

ELEONORA CHIAPPISI

Auswirkungen von Stress des Endoplasmatischen Retikulums in Rindernierenzellen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique 
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2019

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2019

© 2019 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem
Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. K. Eder

Auswirkungen von Stress des Endoplasmatischen Retikulums in Rindernierenzellen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Eleonora Chiappisi

Tierärztin aus Palermo (Italien)

Gießen 2018

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Herr Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

1. Gutachter: Prof. Dr. K. Eder

2. Gutachter: Prof. Dr. M. Diener

Tag der Disputation: 14.01.2019

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert:

J Dairy Sci. 2017 Aug; 100(8):6689-6706. doi: 10.3168/jds.2016-12406. Epub 2017 Jun 16.

Effect of endoplasmic reticulum stress on metabolic and stress signaling and kidney-specific functions in Madin-Darby bovine kidney cells.

Chiappisi E, Ringseis R, Eder K, Gessner DK

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-------------|
| TABELLENVERZEICHNIS | V |
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS..... | VII |
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | VIII |
| 1 EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 Die Niere als zentrales Stoffwechselorgan..... | 1 |
| 1.2 Das Endoplasmatische Retikulum und seine Funktionen | 2 |
| 1.2.1 Qualitätskontrolle im ER..... | 3 |
| 1.3 Stress im Endoplasmatischen Retikulum (ER-Stress) | 5 |
| 1.3.1 ER-Stress und Apoptose..... | 9 |
| 1.3.2 ER-Stress und Pathogenese..... | 10 |
| 1.4 Lipidstoffwechsel..... | 10 |
| 1.4.1 Die <i>Sterol Regulatory Element Binding Proteins</i> (SREBPs)..... | 10 |
| 1.4.2 Lipidstoffwechsel und ER-Stress..... | 11 |
| 1.5 Entzündung | 12 |
| 1.5.1 Der Nuklearfaktor- κ B (NF- κ B) und dessen Signalweg | 12 |
| 1.5.2 Das Inflammasom | 14 |
| 1.6 Antioxidative Abwehr über den Nrf2-Signalweg | 15 |
| 1.7 Interaktionen zwischen ER-Stress, Entzündung und oxidativem Stress | 16 |
| 1.8 Vitamin-D-Stoffwechsel..... | 18 |
| 1.8.1 Vitamin D und ER-Stress | 19 |
| 1.9 Polyphenole und ihre biologischen Wirkungen..... | 20 |
| 1.10 Zielsetzung der Arbeit | 21 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2 | MATERIAL UND METHODEN | 23 |
| 2.1 | Material | 23 |
| 2.1.1 | Chemikalien..... | 23 |
| 2.1.2 | Geräte und Verbrauchsmaterial | 24 |
| 2.1.3 | Puffer und Lösungen | 26 |
| 2.1.4 | Zelllinie | 27 |
| 2.2 | Methoden | 28 |
| 2.2.1 | Zellbiologische Methoden..... | 28 |
| 2.2.2 | MTT-Test..... | 30 |
| 2.2.3 | In- <i>vitro</i> Inkubationsversuche mit Tunicamycin..... | 31 |
| 2.2.4 | In- <i>vitro</i> Inkubationsversuche mit Thapsigargin | 32 |
| 2.2.5 | In- <i>vivo</i> Milchviehlaktationsversuch | 33 |
| 2.2.6 | In- <i>vivo</i> Fütterungsversuche mit Rindern in der Frühlaktation | 34 |
| 2.2.7 | Gewinnung des Gesamtproteins | 35 |
| 2.2.8 | Proteingewinnung mit dem <i>Nuclear Extract Kit</i> | 35 |
| 2.2.9 | Bestimmung der Proteinkonzentration | 36 |
| 2.2.10 | SDS-PAGE..... | 36 |
| 2.2.11 | Western Blot..... | 37 |
| 2.2.12 | RNA-Isolierung | 40 |
| 2.2.13 | Bestimmung der RNA-Konzentration | 40 |
| 2.2.14 | cDNA-Synthese..... | 41 |
| 2.2.15 | RTD-PCR | 41 |
| 2.2.16 | DNA-Gelelektrophorese | 48 |
| 2.2.17 | ELISA | 48 |
| 2.2.18 | Massenspektrometrische Analysen..... | 49 |
| 2.2.19 | Statistische Auswertung | 49 |
| 3 | ERGEBNISSE | 51 |
| 3.1 | Etablierung eines Zellmodells zur Untersuchung des ER-Stresses in der Niere beim Rind | 51 |
| 3.1.1 | Zellviabilität der MDBK-Zellen unter Einfluss von Tunicamycin und Thapsigargin | 51 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3.1.2 | Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Gene der UPR | 53 |
| 3.1.3 | Proteinexpression der phosphorylierten und der totalen PERK | 57 |
| 3.2 | Einfluss von Tunicamycin und Thapsigargin auf den Lipidstoffwechsel in MDBK-Zellen | 61 |
| 3.2.1 | Relative mRNA-Konzentrationen des SREBF1 und ausgewählter SREBP1- Zielgene und -Regulatoren | 61 |
| 3.3 | Einfluss von Tunicamycin und Thapsigargin auf inflammatorische Prozesse in MDBK-Zellen | 63 |
| 3.3.1 | Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter NF- κ B-Zielgene | 63 |
| 3.3.2 | Proteinexpression des NF- κ B p50 | 65 |
| 3.3.3 | Relative mRNA-Konzentrationen eines repräsentativen Gens des Inflammasoms | 67 |
| 3.4 | Einfluss von Tunicamycin und Thapsigargin auf die antioxidative Abwehr in MDBK-Zellen | 68 |
| 3.4.1 | Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Nrf2-Zielgene | 69 |
| 3.5 | Einfluss von Tunicamycin und Thapsigargin auf die mRNA- Konzentration von Genen, die für Transporter in MDBK-Zellen kodieren | 70 |
| 3.5.1 | Relative mRNA-Konzentrationen der Natrium-Kalium-ATPase | 71 |
| 3.5.2 | Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Kalziumtransporter | 71 |
| 3.5.3 | Relative mRNA-Konzentrationen eines repräsentativen Glukosetransporters 72 | |
| 3.5.4 | Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Aminosäuretransporter | 73 |
| 3.6 | Einfluss von Tunicamycin und Thapsigargin auf den Vitamin-D- Stoffwechsel in MDBK-Zellen | 74 |
| 3.6.1 | Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Vitamin-D-Hydroxylasen und des Vitamin-D-Rezeptors | 75 |
| 3.6.2 | 1,25-Dihydroxyvitamin-D ₃ -Konzentration im Zellüberstand | 76 |
| 3.7 | Einfluss von Geburt und Laktation auf den Vitamin-D-Stoffwechsel beim Rind 77 | |
| 3.7.1 | Relative mRNA-Konzentrationen der Vitamin-D-25-Hydroxylase | 78 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 3.7.2 | 25-Hydroxyvitamin-D ₂ - und 25-Hydroxyvitamin-D ₃ -Konzentrationen im Plasma | 78 |
| 3.8 | Einfluss von Traubentrester und Pflanzenpräparaten auf den Vitamin-D-Stoffwechsel in der Rinderleber in der Frühlaktation..... | 79 |
| 3.8.1 | Relative mRNA-Konzentrationen der Vitamin-D-25-Hydroxylase..... | 80 |
| 4 | DISKUSSION..... | 81 |
| 4.1 | ER-Stress in MDBK-Zellen | 82 |
| 4.2 | Wirkung von ER-Stress-Induktoren auf verschiedene Stoffwechselwege in MDBK-Zellen..... | 85 |
| 4.2.1 | Wirkung von ER-Stress-Induktoren auf die mRNA-Konzentrationen von SREBF1, SREBP1-Zielgenen und -Regulatoren | 85 |
| 4.2.2 | Wirkung von ER-Stress-Induktoren auf die mRNA-Konzentration und die Expression inflammatorischer und antioxidativer Gene in MDBK-Zellen..... | 87 |
| 4.2.3 | Wirkung von ER-Stress-Induktoren auf die mRNA-Konzentration ausgewählter Transporter in MDBK-Zellen..... | 91 |
| 4.2.4 | Wirkung von ER-Stress-Induktoren auf Gene und Metaboliten des Vitamin-D-Stoffwechsels in MDBK-Zellen..... | 95 |
| 4.3 | Wirkung von Frühlaktation und polyphenolhaltiger Fütterung auf den Vitamin-D-Stoffwechsel beim Rind | 97 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG..... | 101 |
| 6 | SUMMARY | 103 |
| 7 | LITERATURVERZEICHNIS | 105 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Eigenschaften der verwendeten Antikörper | 39 |
| Tabelle 2: Zusammensetzung des cDNA-Synthese-Mastermix..... | 41 |
| Tabelle 3: Zusammensetzung des PCR-Mastermix | 42 |
| Tabelle 4: Expressionsstabilitäten (M-Werte) der drei stabilsten Referenzgene in MDBK-Zellen gemäß „GeNorm“ | 43 |
| Tabelle 5: Eigenschaften der verwendeten Primer | 44 |
| Tabelle 6: Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter ER-Stress Gene unter Einfluss von Tunicamycin. | 54 |
| Tabelle 7: Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter ER-Stress Gene unter Einfluss von Thapsigargin..... | 55 |
| Tabelle 8: Relative mRNA-Konzentrationen des SREBF1, ausgewählter SREBP1- Zielgene und -Regulatoren unter Einfluss von Tunicamycin..... | 62 |
| Tabelle 9: Relative mRNA-Konzentrationen des SREBF1, ausgewählter SREBP1- Zielgene und -Regulatoren unter Einfluss von Thapsigargin | 63 |
| Tabelle 10: Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter NFκB-Zielgene unter Einfluss von Tunicamycin | 64 |
| Tabelle 11: Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter NFκB-Zielgene unter Einfluss von Thapsigargin..... | 65 |
| Tabelle 12: Relative mRNA-Konzentrationen eines repräsentativen Gens des Inflammasoms unter Einfluss von Tunicamycin..... | 68 |
| Tabelle 13: Relative mRNA-Konzentrationen eines repräsentativen Gens des Inflammasoms unter Einfluss von Thapsigargin | 68 |
| Tabelle 14: Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Nrf2-Zielgene unter Einfluss von Tunicamycin | 69 |
| Tabelle 15: Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Nrf2-Zielgene unter Einfluss von Thapsigargin..... | 70 |
| Tabelle 16: Relative mRNA-Konzentrationen der Natium-Kalium-ATPase unter Einfluss von Tunicamycin | 71 |
| Tabelle 17: Relative mRNA-Konzentrationen der Natium-Kalium-ATPase unter Einfluss von Thapsigargin..... | 71 |

