 23 (FGF23)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(22): p. 5804-5809.
60. Shimada, T., et al., *FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis*. J Bone Miner Res, 2004. **19**(3): p. 429-35.
61. Tiwari, S., et al., *Deletion of the insulin receptor in the proximal tubule promotes hyperglycemia*. J Am Soc Nephrol, 2013. **24**(8): p. 1209-14.
62. Wilding, J.P., *The role of the kidneys in glucose homeostasis in type 2 diabetes: clinical implications and therapeutic significance through sodium glucose co-transporter 2 inhibitors*. Metabolism, 2014. **63**(10): p. 1228-37.
63. Föller, M., et al., *PKB/SGK-resistant GSK3 enhances phosphaturia and calciuria*. J Am Soc Nephrol, 2011. **22**(5): p. 873-80.
64. Kostov, K., *Effects of Magnesium Deficiency on Mechanisms of Insulin Resistance in Type 2 Diabetes: Focusing on the Processes of Insulin Secretion and Signaling*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(6).
65. Dai, L.-j., et al., *Insulin stimulates Mg<sup>2+</sup> uptake in mouse distal convoluted tubule cells*. The American journal of physiology, 2000. **277**: p. F907-13.
66. Lang, F., et al., *Deranged transcriptional regulation of cell-volume-sensitive kinase hSGK in diabetic nephropathy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(14): p. 8157-62.
67. Blazer-Yost, B.L., M.A. Esterman, and C.J. Vlahos, *Insulin-stimulated trafficking of ENaC in renal cells requires PI 3-kinase activity*. Am J Physiol Cell Physiol, 2003. **284**(6): p. C1645-53.
68. Nishida, H., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway activates the WNK-OSR1/SPAK-NCC phosphorylation cascade in hyperinsulinemic db/db mice*. Hypertension, 2012. **60**(4): p. 981-90.
69. Kempe, D.S., et al., *Akt2/PKCbeta-sensitive regulation of renal phosphate transport*. Acta Physiol (Oxf), 2010. **200**(1): p. 75-85.
70. Blaine, J., M. Chonchol, and M. Levi, *Renal control of calcium, phosphate, and magnesium homeostasis*. Clin J Am Soc Nephrol, 2015. **10**(7): p. 1257-72.