| | |
|--|----|
| Tabelle 18: Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Kalziumtransporter unter Einfluss von Tunicamycin | 72 |
| Tabelle 19: Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Kalziumtransporter unter Einfluss von Thapsigargin..... | 72 |
| Tabelle 20: Relative mRNA-Konzentrationen des GLUT1-Transporters unter Einfluss von Tunicamycin..... | 73 |
| Tabelle 21: Relative mRNA-Konzentrationen des GLUT1-Transporters unter Einfluss von Thapsigargin | 73 |
| Tabelle 22: Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Aminosäuretransporter unter Einfluss von Tunicamycin | 74 |
| Tabelle 23: Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Aminosäuretransporter unter Einfluss von Thapsigargin | 74 |
| Tabelle 24: Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Vitamin-D-Hydroxylasen und des Vitamin-D-Rezeptors unter Einfluss von Tunicamycin | 75 |
| Tabelle 25: Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Vitamin-D-Hydroxylasen und des Vitamin-D-Rezeptors unter Einfluss von Thapsigargin..... | 76 |
| Tabelle 26: Relative mRNA-Konzentrationen der Vitamin-D-25-Hydroxylase in der Rinderleber 3 Wochen <i>ante partum</i> und 1, 5 und 14 Wochen <i>post partum</i> | 78 |
| Tabelle 27: Konzentrationen in ng/ml von 25-Hydroxyvitamin D ₂ und 25-Hydroxyvitamin D ₃ im Plasma von Rindern 3 Wochen <i>ante partum</i> und 1, 5 und 14 Wochen <i>post partum</i> | 79 |
| Tabelle 28: Relative mRNA-Konzentrationen der Vitamin-D-25-Hydroxylase in der Rinderleber 1 Woche <i>post partum</i> unter Einfluss von Traubentrester und Kräutern. | 80 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1. ER-Stress und UPR..... | 6 |
| Abbildung 2: MTT-Test: Zellviabilität der MDBK-Zellen unter Einfluss von Tunicamycin. | 52 |
| Abbildung 3: MTT-Test. Zellviabilität der MDBK-Zellen unter Einfluss von Thapsigargin..... | 52 |
| Abbildung 4: XBP1-Splicing unter Einfluss von Tunicamycin | 56 |
| Abbildung 5: XBP1-Splicing unter Einfluss von Thapsigargin..... | 57 |
| Abbildung 6: Relative Proteinkonzentration der PERK und der phosphorylierten PERK unter Einfluss von Tunicamycin | 59 |
| Abbildung 7: Relative Proteinkonzentration der PERK und der phosphorylierten PERK unter Einfluss von Thapsigargin..... | 60 |
| Abbildung 8: Relative Proteinkonzentration des NF-κB p50 unter Einfluss von Tunicamycin | 66 |
| Abbildung 9: Relative Proteinkonzentration des NF-κB p50 unter Einfluss von Thapsigargin..... | 67 |
| Abbildung 10 Synthese von 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ im Überstand von MDBK-Zellen..... | 77 |

Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung | Bedeutung |
|--------------------------------------|---|
| μ | Mikro |
| μg | Mikrogramm |
| μM | Mikromolar |
| 1,25(OH) ₂ D ₃ | 1,25 Dihydroxyvitamin D ₃ |
| ACACA | <i>acetyl-CoA carboxylase alpha</i> |
| ACTB | β-Actin |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| AK | Antikörper |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| ARE | <i>antioxidant response element</i> |
| ASC (PYCARD) | <i>apoptosis-associated speck-like protein</i> |
| ASK | <i>apoptosis-signal-regulating kinase</i> |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> |
| ATF3 | <i>activating transcription factor 3</i> |
| ATF4 | <i>activating transcription factor 4</i> |
| ATF6 | <i>activating transcription factor 6</i> |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| ATP1A1 | Na ⁺ /K ⁺ -ATPase, Polypeptid α1 |
| ATP2B1 | ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 1 |
| ATP5B | <i>ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide</i> |
| BAK | <i>BCL2 antagonist/killer 1</i> |
| BAX | <i>BCL2-associated X protein</i> |
| BCA | Bichinchoninsäure |
| BCL-2 | <i>B-cell CLL/lymphoma 2</i> |
| BCL-xL | <i>B-cell lymphoma-extra large</i> |
| BFA | Brefeldin A |
| BIP (HSPA5) | <i>binding immunoglobulin protein</i> |
| bp | Basenpaare |
| C/EBP | <i>CCAAT/enhancer-binding protein</i> |
| CALB1 | calbindin 1, 28kDa |
| CARD | <i>caspase activation and recruitment domain</i> |
| CASP3 | caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase |

| | |
|-----------------|--|
| CAT | Catalase |
| CAV1 | Caveolin 1 |
| cDNA | komplementäre DNA |
| CHOP (DDIT3) | <i>C/EBP homologous protein</i> |
| CLA | Konjugierte Linolsäuren |
| CO ₂ | Kohlendioxid |
| Ct | <i>cycle threshold</i> |
| CYP24A1 | <i>cytochrome P450, family 24, subfamily A, polypeptide 1 (24-Hydroxylase)</i> |
| CYP27B1 | <i>cytochrome P450, family 27, subfamily B, polypeptide 1 (1α-Hydroxylase)</i> |
| CYP2R1 | <i>cytochrome P450, family 2, subfamily R, polypeptide 1</i> |
| DAMP | <i>danger-associated molecular patterns</i> |
| DDIT3 (CHOP) | <i>DNA damage inducible transcript 3</i> |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | <i>desoxyribonucleic acid</i> |
| DNAJC3 | <i>DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3</i> |
| dNTP | Desoxyribonucleosidtriphosphat |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDEM1 | <i>ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 1</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| eIF2 | <i>eukaryotic translation initiating factor-2</i> |
| ELISA | <i>enzyme linked immunosorbent assay</i> |
| ELOVL6 | <i>fatty acid elongase 6</i> |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| ERAD | <i>endoplasmic-reticulum-associated protein degradation</i> |
| ERAD | ER-assoziierte Degradation |
| ERSE | <i>ER-Stress Responsive Elements</i> |
| FASN | <i>fatty acid synthase</i> |
| FKS | Fetales Kälberserum |
| fmol | Femtomol |
| g | Gramm |
| g | G-Zahl (Vielfache der Erdbeschleunigung) |
| G6PD | <i>glucose-6-phosphate dehydrogenase</i> |
| GADD34 | <i>growth arrest and DNA damage-inducible protein</i> |
| GLS | Golgi-Lokalisationssequenz |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------------|---|
| GPI | Glycosylphosphatidylinositol |
| GPX3 | Glutathionperoxidase 3 |
| GSGME | <i>grape seed and grape marc meal extract</i> |
| h | Stunde |
| HCl | Salzsäure |
| HERPUD1 | <i>homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1</i> |
| HMOX1 | Hämoxygenase 1 |
| HPLC | <i>high pressure liquid chromatography</i> |
| HRP | <i>Horseradish Peroxidase</i> |
| HSPA5 (BIP) | <i>heat shock protein family A (Hsp70) member 5</i> |
| IKK | I- κ B Kinase |
| IL1B (IL-1 β) | Interleukin 1b |
| IL-6 | Interleukin 6 |
| INSIG1 | <i>insulin induced gene 1</i> |
| INSIG2 | <i>insulin induced gene 2</i> |
| IRE1 | <i>inositol-requiring enzyme 1</i> |
| JNK | <i>c-Jun N-terminal kinase</i> |
| kDa | Kilodalton |
| LC | <i>liquid chromatography</i> |
| mA | Milliampere |
| MDBK | <i>Madin-Darby bovine kidney</i> |
| MEM/EBSS | <i>Minimum Essential Medium and Earle's Balanced Salt Solution</i> |
| MGST3 | <i>microsomal glutathione S-transferase 3</i> |
| ml | Milliliter |
| mM | Millimolar |
| MRM | <i>multiple reaction monitoring</i> |
| mRNA | <i>messenger RNA</i> |
| MS | <i>mass spectrometry</i> |
| MT1A | Metallothionein 1A |
| MT2A | Metallothionein 2A |
| MTT | 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-tetrazoliumbromid |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NADPH | Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduzierte Form) |
| NCBI | <i>National Center for Biotechnology Information</i> |
| NF-Y | <i>nuclear transcription factor Y</i> |

| | |
|----------------|--|
| NF-κB | Nuklearfaktor-κB |
| NLR | <i>nod-like receptor</i> |
| Nm | Nanometer |
| NQO1 | NAD(P)H Quinone Oxidoreductase 1 |
| Nrf2 | <i>nuclear factor erythroid 2 (NFE2)-related factor 2</i> |
| PAMP | <i>pathogen-associated molecular patterns</i> |
| PBS | <i>phosphate buffered saline</i> |
| PCR | <i>polymerase chain reaction</i> |
| PDI | Proteindisulfid Isomerasen |
| PDIA4 | <i>protein disulfide isomerase family A, member 4</i> |
| PERK | <i>protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase</i> |
| PPI | Peptidyl-Prolyl Isomerasen |
| PPIA | <i>peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)</i> |
| PRR | <i>pattern recognition receptor</i> |
| PYCARD (ASC) | <i>PYD and CARD domain containing</i> |
| PYD | Pyrimidin-Domäne |
| RIP | <i>regulated intramembrane proteolysis</i> |
| RIPA | <i>radioimmunoprecipitation assay</i> |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNS | <i>reactive nitrogen species</i> |
| ROS | <i>reactive oxygen species</i> |
| RPL12 | <i>ribosomal protein L12</i> |
| RPS9 | <i>ribosomal protein S9</i> |
| RT | Raumtemperatur |
| RTD-PCR | <i>Realtime-detection PCR</i> |
| RXR | <i>Retinoid-X-Receptor</i> |
| S1P | <i>site-1-protease</i> |
| S2P | <i>site-2-protease</i> |
| SAA3 | Serum Amyloid A3 |
| SCAP | <i>SREBF cleavage activating protein</i> |
| SDHA | <i>succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)</i> |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SEM | <i>standard error of the mean</i> |
| SERCA | <i>sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase</i> |
| SLC2A1 (GLUT1) | <i>solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1</i> |

| | |
|---------------------|---|
| SLC3A1 | <i>solute carrier family 3 (amino acid transporter heavy chain), member 1</i> |
| SLC7A8 | <i>solute carrier family 7 (amino acid transporter light chain, L system), member 8</i> |
| SOD1 | <i>Superoxiddismutase 1</i> |
| SREBF1 | <i>sterol regulatory element binding transcription factor 1</i> |
| SREBP | <i>sterol regulatory element binding protein</i> |
| SRP | <i>Signal recognition particle</i> |
| TBS-T | <i>Tris Buffered Saline Tween</i> |
| TEMED | <i>N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin</i> |
| TG | <i>Thapsigargin</i> |
| TM | <i>Tunicamycin</i> |
| TMR | <i>Trockenmischung</i> |
| TNF (TNF α) | <i>Tumor Nekrose Faktor alpha</i> |
| TRAF2 | <i>TNF-receptor-associated factor 2</i> |
| Tris | <i>Trishydroxymethylaminomethan</i> |
| uORF | <i>upstream open reading frames</i> |
| UPR | <i>unfolded protein response</i> |
| UPRE | <i>unfolded protein response elements</i> |
| V | <i>Volt</i> |
| VDR | <i>Vitamin-D-Rezeptor</i> |
| XBP1 | <i>X-box binding protein 1</i> |
| XBP1s | <i>XBP1 spliced</i> |
| XBP1u | <i>XBP1 unspliced</i> |

1 Einleitung

1.1 Die Niere als zentrales Stoffwechselorgan

Die Niere ist ein lebenswichtiges Organ. Zu dessen Hauptaufgaben gehören die Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen und die Konservierung solcher, die dem Körper erhalten bleiben sollen. Somit spielt die Niere sowohl im Wasser- und Elektrolythaushalt, als auch im Säure-Basen-Haushalt eine wichtige Rolle. Durch Metabolismus und Produktion von Hormonen, gehören auch endokrine Funktionen zu ihren Aufgaben (1).

Das Nephron stellt die Funktionseinheit der Nieren dar. Es besteht aus einem Glomerulus und einem Tubulussystem (proximaler Tubulus, Henle-Schleife, distaler Tubulus), das in ein Sammelrohrsystem übergeht. In den Glomeruli wird durch Filtration des Blutes der Primärharn gebildet. Dieser, der abgesehen von den fehlenden Proteinen, die durch die Glomeruli zurückgehalten werden, eine ähnliche Zusammensetzung wie das Blutplasma hat, durchläuft das Tubulussystem und wird zum Endharn verarbeitet. Dafür werden verschiedene Transportmechanismen benötigt. Durch passive, primär und sekundär aktive Transportmechanismen, sowie durch parazellulären Transport, wird die Resorption und Sekretion einiger Moleküle ermöglicht. Es ist für den Organismus von großer Bedeutung, dass das Gleichgewicht einiger Ionen (u.a. Natrium, Chlorid, Kalzium, Kalium) aufrechterhalten wird. Diese Aufgabe ist hauptsächlich der Niere zugeordnet, die je nach Stoffwechsellage eine vermehrte Resorption oder Sekretion dieser Moleküle einleitet. Andere Stoffe, wie Kohlenhydrate, Aminosäuren oder Di- und Tripeptide werden bei voller Funktionsfähigkeit der Niere vollständig resorbiert. Harnpflichtige Stoffe, darunter einige Medikamente, werden in der Regel wiederum vollständig ausgeschieden. Essentiell ist außerdem die Harnkonzentrierung, also die Resorption von Wasser. In der Niere werden Hormone metabolisiert (Calcidiol wird zum biologisch aktiven Calcitriol umgewandelt) oder synthetisiert (Erythropoetin, Eicosanoide). Für einige

Hormone, insbesondere für Corticosteroide, stellt die Niere wiederum eines der Zielorgane dar (1).

Die komplexen und sehr feinregulierten Vorgänge innerhalb der Niere und das Zusammenspiel mit anderen Organen führen dazu, dass die Niere ein zentrales Stoffwechselorgan mit lebenswichtigen Aufgaben ist.

1.2 Das Endoplasmatische Retikulum und seine Funktionen

Das Endoplasmatische Retikulum (ER) ist ein Zellorganell eukaryotischer Zellen, bestehend aus Röhren und Zisternen. Das ER ist der Hauptsyntheseort für Proteine, Lipide und Sterole (2; 3). Als größte Ca^{2+} -Reserve (4) ist das ER außerdem von großer Bedeutung, da es empfindlich auf die Zellhomöostase reagiert und Ca^{2+} ausschütten kann (2).

Es wird zwischen einem glatten und einem rauen ER unterschieden. Besteht das ER ausschließlich aus Röhren und Zisternen, spricht man von einem glatten ER. Dieses ist in Hepatozyten stark ausgebildet und dient vorwiegend der Synthese von Fettsäuren und Phospholipiden. Sind an die ER-Membran Ribosome gebunden, handelt es sich um ein raues ER, an dem die Synthese von Membranproteinen und sekretorischen Proteinen stattfindet (5).

Das Endoplasmatische Retikulum ist von einer Membran umgeben, durch die ein selektiver Transport zwischen dem ER-Lumen und dem Zytosol stattfindet (3). Somit unterscheidet sich das Milieu des ER-Lumens von dem des Zytosols und sorgt für eine optimierte Umgebung für Proteinfaltung und -reifung (6).

Proteine können entweder posttranslational oder kotranslational ins ER gelangen. Ein kotranslationaler Transport ist dann gewährleistet, wenn das mit der Polypeptidkette geladene Ribosom an die ER-Membran gebunden ist. Wichtig dafür ist das sogenannte Signalerkennungspartikel (SRP, *signal recognition particle*), das das Ribosom mit der Polypeptidkette zum ER führt. Damit das geschieht, muss die Polypeptidkette ein ER-Signalpeptid enthalten. SRP bindet an den ER-membranständigen SRP-Rezeptor, der mit einem Translocon assoziiert ist und der wachsenden Polypeptidkette eine Translokation ins ER-Lumen ermöglicht.

Hauptkomponente des Translocons ist der Sec61-Komplex, der die entsprechende Pore bildet, durch die die Polypeptidkette wandert (3).

Schon während der Translation und der Translokation werden Proteine mit Hilfe von Chaperonen und Faltungsenzymen gefaltet; die weitere Faltung findet posttranslational im ER-Lumen statt. Ein nachfolgender oligomerischer Zusammenbau findet ebenfalls im ER-Lumen statt (6).

Zu den posttranslationalen Veränderungen, die im ER, aber nicht im Zytosol stattfinden, gehören Disulfidbrückenbildung, Abspaltung des Signalpeptids, Aminogebundene Glykosylierung und GPI-Verankerung (6).

Die Faltungsmaschinerie im ER besteht aus drei Klassen von Proteinen: Foldasen, molekulare Chaperone und verschiedene Lectine. Zu letzteren gehören Calnexin, Calreticulin und das *ER degradation-enhancing-mannosidase-like protein* EDEM (4). Einige Chaperone und Enzyme, die an der Proteinfaltung beteiligt sind, sind auch Teil der Qualitätskontrolle im ER (6). Foldasen sind Enzyme, die die Proteinfaltung katalysieren, um die Faltungsrate zu steigern. Zu den Foldasen gehören cis-trans peptidyl-prolyl-Isomerasen (PPI) und Proteindisulfid-Isomerasen (PDI). Letztere katalysieren Disulfidbrückenbildungen. PPIs katalysieren die cis-trans Isomerisation von Peptidyl-Prolyl Bindungen (4). Molekulare Chaperone erleichtern die Proteinfaltung, indem sie ungefaltete Proteinregionen von umgebenden Proteinen abschirmen. Der bisher am genauesten beschriebene Chaperon im ER ist GRP78/BiP (*glucose related protein 78 kDa / immunoglobulin heavy chain binding protein*) und gehört zu den Hitzeschockproteinen HSP70. BiP ist außerdem an der Translokation elongierender Polypeptidketten ins ER und an der Erkennung fehlerhaft gefalteter Proteine beteiligt (4). Das Transmembranprotein Calnexin und das luminale Protein Calreticulin sind Lectine, die mit monoglucosylierten Zwischenstufen sich faltender Proteine interagieren (6).

1.2.1 Qualitätskontrolle im ER

Posttranslationale Modifikationen und Proteinfaltung sind komplexe Prozesse, die nicht immer fehlerfrei ablaufen. Um zu verhindern, dass fehlgefaltete Proteine das ER verlassen, gibt es die sogenannte Qualitätskontrolle im ER. Diese ist aus verschiedenen Gründen von großer Bedeutung. Wird eine prä-mature Freisetzung von

Proteinen verhindert, steigt die Wahrscheinlichkeit einer korrekten Proteinfaltung im ER; nachfolgende Organellen können keine Proteinfaltung gewährleisten; unvollständig oder fehlerhaft gefaltete Proteine sind potentiell schädigend für die Zelle, insbesondere wenn es sich um Ionenkanäle, Transporter oder Rezeptoren an der Zellmembran handelt. Außerdem werden durch die Qualitätskontrolle der Transport und die Aktivierung von spezifischen Proteinen reguliert (6).

Die Qualitätskontrolle beruht auf dem Prinzip, dass es anhand der strukturellen und biophysikalischen Eigenschaften eines Proteins möglich ist, zu erkennen, ob dieses korrekt gefaltet ist oder nicht. Nicht korrekt gefaltete Proteine enthalten hydrophobische Regionen auf ihrer Oberfläche, einzelne Cysteinreste oder haben die Tendenz sich zu aggregieren (6).

Das oben beschriebene Chaperon BiP ist in der Lage ungefaltete Proteine anhand der oberflächlichen hydrophoben Areale zu erkennen. BiP besteht aus einer N-terminalen ATPase und einer C-terminalen Substratbindungsdomäne. In seiner ADP-gebundenen Form hat BiP eine hohe Affinität zum Substrat, also zum ungefalteten Protein. Durch den Austausch von ADP mit ATP wird das Substrat freigesetzt, das dann weiter gefaltet werden kann. Dies führt dazu, dass ungefaltete Proteine so im ER zurückgehalten werden. Nicht korrekt gefaltete Proteine werden durch Calnexin und Calreticulin ebenfalls im ER zurückgehalten. Da es sich um Lectine handelt, also um Proteine, die Kohlenhydrate binden, dienen sie der Qualitätskontrolle von Glykoproteinen (4). Auch Oligosaccharide dienen der Qualitätskontrolle im ER, indem sie verhindern, dass Proteine miteinander interagieren (4).

Ist ein Substrat dauerhaft unvollständig gefaltet, gelangt es zum ER-membranständigen EDEM, das das Substrat zur sogenannten ER-assoziierten Degradation (ERAD) leitet. (6). Die ER-assoziierte Degradation von Proteinen besteht darin, die dauerhaft fehlerhaft gefalteten Proteine aus dem ER zurück ins Zytoplasma zu translozieren, wo sie von mehreren Ubiquitin-Molekülen gebunden werden, um letztlich in einem zylindrischen Proteinkomplex, dem sogenannten Proteasom, proteolytisch zersetzt zu werden (7).

1.3 Stress im Endoplasmatischen Retikulum (ER-Stress)

ER-Stress ist definiert als ein Ungleichgewicht zwischen der Proteinfaltungskapazität und dem Proteinaufkommen im ER, was zu einer Ansammlung ungefalteter oder fehlgefalteter Proteine führt (8). Als Reaktion auf diesen Zustand versucht die Zelle mit der sogenannten *Unfolded Protein Response* (UPR) wieder ein Gleichgewicht herzustellen (7; 8; 9; 2; 10; 4). Dabei soll das Proteinaufkommen im ER gemindert und die Proteinfaltungskapazität des ER erhöht werden. Durch Verminderung der Proteinsynthese und vermehrte Ausschleusung un- und fehlgefalteter Proteine ins Zytosol, gelingt es der Zelle, das Proteinaufkommen im ER zu mindern. Eine Steigerung der ER-Faltungskapazität erfolgt durch den Anstieg der Synthese molekularer Chaperone und Foldasen. Um einen Verdünnungseffekt zu erzielen, nimmt außerdem das ER an Volumen zu (4). Da un- und fehlgefaltete Proteine ein großes toxisches Potential für die Zelle haben (10), leitet die Zelle die Apoptose ein, wenn sie nicht in der Lage ist, eine Homöostase wiederherzustellen (11; 12).

Die UPR wurde erstmals in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt, wo sie durch das ER-Transmembranprotein IRE1 (*inositol-requiring protein-1*) reguliert wird (13; 14).

In Säugetierzellen wurden bisher drei Signalwege der UPR entdeckt. Zusätzlich zum evolutionär hochkonservierten IRE1, wurden zwei weitere am ER lokalisierte Transmembranproteine beschrieben: ATF6 (*activating transcription factor-6*) und PERK (*protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase*) (15; 16; 17; 18).

Unter physiologischen Bedingungen wird eine Aktivierung dieser Proteine durch Bindung des Chaperons BiP verhindert. Sammeln sich vermehrt un- und fehlgefaltete Proteine im ER an, löst sich BiP von den Transmembranproteinen, um die Proteine im ER-Lumen zu binden. Dies führt zur Aktivierung von ATF6, PERK und IRE1, die drei verschiedene Signalkaskaden auslösen (19; 20). Im Fall von IRE1 kann auch eine direkte Bindung der un- und fehlgefalteten Proteine das Transmembranprotein aktivieren (21).

Eine schematische Übersicht des ER-Stresses und der UPR ist in Abbildung 1 dargestellt.