71. Huang, D.Y., et al., *Impaired regulation of renal K<sup>+</sup> elimination in the sgk1-knockout mouse*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(4): p. 885-91.
72. Cheng, C.J. and C.L. Huang, *Activation of PI3-kinase stimulates endocytosis of ROMK via Akt1/SGK1-dependent phosphorylation of WNK1*. J Am Soc Nephrol, 2011. **22**(3): p. 460-71.
73. Lang, F., et al., *(Patho)physiological significance of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase isoforms*. Physiol Rev, 2006. **86**(4): p. 1151-78.
74. Li, L., et al., *Reduced ENaC activity and blood pressure in mice with genetic knockout of the insulin receptor in the renal collecting duct*. Am J Physiol Renal Physiol, 2013. **304**(3): p. F279-88.
75. Tiwari, S., et al., *Impaired sodium excretion and increased blood pressure in mice with targeted deletion of renal epithelial insulin receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(17): p. 6469-74.
76. Tomita, T., *Insulin Resistance Syndrome in OB/OB Mouse*. Austin J Endocrinol. Diabetes, 2016.
77. Ingalls, A.M., M.M. Dickie, and G.D. Snell, *Obese, a new mutation in the house mouse*. J Hered, 1950. **41**(12): p. 317-8.
78. Conde, J., et al., *Adipokines: biofactors from white adipose tissue. A complex hub among inflammation, metabolism, and immunity*. Biofactors, 2011. **37**(6): p. 413-20.
79. Harris, R.B., et al., *A leptin dose-response study in obese (ob/ob) and lean (+/?) mice*. Endocrinology, 1998. **139**(1): p. 8-19.
80. Shimomura, I., et al., *Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice*. Mol Cell, 2000. **6**(1): p. 77-86.
81. Pellemounter, M.A., et al., *Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice*. Science, 1995. **269**(5223): p. 540-3.
82. Larcher, F., et al., *A cutaneous gene therapy approach to human leptin deficiencies: correction of the murine ob/ob phenotype using leptin-targeted keratinocyte grafts*. Faseb j, 2001. **15**(9): p. 1529-38.
83. Kahn, B.B. and J.S. Flier, *Obesity and insulin resistance*. J Clin Invest, 2000. **106**(4): p. 473-81.
84. Hudkins, K.L., et al., *BTBR Ob/Ob mutant mice model progressive diabetic nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2010. **21**(9): p. 1533-42.
85. W. Forth, D.H.u.W.R., ed. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie : für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie und Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker*. 12. Auflage ed. 2017, Elsevier: München. XXVIII, 1113 Seiten.
86. Labor + Technik, E.L.G., *Creatinin, Jaffé, kinetisch, ohne Enteiweißung (LT-CR 0121)*. 2016.
87. Labor + Technik, E.L.G., *Phosphor, anorganisch (LT-PH 0100)*.
88. Labor + Technik, E.L.G., *Magnesium Xylidylblau (LT-MG 0103)*. 2018.
89. Labor + Technik, E.L.G., *Glucose Hexokinase Substratstart (LT-GLH 202)*. 2018.
90. Bold, A.M., R.J. Hurst, and R.R. McSwiney, *AUTOMATED ESTIMATION OF SODIUM, POTASSIUM, AND CALCIUM USING THE EPPENDORF FLAME PHOTOMETER*. J Clin Pathol, 1965. **18**(2): p. 240-3.
91. Wang, B., P.C. Chandrasekera, and J.J. Pippin, *Leptin- and leptin receptor-deficient rodent models: relevance for human type 2 diabetes*. Curr Diabetes Rev, 2014. **10**(2): p. 131-45.
92. Della-Fera, M.A., et al., *Sensitivity of ob/ob mice to leptin-induced adipose tissue apoptosis*. Obes Res, 2005. **13**(9): p. 1540-7.

93. Lindström, P., *The physiology of obese-hyperglycemic mice [ob/ob mice]*. ScientificWorldJournal, 2007. **7**: p. 666-85.
94. Baribault, H., *Mouse Models of Type 2 Diabetes Mellitus in Drug Discovery*. Methods Mol Biol, 2016. **1438**: p. 153-75.
95. Reichelt-Wurm, S., et al., *Glomerular expression pattern of long non-coding RNAs in the type 2 diabetes mellitus BTBR mouse model*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 9765.
96. Catena, C., et al., *Insulin receptors and renal sodium handling in hypertensive fructose-fed rats*. Kidney Int, 2003. **64**(6): p. 2163-71.
97. Mima, A., et al., *Glomerular-specific protein kinase C- $\beta$ -induced insulin receptor substrate-1 dysfunction and insulin resistance in rat models of diabetes and obesity*. Kidney Int, 2011. **79**(8): p. 883-96.
98. Manhiani, M.M., M.T. Cormican, and M.W. Brands, *Chronic sodium-retaining action of insulin in diabetic dogs*. Am J Physiol Renal Physiol, 2011. **300**(4): p. F957-65.
99. Grahammer, F., et al., *mTORC2 critically regulates renal potassium handling*. The Journal of Clinical Investigation, 2016. **126**(5): p. 1773-1782.
100. Li, L., et al., *Salt sensitivity of nitric oxide generation and blood pressure in mice with targeted knockout of the insulin receptor from the renal tubule*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2012. **303**(5): p. R505-12.
101. Jehle, S., et al., *Effect of large doses of parenteral vitamin D on glycaemic control and calcium/phosphate metabolism in patients with stable type 2 diabetes mellitus: a randomised, placebo-controlled, prospective pilot study*. Swiss Med Wkly, 2014. **144**: p. w13942.
102. Houillier, P., *Mechanisms and regulation of renal magnesium transport*. Annu Rev Physiol, 2014. **76**: p. 411-30.
103. Libório, A.B., et al., *Urinary calcium excretion and insulin resistance in patients with acromegaly*. Int Urol Nephrol, 2012. **44**(5): p. 1473-7.
104. Mattson, M.P., V.D. Longo, and M. Harvie, *Impact of intermittent fasting on health and disease processes*. Ageing Res Rev, 2017. **39**: p. 46-58.
105. Schäfer, S., et al., *Lifestyle intervention in individuals with normal versus impaired glucose tolerance*. Eur J Clin Invest, 2007. **37**(7): p. 535-43.
106. Stefan, N., et al., *A high-risk phenotype associates with reduced improvement in glycaemia during a lifestyle intervention in prediabetes*. Diabetologia, 2015. **58**(12): p. 2877-84.
107. Thamer, C., et al., *High visceral fat mass and high liver fat are associated with resistance to lifestyle intervention*. Obesity (Silver Spring), 2007. **15**(2): p. 531-8.
108. Takaya, J., H. Higashino, and Y. Kobayashi, *Intracellular magnesium and insulin resistance*. Magnes Res, 2004. **17**(2): p. 126-36.
109. Takaya, J., et al., *A Calcium-Deficient Diet in Dams during Gestation Increases Insulin Resistance in Male Offspring*. Nutrients, 2018. **10**(11).
110. Wang, C.H. and Y.H. Wei, *Role of mitochondrial dysfunction and dysregulation of Ca(2+) homeostasis in the pathophysiology of insulin resistance and type 2 diabetes*. J Biomed Sci, 2017. **24**(1): p. 70.
111. Gutiérrez, O.M., et al., *Racial differences in postprandial mineral ion handling in health and in chronic kidney disease*. Nephrol Dial Transplant, 2010. **25**(12): p. 3970-7.