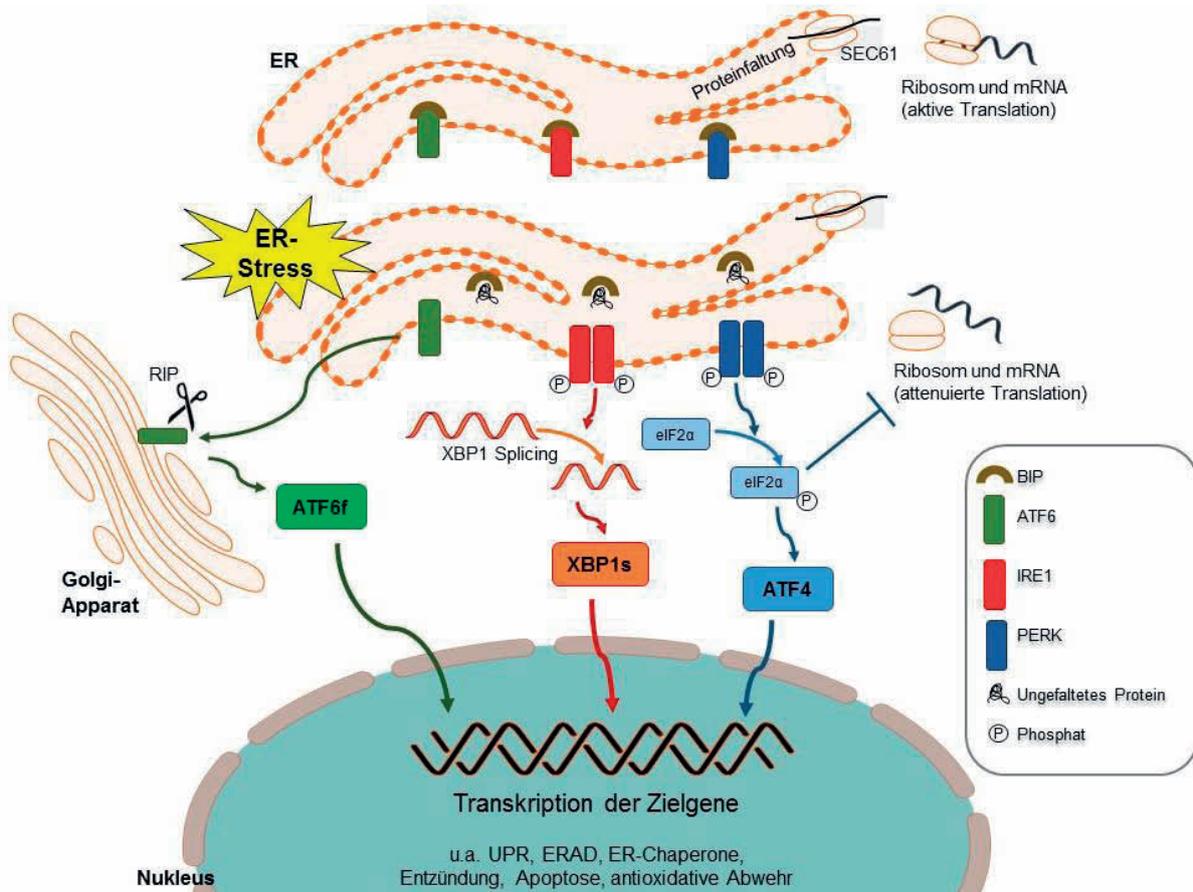


Abbildung 1. ER-Stress und UPR.

ATF6 = activating transcription factor 6; BIP = binding immunoglobulin protein; eIF2 α = eukaryotic translation initiating factor-2 α ; ER = Endoplasmatisches Retikulum; ERAD = endoplasmic-reticulum-associated protein degradation; IRE1 = inositol-requiring enzyme 1; mRNA = messenger RNA; PERK = protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase; RIP = regulated intramembrane proteolysis; RNA = Ribonukleinsäure UPR = unfolded protein response.

Schema modifiziert nach Chaudhari et al., 2014.

ATF6 ist ein Typ-II-Transmembranprotein des ER. Es besteht aus einer N-terminalen zytosolischen und einer C-terminalen luminalen Domäne. Letztere ist ein Sensor für ER-Stress und enthält zwei Golgi-Lokalisationssequenzen, GLS1 und GLS2. In der zytosolischen Domäne befinden sich ein Leuzin-Zipper (bZIP-) und eine DNA Aktivierungsdomäne (22; 23).

In Säugetierzellen Zellen gibt es zwei homologe Proteine von ATF6: ATF6 α und ATF6 β (24). ATF6 β , auch CREB-RP oder G13 genannt (25), hat eine geringere Transkriptionsaktivität als ATF6 α und scheint dessen Aktivität hemmend zu modulieren (26; 18). Mit ATF6 ist im Folgenden ATF6 α gemeint.

Wenn kein ER-Stress vorliegt ist BiP an GLS1 der luminalen Domäne von ATF6 gebunden. Dies bewirkt, dass ATF6 an der ER Membran gebunden bleibt. Kommt es zu einer Ansammlung von ungefalteten oder fehlgefalteten Proteinen im ER-Lumen, also zu ER-Stress, bindet das Chaperon BiP an diese Proteine. Das führt dazu, dass GLS1 des ATF6 freigelegt wird und ATF6 in den Golgi Apparat wandert. (20). Im Golgi Apparat wird ATF6 von zwei Enzymen gespalten, *site-1-protease* (S1P) und *site-2-protease* (S2P) (27). S1P spaltet ATF6 in seiner luminalen Domäne, während die zytosolische Domäne anschließend von S2P gespalten wird (25; 27; 28). Diese Spaltungen durch genannte Proteasen werden als *regulated intramembrane proteolysis* (RIP) bezeichnet (29). Das nun freigewordene bZIP-Fragment des ATF6 (ATF6f, „f“ für „Fragment“) wandert als Transkriptionsfaktor in den Zellkern und bindet zusammen mit dem *CCAAT-binding factor* CBF (NF-Y) an ER-Stress responsive Elemente ERSE-I und ERSE-II (30; 10; 18; 24).

Zielgene von ATF6 sind BiP, weitere Chaperone und Foldasen (4), P58^{IPK} (ein Inhibitor der eIF2 α Kinase PKR) (31), das *homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain* HERPUD1 (30), das *CEBP homologous protein* CHOP und das *X-box binding protein* XBP1 (28).

PERK ist ein Typ-I-Transmembranprotein des ERs und liegt unter normalen Bedingungen als Monomer vor (32). Es besteht aus einer luminalen und einer zytosolischen Einheit; letztere weist Proteinkinaseaktivität auf (19; 15). Unter physiologischen Bedingungen ist das Chaperon BiP an die luminalen Domäne von PERK gebunden (19). Kommt es zu ER-Stress, löst sich BiP von PERK, was zu einer Aktivierung dessen Proteinkinaseeinheit führt. Diese bewirkt eine Oligomerisierung und trans-Autophosphorylierung weiterer PERK-Moleküle (2; 10; 23). Die Aktivierung von PERK führt aber auch zur Phosphorylierung der α -Untereinheit vom EIF2 (*eukaryotic translation initiating factor-2*) und somit zu einer Runterregulierung der Proteinsynthese (15; 10). Nicht alle Gene sind von der Hemmung der Proteinsynthese betroffen. Interessanterweise kommt es in diesem Signalweg zu einer verstärkten Expression des *activating transcription factor* ATF4, da die phosphorylierte Form des EIF2 α in der Lage ist dessen inhibierenden *upstream open reading frames* (uORFs) zu übergehen und dadurch eine erhöhte Proteinexpression zu bewirken (33). Zielgene von ATF4 sind unter anderem CHOP (34), das *activating transcription factor* ATF3 (35), HERPUD (36) und das *growth arrest and DNA-damage-inducible* GADD34 (37).

GADD34 ist in der Lage eine Dephosphorylierung von EIF2 α -P zu bewirken und somit eine generell vermehrte Proteinsynthese herbeizuführen, also den PERK-Signalweg hemmend zu regulieren (37).

IRE1 ist ein Typ-I-Transmembranprotein des ERs, das zunächst in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt wurde, wo es als IRE1p die zelluläre Antwort auf ER-Stress einleitet (13; 14). Auch in Säugetieren ist das Transmembranprotein vorhanden. Dort gibt es zwei homologe Proteine, IRE1 α und IRE1 β (16; 17), wobei IRE1 β nur in Darmepithelzellen vorkommt (38), während IRE1 α ubiquitär exprimiert ist (16).

Im Folgenden ist mit IRE1 sowohl IRE1p als auch IRE1 α gemeint.

IRE1 besteht aus einer zytosolischen und einer luminalen Domäne. Letztere weist eine große Ähnlichkeit zur luminalen Domäne von PERK auf. Die zytosolische Domäne enthält eine Serin/Threonin-Kinase und eine C-terminale Endoribonuklease (16; 17). Eine Aktivierung von IRE1 bei ER-Stress findet wie bei PERK und ATF6 durch Lösung der Bindung mit BiP statt (19), wobei Untersuchungen ergaben, dass eine Aktivierung auch durch direkte Bindung von ungefalteten bzw. fehlgefalteten Proteinen an IRE1 ausgelöst werden kann (21). Es folgen Oligomerisierung und Transphosphorylierung weiterer IRE1-Moleküle (4). Eine Aktivierung der Endoribonukleaseeinheit hat zur Folge, dass aus dem Substrat HAC1 bei Hefen (39) und XBP1 in Säugetierzellen (40; 41) ein Intron aus der Mitte der mRNA entfernt wird und die zwei Enden zusammengefügt werden. Das neu entstandene HAC1_i (*HAC1 induced*) bzw. XBP1_s (*spliced XBP1*) ist ein Transkriptionsfaktor, der nun in den Nukleus wandern kann und dort zur Aktivierung von Zielgenen führen kann (40; 42; 41).

Zielgene von XBP1_s enthalten in ihrer Promotorregion ER-Stress responsive Elemente ERSE-I bzw. ERSE-II oder sogenannte *Unfolded Protein Response* Elemente (UPRE) (43). XBP1_s hat eine sehr hohe Affinität zu UPRE, die es unabhängig von NF- κ B binden kann. Gene, die wie EDEM Teil des ERADs sind, enthalten meist solch ein UPRE in ihrer Promoterregion (43). Herp, das in seiner Promotorregion ein ERSE-II enthält, ist ein weiteres Zielgen von XBP1_s (30; 43). Verschiedene Chaperone, Foldasen und Proteindisulfidisomerasen sind weitere XBP1_s-Zielgene (44), sowie Enzyme, die an der Phospholipidsynthese beteiligt sind (45). Interessanterweise induziert XBP1_s eine vermehrte Expression von XBP1 selbst, das in seinem Promotor ein UPRE enthält

(41). Demnach kann der IRE1-Signalweg die Antwort auf ER-Stress aufrechterhalten. XBP1u, die Form des XBP1, aus der kein Intron herausgeschnitten wurde (*unspliced* XBP1) stellt in diesem Signalweg eine negative Regulationseinheit dar, indem es die Transkription weiterer XBP1s-Zielgene hemmt. Wenn der ER-Stress nachlässt, wird wieder vermehrt XBP1u gebildet, das mit XBP1s einen Komplex bildet, der schnell über das Proteasom-System abgebaut wird und somit die XBP1s-Transkriptionsaktivität verhindert (46).

1.3.1 ER-Stress und Apoptose

Ein anhaltender ER-Stress führt zur Apoptose (11; 12).

Eine zentrale Rolle in der von ER-Stress induzierten Apoptose spielt CHOP/DDIT3, das von allen drei beschriebenen ER-Stress-Signalwegen induziert wird, wobei nur der PERK-eIF2 α -ATF4 Signalweg dafür essentiell ist (47). Unter den CHOP-Zielgenen befinden sich u.a. Proteine der apoptoseregulierenden BCL-2-Familie (12). Proteine, die der BCL-2-Familie angehören, können proapoptotisch (BAK, BAX) oder antiapoptotisch (BCL-2, BCL-xL) sein. CHOP führt u.a. zu einer verminderten Expression des antiapoptotischen BCL-2, was zu einer Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung proapoptotischer BCL-2-Proteine führt. BAX und BAK induzieren eine vermehrte Ca²⁺-Freisetzung aus dem ER und bilden Kanäle in der äußeren Mitochondrienmembran, wodurch es zur Freisetzung proapoptotischer Proteine wie *cytochrome c* kommt, das über die Caspase 9 eine proteolytische Kaskade einleitet und letztlich zur Apoptose führt (12).

Auch das Transmembranprotein IRE1 kann die Zelle zur Apoptose leiten (48). Das aktive IRE1 ist in der Lage das Molekül *TNF-receptor-associated factor 2* (TRAF2) zu rekrutieren und mit dem einen Komplex zu bilden, der seinerseits die *apoptosis-signal-regulating kinase* (ASK1) bindet. Der gesamte Komplex aktiviert die *Jun amino-terminal Kinase* (JNK), die durch Phosphorylierung das antiapoptotische BCL-2 inhibiert, das so nicht mehr in der Lage ist die proapoptotischen Proteine derselben Familie zu hemmen (49).

1.3.2 ER-Stress und Pathogenese

Experimentell kann ER-Stress über verschiedene Wege induziert werden. Zu den am meisten verwendeten ER-Stressoren gehören Tunicamycin (TM), Thapsigargin (TG), Brefeldin A (BFA) und Dithiothreitol (DTT). Tunicamycin hemmt die N-gebundene Glykosylierung, Thapsigargin führt zu einer Verschiebung der Ca^{2+} Reserven im ER durch Hemmung der *sarcoplasmic/endoplasmic reticulum* Ca^{2+} ATPase (SERCA), Brefeldin A blockiert den Transport vom ER zum Golgi Apparat und Dithiothreitol verhindert Disulfidbrückenbildungen (11).

Auch unter natürlichen Bedingungen kann es zu ER-Stress kommen. ER-Stress wurde in Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen gebracht, darunter metabolische Erkrankungen wie Diabetes Mellitus Typ 2 und Insulinresistenz, kardiovaskuläre Erkrankungen wie Ischämie und kardiale Hypertrophie, sowie neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer (7).

Virale Infektionen wurden ebenfalls in Zusammenhang mit ER-Stress gebracht (7). Viren, die das ER für ihre Replikation benötigen, führen zu einer Verschiebung der zellulären Homöostase. In Rindernierenzellen wurde gezeigt, dass eine Infektion mit dem bovinen Virusdiarrhoe Virus (BVDV) ER-Stress induziert (50). Besondere Stoffwechsellagen können ebenfalls zu einer Aktivierung der UPR führen. Untersuchungen haben gezeigt, dass es beim Rind in der Frühlaktation zu einem Anstieg von ER-Stress Genen in der Leber kommt (51).

1.4 Lipidstoffwechsel

1.4.1 Die *Sterol Regulatory Element Binding Proteins* (SREBPs)

Sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) sind membrangebundene Transkriptionsfaktoren, die zu der Familie der *basic helix-loop-helix-leucine zipper* (bHLH-Zip) gehören. Die inaktiven Vorstufen der SREBPs sind an das Endoplasmatische Retikulum gebunden. Erst nach einer proteolytischen Aktivierung

ist es den Proteinen möglich, in den Nukleus zu wandern und dort die Expression von über 30 Genen, die an der Synthese und Aufnahme von Cholesterol, Fettsäuren, Triglyceriden und Phospholipiden beteiligt sind, zu induzieren (52).

SREBPs bestehen aus drei Domänen: einer DNA-Bindungsdomäne am NH₂-terminalen Ende, einer regulatorischen Domäne am COOH-terminalen Ende und einer mittleren Domäne mit zwei hydrophoben membranüberspannenden Segmenten und einer in das ER-Lumen zeigenden Schleife (52).

SREBPs sind über das *SREBP cleavage-activating protein* SCAP an das ER gebunden und werden von dem sterolsensitiven SCAP zum Golgi-Apparat eskortiert, sobald dieses aufgrund eines Abfalls des intrazellulären Sterolspiegels seine Konformation ändert (53). Im Golgi-Apparat werden SREBPs von den Proteasen S1P und S2P je einmal gespalten (S1P und S2P sind dieselben Proteasen, die für die Spaltung von ATF6 zuständig sind), so dass letztlich das nun aktive NH₂-terminale Ende, auch *nuclear SREBP* (nSREBP) genannt (52), in den Kern wandern kann (54). Dort bindet das nSREBP an die *sterol response elements* (SREs) in der Promotorregion seiner Zielgene, dessen Expression es damit nun induziert (52).

SREBPs werden durch sogenannte Insig-Proteine (*insulin induced genes*) negativ reguliert. Dabei handelt es sich um ER-residente Proteine, die durch direkte Bindung des SCAP-SREBP-Komplexes dessen Translokation in den Golgi Apparat verhindern. Durch einen Abfall der Cholesterolkonzentration in der Zelle löst sich diese Bindung und SCAP kann SREBP zum Golgi Apparat eskortieren (53). In Säugetierzellen existieren zwei Isoformen: Insig-1 und Insig-2 (53).

Es existieren drei Isoformen innerhalb der SREBPs: SREBP-1a und SREBP-1c werden jeweils von einem Gen kodiert, SREBP-2 von einem anderen. SREBP-2 ist vorwiegend an der Cholesterolbiosynthese beteiligt, SREBP-1c an der Fettsäuresynthese. SREBP-1a aktiviert beide Signalwege (55).

1.4.2 Lipidstoffwechsel und ER-Stress

Der Zusammenhang zwischen ER-Stress und einem veränderten Lipidstoffwechsel wurde insbesondere in der Leber vielfach untersucht. Es ist bekannt, dass ER-Stress

durch die UPR zu einer gesteigerten Lipidsynthese führt und dadurch Lipide für einen Volumenzuwachs des ERs liefert (7). Es kommt zu einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren SREBP-1 und SREBP-2 mit nachfolgender Fettsäure- und Cholesterinsynthese (7; 56; 57).

Alle Signalwege der UPR können den Lipidstoffwechsel beeinflussen. XBP1 induziert direkt die Expression solcher Gene, die an der Fettsäuresynthese involviert sind (7). Bei sehr starkem oder anhaltendem ER-Stress kommt es allerdings zu einer durch XBP1 vermittelten Hemmung der Lipogenese (58). Die durch PERK und eIF2 α gehemmte Proteinsynthese führt u.a. zu einer verminderten Expression des Proteins Insig-1, was zu einer Aktivierung der SREBPs führt (58; 56; 57). Auch ATF6 induziert eine gesteigerte Lipidsynthese, wobei der Transkriptionsfaktor in der Fettsäureoxidation eine größere Rolle zu spielen scheint als in der Fettsäuresynthese (7).

Wenn auf der einen Seite ER-Stress zu einer gesteigerten Lipidsynthese und einer gestörten Lipidhomöostase führt, können Lipide und ein veränderter Lipidstoffwechsel ebenfalls zu ER-Stress führen (58). Es wurde mehrfach ein Zusammenhang zwischen Adipositas, Typ 2 Diabetes und ER-Stress festgestellt (59; 60).

1.5 Entzündung

1.5.1 Der Nuklearfaktor- κ B (NF- κ B) und dessen Signalweg

Der Nuklearfaktor- κ B (NF- κ B) wurde erstmals in B-Zellen entdeckt (61). Heute ist allgemein anerkannt, dass NF- κ B ubiquitär verbreitet ist und eine zentrale Rolle im Entzündungsgeschehen, sowie in der angeborenen und der erworbenen Immunität spielt. (62; 63; 64).

NF- κ B ist ein Dimer, das aus Proteinen der *Relish-* (Rel-) Familie besteht. Fünf dieser Proteine spielen bei den Säugetieren eine Rolle: p50/p105, p52/p100, p65 (RelA), c-Rel und RelB, wobei p105 und p100 Vorstufen des jeweils aktiven

Transkriptionsfaktors darstellen und NF- κ B am häufigsten aus p50 und p65 besteht (65; 63; 66; 67; 68). Allen oben genannten Proteinen gemein ist die *rel-homology domain* (RHD), in der sich die DNA-Bindungsdomäne sowie die Dimerisationsdomäne und das Nuklearlokalisierungssignal (NLS) befinden (68). Ohne RHD wäre somit eine Dimerisation, eine Wanderung in den Nukleus und eine Bindung an die DNA nicht möglich.

Im Folgenden ist mit NF- κ B das Heterodimer, bestehend aus p50 und p65 gemeint.

Im inaktiven Zustand liegt NF- κ B im Zytosol vor, gebunden an die inhibitorischen Proteine I- κ B (69). Es sind bislang sieben dieser inhibitorischen Proteine bekannt, die alle wiederholende Ankyrin-Motive aufweisen: I- κ B α , I- κ B β , I- κ B γ , I- κ B ϵ , Bcl-3, p100 und p105 (70). Hauptvertreter dieser Gruppe sind I- κ B α , I- κ B β und I- κ B ϵ . Diese besitzen als einzige eine regulatorische Domäne, die für den stimulusinduzierten Abbau dieser Proteine benötigt wird. Letzterer ist essentiell für die Aktivierung von NF- κ B (71). Die inhibitorischen I- κ Bs verhindern, dass NF- κ B in den Zellkern wandert, in dem sie an die RHD binden und das NLS verdecken (72).

Zu den zahlreichen Stimuli, die zu einer Aktivierung von NF- κ B führen, gehören u.a. eine Vielzahl an Bakterien und bakteriellen Produkten, sowie an Viren und viralen Bestandteilen, Protozoen, Zytokinen (z.B. TNF α und IL-1 β), freien Radikalen und Oxidantien (73).

Eine Aktivierung von NF- κ B wird eingeleitet durch die I- κ B Kinase (IKK), die aus IKK- α , IKK- β und IKK- γ (NEMO) besteht. IKK- α und IKK- β sind in der Lage die I- κ Bs zu phosphorylieren, während IKK- γ eine regulatorische Funktion übernimmt (74). Nach der Phosphorylierung folgen Ubiquitinierung und Proteolyse der I- κ Bs, so dass das NLS von NF- κ B freigelegt wird und das Heterodimer in den Zellkern wandern kann (68). Alle NF- κ B Zielgene enthalten die sogenannte *κ B-site*, eine Region mit einer bestimmten Basenabfolge, an die der Transkriptionsfaktor bindet (71).

Es sind mehr als 150 NF- κ B Zielgene bekannt. Zu den Proteinen, die durch NF- κ B exprimiert werden, gehören u.a. Zytokine, Chemokine, Immunrezeptoren, Adhäsine, Akute-Phase-Proteine, aber auch Membranrezeptoren, Apoptoseregulatoren, Wachstumsfaktoren und virale Proteine (75). Auch die Promotorregion des inhibitorischen I- κ B α enthält eine *κ B-site*, was dazu führt, dass NF- κ B seine eigene Aktivierung in einem negativen Regelkreis hemmen kann (76).