## **7 ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL**

---

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Ferruh Artunc und meinem Betreuer Herrn Dr. Bernhard Bohnert.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Herrn Dr. Bernhard Bohnert von mir eigenständig unter Beobachtung durchgeführt.

Die statistische Auswertung der Daten und die Literaturrecherche erfolgten eigenständig durch mich persönlich.

Ich versichere, diese Dissertationsschrift selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen,

## 8 VERÖFFENTLICHUNGEN

---

Ergebnisse dieser Arbeit wurden unter folgendem Titel als Poster veröffentlicht:

„Effekt einer akuten Insulingabe auf den tubulären Transport bei Mäusen mit und ohne Insulinresistenz“

Nuray Emektar, Bernhard N. Bohnert, Ferruh Artunc

Auf dem

Kongress für Nephrologie 2020; 12. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, Berlin, 1. – 4. Oktober 2020.

## 9 DANKSAGUNG

---

An erster Stelle gebührt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Professor Ferruh Artunc für die Überlassung dieses interessanten Themas und für die Möglichkeit, in der Arbeitsgruppe Artunc promovieren zu dürfen. Ich bedanke mich herzlich bei dir für die umfassende Betreuung, deinen großen Einsatz, dein stets offenes Ohr und deine hilfreichen Beiträge und Lösungsvorschläge.

Des Weiteren danke ich meinem Betreuer Herrn Dr. Bernhard Bohnert für die unzähligen und unermüdlichen Gespräche und Anregungen. Lieber Bernhard, ich danke dir für dein Engagement, deinen fachlichen Rat und deine konstruktive Kritik, die maßgeblich dazu beigetragen haben, dass diese Dissertation in dieser Form vorliegt.

Diese Gelegenheit möchte ich nutzen, um mich bei allen Doktorandinnen und Doktoranden für ihre große Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei der Betreuung der Mäuse an Wochenend- und Feiertagen, zu bedanken. Ebenfalls bedanke ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der nephrologischen Labore für die Hilfe bei der Durchführung der Laborarbeiten.

Danken möchte ich außerdem meinen Eltern und Geschwistern für ihren jahrelangen Rückhalt während meines Studiums und meiner Promotion. Ein besonderer Dank gilt meinem Ehemann Mahir Emektar, der mich mit seiner Geduld und liebevollen Motivation während der gesamten Bearbeitungsphase meiner Dissertation und in allen Lebenslagen unterstützt hat.