1.5.2 Das Inflammasom

Essentiell für das angeborene Immunsystem sind sogenannte *pattern recognition receptors* (PRRs), die verschiedene Stimuli detektieren und eine Immunantwort einleiten. Sie befinden sich nicht nur in Zellen des Immunsystems, sondern auch in metabolisch aktiven Geweben, einschließlich Hepatozyten, Myofibrillen und Adipozyten. Zu den PRRs gehören u.a. die zytoplasmatischen *nod-like receptors* (NLRs). Diese werden in fünf Subfamilien unterteilt: NLRA, NLRB, NLRC, NLRP und NLRX. Allen gemein sind eine zentrale NACHT-Domäne, zuständig für die Oligomerisierung, und eine C-terminale Region, die die Erkennung von *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) und *danger-associated molecular patterns* (DAMPs) erleichtert. Somit sind NLRs sowohl für die Erkennung von viralen und bakteriellen Pathogenen zuständig, als auch für endogene „Gefahrensignale“. Proteine der Subfamilie NLRP, die eine Pyrin-Domäne (PYD) enthalten, induzieren die Bildung inflammatorischer Multiproteinkomplexe, sogenannter Inflammasome, als Antwort auf Stresssignale (77; 78).

Unter den NLRs wurde insbesondere das für die Aktivierung von Caspase 1 zuständige NLRP3 Inflammasom untersucht. NLRP3 stellt eine Verbindung zum Adapterprotein, dem *apoptosis-associated speck-like protein* (ASC) her, das aus einer PYD- und einer CARD-Domäne besteht. Über die PYD-Domäne wird die Verbindung zu NLRP3 hergestellt, über die CARD-Domäne (*caspase activation and recruitment domain*) kommt es zu Rekrutierung und Aktivierung der Procaspase-1 (78; 79). ASC ist also ein Mediator zwischen dem zytosolischen Rezeptor NLRP3 und der Procaspase-1 (79). Aufgrund der Zusammensetzung wird ASC auch PYCARD genannt.

Die aktive Caspase-1 führt zur Reifung und Freisetzung der inflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-18, sowie zytotoxischer Proteine. Außerdem initiiert Caspase-1 einen proinflammatorischen Zelltod, genannt Pyroptosis, der dazu dient, intrazelluläre Pathogene erneut der extrazellulären Immunantwort zu präsentieren (77).

1.6 Antioxidative Abwehr über den Nrf2-Signalweg

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), reaktive Stickstoffspezies (RNS) und Elektrophile werden im Körper während einer Vielzahl von physiologischen Prozessen gebildet. Sammeln sich allerdings diese Stoffe aufgrund einer unkontrollierten Produktion an, kommt es zum sogenannten „oxidativen Stress“, der schädlich für die Zellfunktion ist und zur Entwicklung verschiedener Erkrankungen führen kann (80; 81; 82).

Eine funktionierende antioxidative Abwehr ist essentiell, um die Zelle vor Schädigungen durch den oxidativen Stress zu schützen. Zu den Antioxidantien zählen u.a. die Vitamine E und C (83), einige antioxidativ wirkende Verbindungen wie Harnsäure und Glutathion (84; 85) sowie metallbindende Proteine wie Ferritin und Metallothioneine (85; 86). Um im Falle von oxidativen Stress ein Gleichgewicht in der Zelle wiederherzustellen, wird außerdem die Transkription weiterer antioxidativer, detoxifizierender und zytoprotektiver Gene induziert (87). Das System, das diese Transkriptionsvorgänge reguliert, besteht hauptsächlich aus vier Komponenten: dem *nuclear factor erythroid 2 (NFE2)-related factor 2* Nrf2, dem Inhibitorprotein *Kelch-like ECH-associated protein* (Keap1), einer Gruppe von kleinen *musculoaponeurotic fibrosarcoma* (Maf) Proteinen und der in den Zielgenen enthaltenen Sequenz, die u.a. als *Antioxidant Response Element* (ARE) bekannt ist (88).

Der im physiologischen Zustand durch Keap1 inhibierte Transkriptionsfaktor Nrf2 wandert bei oxidativem Stress in den Nukleus, wo er als Heterodimer zusammen mit den kleinen Maf-Proteinen an das ARE bindet und die Transkription verschiedener Zielgene einleitet (87; 81; 82).

Nrf2 ist ein bZip-Transkriptionsfaktor, der zur Familie *cap 'n' collar* (CNP) gehört (82). Er besteht aus sechs Untereinheiten, Neh1-6 (*Nrf2-ECH homology*). Neh1 enthält die *basic leucine zipper* Domäne und ist sowohl für die Dimerisation als auch für die Bindung an die ARE-Sequenz zuständig. Neh2 ist die Bindungsstelle für das Inhibitorprotein Keap1. Neh3, Neh4 und Neh5 sind Bindungsstellen für verschiedene Koaktivatoren. Neh6 ist wie Neh2 eine regulatorische Einheit, allerdings unabhängig von Keap1 (87).

Wenn kein oxidativer Stress vorliegt, verhindert das an das Zytoskelett gebundene Keap1 die Translokation von Nrf2 in den Nukleus (89). Keap1 besteht aus drei

Untereinheiten: der BTB-Domäne (*bric-à-brac*, *tramtrack*, *broad complex*), der DGR-Domäne (*Kelch repeat*, *double glycine repeat*) und der dazwischen gelegenen IVR-Domäne (*intervening region*), die reich an Cysteinresten ist. BTB ermöglicht eine Homodimerisierung und stellt die Bindung zu Cullin 3 (Cul3) da, einem Protein des E3 Ubiquitinligasekomplexes. Mittels DGR entsteht eine Bindung zur Neh2-Untereinheit des Nrf2 (82). Keap1 fungiert als Adapterprotein zwischen Nrf2 und Cul3. Diese Bindung führt dazu, dass Nrf2 sehr schnell durch das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut wird (89). Keap1 dient als Sensor für oxidativen Stress in der Zelle: kommt es zu einem Überschuss an ROS oder Elektrophilen, gehen diese mit den Cysteinresten der IVR-Domäne Bindungen ein, die die dreidimensionale Struktur von Keap1 verändern, eine Freisetzung von Nrf2 herbeiführen und somit eine Translokation des Transkriptionsfaktors in den Nukleus ermöglichen (90). In verschiedenen *Reviews* (82; 91) sind zahlreiche weitere Mechanismen zur Aktivierung von Nrf2 beschrieben, diese benötigen aber noch weitere Untersuchungen.

Als *basic leucine zipper* Transkriptionsfaktor muss Nrf2 ein Dimer bilden, um die Transkription von Zielgenen herbeizuführen. Die bekanntesten Dimerisationspartner sind die kleinen Maf-Proteine Maf F, G, K und T (92; 82), wobei MafK eine hemmende Wirkung hat (93). Auch das *jun proto-oncogene* (c-jun) (94) und der *Activating Transcription Factor 4* (ATF4) (92) können mit Nrf2 ein Heterodimer bilden.

Alle Nrf2-Zielgene enthalten in ihrer Promotorregion das *Antioxidant Response Element* (ARE), auch als *Electrophile Response Element* (EpRE) bekannt (87). Zu den Zielgenen gehören direkte Antioxidantien, Phase-II-detoxifizierende und weitere zytoprotektive Enzyme (95; 80; 81; 96; 82).

1.7 Interaktionen zwischen ER-Stress, Entzündung und oxidativem Stress

Es gibt eine zunehmende Evidenz, dass Signalwege von ER-Stress und Entzündung über verschiedene Mechanismen miteinander verbunden sind. Diese beinhalten die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER, die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und der JUN N-terminalen Kinase (JNK), sowie die Induktion einer Akute-Phase-Antwort (97). ER-Stress induzierte Entzündung

dient in erster Linie dazu, Gewebeschäden zu minimieren und die Regeneration des geschädigten Gewebes zu fördern (98).

Die Proteinfaltung im ER ist ein Prozess, bei dem vermehrt Sauerstoffradikale (ROS) entstehen. Kommt es zu gesteigerten Proteinfaltungsprozessen im ER, wie es bei ER-Stress der Fall ist, bewirkt dies auch eine Ansammlung von Sauerstoffradikalen und somit oxidativen Stress (97). Eine Aktivierung der UPR führt außerdem zu einer Induktion der antioxidativen Abwehr, in dem PERK den Transkriptionsfaktor Nrf2 aktiviert und dessen Translokation in den Nukleus einleitet (99). Das ebenfalls von PERK abhängige ATF4 kann ein Heterodimer mit Nrf2 bilden und gemeinsam mit dem Transkriptionsfaktor die Expression von Nrf2-Zielgenen induzieren (100).

Induzieren ROS auf der einen Seite den Ablauf der Nrf2-Signalkaskade, können sie auf der anderen Seite auch eine Entzündungsantwort über die Aktivierung von NF- κ B auslösen (32). Eine Aktivierung von NF- κ B infolge von ER-Stress scheint zusätzlich über andere Wege stattzufinden, wie über die PERK- und IRE1-Signalwege (97; 101). Der PERK-eIF2 α Signalweg bewirkt eine allgemeine Hemmung der Proteinsynthese. Da das inhibitorische I- κ B β an das NF- κ B im inaktiven Zustand gebunden ist eine kürzere Halbwertszeit als NF- κ B hat, kommt es durch die UPR zu einer Verschiebung des Verhältnisses I- κ B β :NF- κ B, was zu einer Freisetzung des Transkriptionsfaktors führt. Über IRE1 α kann NF- κ B ebenfalls aktiviert werden: IRE1 α bildet mit TRAF2 einen Komplex, der die I- κ B Kinase (IKK) rekrutiert: diese phosphoryliert die I- κ Bs und bewirkt dadurch eine Degradation der inhibitorischen Proteine (97; 101).

Auch das angeborene Immunsystem kann durch ER-Stress aktiviert werden und zu einer Entzündungsreaktion führen. Über die Aktivierung von NF- κ B stimuliert ER-Stress die Bildung von Pro-IL-1 β , ein Substrat des NLRP3-Inflammasoms (102). Durch eine IRE1 α -abhängigen Induktion des ROS-sensitiven NLRP3-Liganden *thioredoxin (TRX)-interacting protein* TXNIP kann ER-Stress ebenfalls eine Aktivierung des Inflammasoms bewirken (102; 103).

1.8 Vitamin-D-Stoffwechsel

Vitamin D ist bekannt für den Einfluss auf die extrazelluläre Kalziumhomöostase und die Knochenmineralisierung.

Klassische Zielorgane für Vitamin-D-Metabolite sind der Darm, die Knochen, die Nebenschilddrüse und die Nieren. Im Dünndarm ist Vitamin D essentiell für die Resorption von Kalzium und Phosphat, in den Knochen für eine ausreichende Mineralisierung. Vitamin-D-Mangel führt bei heranwachsenden Organismen zu Rachitis, bei Adulten zu Osteomalazie. Durch Vitamin D kommt es in der Nebenschilddrüse zu einer Hemmung der Parathormonsynthese und des parathyroiden Zellwachstums, weswegen ein Vitamin-D-Mangel zu einer Nebenschilddrüsenhyperplasie und einer vermehrten PTH-Ausschüttung führt. Die Niere ist vor allem als Zielorgan wichtig, um die Homöostase des Vitamin D selbst zu regulieren (104).

Vitamin D ist ein Überbegriff für verschiedene D-Vitamine. Die größte physiologische Bedeutung hat Vitamin D₃.

Das Vitamin D₃ kann entweder aus der Nahrung gewonnen oder durch UV-Strahlung aus 7,8-Dehydrocholesterol über die Zwischenstufe Prävitamin D₃ synthetisiert werden. Die Bioaktivierung des Vitamin D₃ (Cholecalciferol), das heute eher als ein Prohormon gesehen wird, erfolgt in zwei Stufen. Der erste Schritt findet in der Leber statt, wo durch Hydroxylierung das 25-Hydroxyvitamin D₃ entsteht. Vorwiegend in den Nieren folgt eine weitere Hydroxylierung, die zur Entstehung von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ führt. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃, auch Calcitriol genannt, ist ein Steroidhormon und letztlich das biologisch aktive Vitamin D₃ (104).

Der Transport zu den verschiedenen Organen erfolgt aufgrund der lipophilen Struktur der Vitamin-D-Metabolite an Proteine gebunden (104). Das wichtigste dieser Transportproteine ist das *vitamin D binding protein* (DBP), gefolgt von Albumin und Lipoproteinen (105).

Sowohl an der Aktivierung als auch an der Deaktivierung von Calcitriol sind mehrere Enzyme beteiligt, die alle zu den Cytochrom P450-enthaltenden Sterolhydroxylasen gehören (106).

Es gibt zahlreiche Vitamin D₃-25-Hydroxylasen, wobei die physiologisch relevanteste wahrscheinlich CYP2R1 ist. Es wurde gezeigt, dass CYP2R1 hauptsächlich in Leber- und Hodengewebe exprimiert wird und dass es in der Lage ist sowohl Vitamin D₂ als auch Vitamin D₃ zu hydroxylieren (107).

Die 25-Hydroxyvitamin-D-1 α -Hydroxylase CYP27B1 ist die Hydroxylase, die renal und extrarenal die Entstehung vom biologisch aktiven 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ katalysiert (106). In den Nieren wird die Expression von CYP27B1 durch das Parathormon PTH und den *fibroblast growth factor* FGF23 bei Hypokalzämie und Hypophosphatämie induziert, während eine Hyperkalzämie und eine Hyperphosphatämie dessen Expression hemmen (108; 109). Über den Vitamin-D-Rezeptor VDR hemmt Calcitriol in einem negativen Feedbackmechanismus seine eigene Synthese (106). In extrarenalen Geweben, wie z.B. in Makrophagen, Darm, Prostata und Haut, scheint die Expression von CYP27B1 durch gewebespezifische Faktoren, einschließlich Zytokine, reguliert zu werden (106).

Um in den Zielgeweben seine Wirkung entfalten zu können, benötigt Calcitriol in den meisten Fällen den intrazellulären Vitamin-D Rezeptor (VDR), der zur Subfamilie 1 der Superfamilie der nukleären Rezeptoren gehört (104). VDR ist ein Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor (110). Nach Ligandenbindung an den Rezeptor bildet dieser mit dem Retinoid X Rezeptor (RXR) ein Heterodimer. Der entstandene Komplex bindet an sogenannte *vitamin D responsive elements* (VDRE) in der Promotorregion von 1,25(OH)₂D Zielgenen und es kommt mit Hilfe von Koregulatoren (VDR-interagierenden Nuklearproteinen) zur vermehrten oder verminderten Expression der Zielgene (104).

Der Abbau von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ erfolgt durch die 24-Hydroxylase CYP24A1. Der Abbau des Moleküls erfolgt hauptsächlich in der Niere, allerdings ist die 24-Hydroxylase in allen Zellen exprimiert, die den Vitamin-D-Rezeptor enthalten (111).

1.8.1 Vitamin D und ER-Stress

Wechselwirkungen zwischen dem Vitamin-D-Stoffwechsel und ER-Stress wurden bisher nur wenig erforscht. Es wurde bewiesen, dass sowohl 25-Hydroxyvitamin D₃ als auch 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ ER-Stress in Makrophagen aus Diabetes Typ 2

Patienten hemmen (112; 113). Ebenfalls eine Minderung von ER-Stress bei Zugabe von Calcitriol fand in der Placenta trächtiger Ratten statt (114). In Makrophagen von Mäusen mit einem über die Diät induzierten Vitamin-D-Mangel wurde eine Steigerung von ER-Stress festgestellt (115).

Die Auswirkungen einer Induktion von ER-Stress auf Vitamin-D-Metaboliten wurden bislang nicht untersucht.

1.9 Polyphenole und ihre biologischen Wirkungen

Polyphenole, die zu den sekundären Pflanzenstoffen gehören, sind aromatische Verbindungen, die zwei oder mehr direkt an einen aromatischen Ring gebundene Hydroxygruppen enthalten. Einige Polyphenole sind bekannt für ihre gesundheitsfördernde Wirkung und in verschiedenen Früchten, Gemüsesorten und Gewürzen enthalten.

Zu den biologischen Eigenschaften einiger Polyphenole gehören antioxidative, kardioprotektive, tumorsuppressive, antiinflammatorische und antimikrobielle Wirkungen (116).

Einige Studien haben gezeigt, dass zusätzlich zu den oben genannten Wirkungen, Polyphenole ebenso dem ER-Stress entgegenwirken können. So wurde ER-Stress in den humanen Hepatokarzinomzellen HepG2, den humanen Neuroblastomzellen SH-SY5Y oder im Muskelgewebe von Mäusen durch Polyphenole wie das in Oliven enthaltene Hydroxytyrosol, Curcumin aus *curcuma longa* oder Verbindungen aus Granatapfel und grünem Tee gehemmt (117; 118; 119).

1.10 Zielsetzung der Arbeit

Aufgrund einer negativen Energiebilanz ist die Zeitspanne um die Geburt einer der kritischsten Zeiträume im Leben einer Hochleistungsmilchkuh. Typische pathologische Zustände, die in der Früh lactation auftreten, sind die hepatische Lipidose und die Ketose. Gessner et al. haben gezeigt, dass in der Leber früh lactierender Kühe eine Aktivierung der *unfolded protein response* (UPR) stattfindet (51). Die UPR gilt als etablierter Indikator von Stress des Endoplasmatischen Retikulums (ER-Stress). Es wird vermutet, dass Lebererkrankungen, die in der Früh lactation vorkommen, im Zusammenhang mit ER-Stress stehen. Tiefere Erkenntnisse von ER-Stress beim Rind könnten die Grundlage für eine Verbesserung der Tiergesundheit während der Früh lactation bilden.

Bisher ist wenig über die Auswirkungen von ER-Stress beim Rind bekannt. Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines bovinen Zellmodells, um den Einfluss von ER-Stress auf verschiedene Stoffwechselwege beim Rind zu untersuchen. Dafür eignete sich die kommerziell erhältliche bovine Zelllinie der *Madin-Darby bovine kidney* (MDBK-) Zellen. Es handelt sich dabei um Zellen aus dem distalen Nierentubulus. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den hepatischen Zustand beim Rind in der Früh lactation war aufgrund der unterschiedlichen Organzugehörigkeit eingeschränkt. Die Vorteile der MDBK-Zellen für diese Arbeit waren allerdings vielfältig. Als einzige kommerzielle bovine Zelllinie war eine zuverlässige Reproduzierbarkeit der Versuche gewährleistet. In der Vergangenheit wurde außerdem ER-Stress in MDBK-Zellen nachgewiesen, so dass davon auszugehen war, dass sich die Zelllinie für die geplanten Experimente gut eignete. Letzlich bestand so die Möglichkeit renale Stoffwechselwege ebenfalls zu untersuchen.

Als ER-Stressoren dienten die dafür etablierten Substanzen Tunicamycin und Thapsigargin. Alle Untersuchungen erfolgten mit beiden Stoffen, um eventuelle Effekte unabhängig von der auslösenden Substanz interpretieren zu können.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob eine Induktion von ER-Stress durch die Substanzen Tunicamycin und Thapsigargin stattfinden würde. Nachdem eine Aktivierung der UPR auf mehreren Ebenen bestätigt wurde, folgte die Untersuchung verschiedener Stoffwechselwege im Zusammenhang mit der aktivierten

UPR. Von besonderem Interesse waren der Lipidstoffwechsel, inflammatorische und antioxidative Prozesse, der Vitamin-D-Stoffwechsel und einige renale Transportmechanismen. Der Lipidstoffwechsel sowie inflammatorische und antioxidative Prozesse wurden im Zusammenhang mit ER-Stress bei anderen Tierarten (Mensch, Maus, Ratte) häufig untersucht. Mit dieser Arbeit sollten Auswirkungen von ER-Stress auf diese Stoffwechselwege erstmals beim Rind dargestellt werden. Da es sich bei den MDBK-Zellen um Tubuluszellen aus der Rinderniere handelt, sollten Auswirkungen von ER-Stress auf nierenspezifische Stoffwechselwege (renalere Vitamin-D-Stoffwechsel und renale Transporter) ebenfalls untersucht werden.

Im zweiten Teil der Arbeit nahm der Vitamin-D-Stoffwechsel eine besondere Stellung ein. In diesem Abschnitt konnten auch erste Zusammenhänge zwischen Ergebnissen aus *in-vitro*-Versuchen und *in-vivo*-Laktationsversuchen dargestellt werden. Niere und Leber sind zentrale Organe im Vitamin-D-Stoffwechsel. Enzyme und Metaboliten aus diesem Stoffwechsel wurden unter verschiedenen Einflüssen, wie ER-Stress, Laktation und polyphenolhaltiger Fütterung untersucht. In diesem Abschnitt der Arbeit fand sowohl Probenmaterial aus den oben beschriebenen Zellversuchen, als auch solches aus *in-vivo* Studien mit Milchkühen (120; 121) Verwendung.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

| Chemikalie | Hersteller |
|---|--------------------------------------|
| 2-Propanol ROTISOLV® HPLC (Isopropanol) | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| 5-fach Green GoTaq® Flexi Buffer | Promega GmbH, Mannheim |
| 5-fach Puffer (cDNA Synthese) | Fermentas GmbH, St. Leon-Rot |
| APS | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Bicinchoninsäure Assay Reagent A / BC Assay Protein Quantitation Kit | Uptima Interchim, Frankreich |
| Bovine 1,25-Dihydroxyvitamin D3(1,25 DHVD3) ELISA kit | Cusabio Life Science, USA |
| Broad Range Protein Molecular Weight Markers | Promega GmbH, Mannheim |
| Chloroform | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| DEPC | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| DMSO Hybri Max | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| dNTPs (DNA Polymerisation Mix 10 nM / dNTP) | GeneCraft, Lüdinghausen |
| ECL Advance Western Blotting Detection Kit | GE Healthcare Europe GmbH, München |
| ECL Plus Western Blotting Detection Reagent | GE Healthcare Europe GmbH, München |
| Ethylendiamintetraessigsäure | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Essigsäure | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Ethanol | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Fetales Kälberserum (FKS) | GIBCO, Life Technologies, Darmstadt |
| GelRed™ NucleicAcid Gel Stain | Biotium, USA |
| GeneRuler™ 100 bp DNA-Leiter | Fermentas GmbH, St. Leon-Rot |
| Gentamicin | GIBCO, Invitrogen GmbH, Darmstadt |
| Glycin, analytical grade | SERVA GmbH, Heidelberg |
| Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) | Biochrom, Berlin |
| HyClone™ MEM/EBSS (2.0mM L-Glutamin) | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |

| | |
|--|--|
| KAPA™ SYBR® FAST QPCR MasterMix for Bio- Rad iCycler™ | PEQLAB GmbH, Erlangen |
| MassChrom® 25-OH-Vitamin D3/D2 in Serum/Plasma - LC-MS/MS | Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH, Gräfelfing |
| Magermilchpulver | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Methanol | VWR, Darmstadt |
| Mykoplasmentest Venor®GeM | Minerva Biolabs, Berlin |
| Natriumchlorid | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Nuclear Extract Kit | Active Motif Europe, Belgien |
| Oligo-dT-18 Primer | Eurofins MWG Operon, Ebersberg |
| PageRuler™ Prestained Protein Ladder | Fermentas GmbH, St. Leon-Rot |
| peqGOLD Universal Agarose | PEQLAB GmbH, Erlangen |
| PhosSTOP® Phosphatase Inhibitor Cocktail | Roche, Mannheim |
| Ponceau S | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| RevertAid™ Reverse Transcriptase, 200 U/μl | Fermentas GmbH, St. Leon-Rot |
| Roti-Load®, Proteinauftragspuffer, reduzierend | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Rotiphorese Gel 40 (Acrylamid) | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| SDS | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| TEMED | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Thapsigargin | Abcam, UK |
| Tris, research grade | SERVA GmbH, Heidelberg |
| TRIzol® Reagent | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| Trypsin/EDTA | GIBCO, Invitrogen GmbH, Darmstadt |
| Tunicamycin | Santa-Cruz Biotechnology, Heidelberg |
| Tween® 20 | SERVA GmbH, Heidelberg |

2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterial

| Geräte und Verbrauchsmaterial | Hersteller |
|--|---------------------------|
| Agilent HPLC 1100 | Agilent Technologies, USA |
| API 2000 Massenspektrometer | Sciex, USA |
| BIO RAD Mini Trans-Blot® Cell, Tank-Blot- System | Bio-Rad, München |
| Bio Trace™ NT, Pure Nitrocellulose Blotting Membrane Blotpapier | Pall Corporation, USA |
| Blotting-Papier Rotilabo® | Carl Roth, Karlsruhe |

Material und Methoden

| | |
|---|---|
| CELLSTAR® Gewebekulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²) | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| CELLSTAR® Gewebekulturplatten (6-, 24- und 96-Well-Format) | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| CELLSTAR® Röhrchen (15 ml, 50 ml) | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| CO2-Inkubator APT.line™ CB 150 | Binder, Tuttlingen |
| Fiber Pads | Bio-Rad, München |
| G:BOX (Lumineszenzsimager) | SYNGENE, Cambridge, UK |
| GeneFlash (UV-Licht-Imager) | SYNGENE, Cambridge, UK |
| Heidolph Duomax 1030 (Schwenker) | Heidolph Instruments, Schwabach |
| Heraeus SEPATECH Megafuge 1.0 | Fisher Scientific GmbH, Schwerte |
| Heraeus® HERAsafe® (Sicherheitswerkbank) | Fisher Scientific GmbH, Langenselbold |
| Heraeus™ Fresco™ 21 Centrifuge | Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold |
| Hoefer SE 250 Mighty Small II | Amersham Biosciences (SF) Corp., USA |
| Kryoröhrchen | Carl Roth, Karlsruhe |
| KS-15 (Rotationsschwenker) | Edmund Bühler GmbH, Hechingen |
| Magnetrührer IKA® RCT Classic | IKA-Werke, Staufen |
| Microplate Reader Infinite® M200 | Tecan, Crailsheim |
| NanoQuant Plate™ | Tecan, Crailsheim |
| Nitrozellulosemembran BioTrace™ NT | Pall, Dreieich |
| Pasterupipetten (ohne Wattestopfen) | Carl Roth, Karlsruhe |
| PCR-Tubes (0,1 ml) | LTF Labortechnik, Wasserburg |
| Primo Vert (Mikroskop) | Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen |
| Rotorgene 2000 | Corbett Research, Mortlake, Australia |
| Rotor-Gene Q | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| Schwenker Duomax 1030 | Heidolph Instruments, Schwabach |
| Spritzenfilter, Filtropur S 0,2 µm | Sarstedt, Nümbrecht |
| Thermocycler TProfessional Basic | Biometra, Göttingen |
| ThermoShaker TS1 | Biometra, Göttingen |
| Vortex-Schüttler REAX 2000 | Heidolph Instruments, Schwabach |
| Wippschüttler | Edmund Bühler, Hechingen |

2.1.3 Puffer und Lösungen

2.1.3.1 Medien für die Zellkultur

| | |
|--------------------------|--|
| Kulturmedium | HyClone Minimum Essential Medium und Earle's Balanced Salt Solution (MEM/EBSS) + 10% fetales Kälberserum (FKS) + 0,05 mg/mL Gentamicin |
| Einfriermedium | Kulturmedium + 5% DMSO |
| Kontrollmedium (TM) | HyClone Minimum Essential Medium und Earle's Balanced Salt Solution (MEM/EBSS) + 10% fetales Kälberserum (FKS) + 0,1% DMSO |
| Behandlungsmedium A (TM) | Kontrollmedium (TM) + 0,1 µg/ml Tunicamycin |
| Behandlungsmedium B (TM) | Kontrollmedium (TM) + 1 µg/ml Tunicamycin |
| Kontrollmedium (TG) | HyClone Minimum Essential Medium und Earle's Balanced Salt Solution (MEM/EBSS) + 10% fetales Kälberserum (FKS) + 0,5% DMSO |
| Behandlungsmedium A (TG) | Kontrollmedium (TG) + 0,1 µM Thapsigargin |
| Behandlungsmedium B (TG) | Kontrollmedium (TG) + 1 µM Thapsigargin |

2.1.3.2 Puffer und Lösungen für DNA-Gelelektrophorese

Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Lösungen mit bidestilliertem Wasser hergestellt.

| | |
|-----------------------|---|
| DEPC-H ₂ O | 0,1% DEPC in bidestilliertem Wasser, für 24 Stunden im Wasserbad (37 °C), dann autoklaviert |
| 50 x TAE-Puffer | 242 g Tris; 57,1 ml konzentrierte Essigsäure, 100 ml EDTA (0,5 M) |
| 1 x TAE-Puffer | 40 ml 50 x TAE-Puffer, 1960 ml bidestilliertes Wasser |

2.1.3.3 Puffer und Lösungen für Proteingewinnung, SDS-PAGE und Western Blot

Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Lösungen mit bidestilliertem Wasser hergestellt.

| | |
|--------------|---|
| PBS (pH 7,4) | 140 mM NaCl; 3 mM KCl; 8 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,8 mM KH ₂ PO ₄ |
| RIPA-Puffer | 50 mM Tris; 150 mM NaCl; 10% Glycerol; 0,1% SDS; 1% Triton x-100; 0,5% Desoxycholat |

| | |
|---|---|
| SDS-Laufpuffer (pH 8,3) | 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 3,5 mM SDS |
| Sammelgelpuffer (pH 6,8 mit HCl einstellen) | 0,5 M Tris |
| Trenngelpuffer (pH 8,8 mit HCl einstellen) | 1,5 M Tris |
| Transferpuffer | 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20% Methanol |
| 5x TBST (pH 7,5) | 50 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,5% Tween 20 |
| Ponceau S | 0,25 g Ponceau S; 500 µl Essigsäure; 46,5 ml bidestilliertes Wasser |
| Blockingpuffer | 1x TBST; 5% Milchpulver; |
| APS | 0,1 g APS; 900 µl bidestilliertes Wasser |
| SDS (10%ig) | 1g SDS; 10 ml bidestilliertes Wasser |

2.1.4 Zelllinie

Die *Madin-Darby bovine kidney* (MDBK) Zelllinie ist eine kommerziell erhältliche Rindernierenzelllinie, die in vitro das Verhalten von distalen Tubuluszellen zeigt (122). Die primären Zellen wurden von S. H. Madin und N. B. Darby 1957 aus einem adulten, männlichen Rind gewonnen (123).

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Arbeiten in der Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen an einer sterilen Werkbank (Heraeus® HERAsafe®). Zur Desinfektion der Flächen und Objekte wurde 70%iges Ethanol verwendet.

Wenn nicht anders beschrieben, wurden alle sterilen Lösungen und Medien vor Benutzung auf 37 °C vorgewärmt.

Die *Madin-Darby bovine kidney* (MDBK)-Zellen wurden in *HyClone Minimum Essential Medium* und *Earle's Balanced Salt Solution* (MEM/EBSS) mit 10% fetalem Kälberserum und 0,5 % Gentamicin kultiviert. Die Zellen wurden bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Die verwendeten Zellkulturflaschen hatten eine Bodenfläche von 25, 75 bzw. 175 cm². 25 cm²-Flaschen wurden für eine erste Kultivierung unmittelbar nach dem Auftauen der Zellen verwendet. Die sonstige Kultivierung der Zellen erfolgte in 75 cm²-Flaschen. In 175 cm²-Flaschen wurden die Zellen für eine anschließende Kryokonservierung kultiviert, sowie für Versuche, bei denen eine hohe Zellzahl benötigt wurde.

Für die Versuche wurden 96-, 24- und 6-Wellplatten verwendet.

Zellen aus 96-Wellplatten wurden für den Viabilitätstest (MTT-Test) benutzt. 24-Wellplatten dienten der Gewinnung von Zellen zur Genanalyse mittels quantitativer *realtime* PCR und von Zellüberstand zur quantitativen Bestimmung von Vitamin D₃ mittels ELISA. Aus 6-Wellplatten wurden Zellen für die Proteinanalyse mittels Western Blot gewonnen.

Das Medium für die Inkubationsversuche mit Tunicamycin und Thapsigargin enthielt kein Gentamicin. Es bestand aus MEM/EBSS, 10% FKS und 0,1% bzw. 0,5% DMSO. Dieses Medium entsprach dem Kontrollmedium und wurde für die Behandlung nach Bedarf mit Tunicamycin bzw. Thapsigargin in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt.

2.2.1.2 Mykoplasmentest

In regelmäßigen Abständen wurden die Zellen auf Kontamination mit Mykoplasmen mittels Venor®GeM Mykoplasmentest (Minerva Biolabs) nach Herstellerangaben überprüft.

2.2.1.3 Zellen auftauen

Um die in flüssigen Stickstoff konservierten Zellen in Kultur zu bringen wurde der Inhalt eines Kryotubes im Wasserbad aufgetaut und mit vorgewärmtem Kulturmedium in eine 25 cm²-Zellkulturflasche gegeben.

Das Medium wurde am folgenden Tag gewechselt.

Bei einer Konfluenz von 70% wurden die Zellen passagiert (siehe Kapitel 2.2.1.4) und in 75 cm²-Zellkulturflaschen weiter kultiviert.

2.2.1.4 Passagieren und Aussäen

Die MDBK-Zellen wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen kultiviert und bei einer Konfluenz von 70%, alle drei bis vier Tage, passagiert.

Die im Folgenden genannten Medien und Lösungen wurden vor Beginn des Passagiervorgangs in einem Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt.

Das verbrauchte Kulturmedium (MEM/EBSS + 10% FKS + 0,5% Gentamicin) wurde abgesaugt und der Zellrasen mit *Hank's Salt Solution* gewaschen. Anschließend wurden die adhärent wachsenden Zellen mittels Trypsin/EDTA 0,05% vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Dafür wurde eine fünfminütige Inkubation bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchte benötigt. Um den Trypsinvorgang zu stoppen wurde anschließend frisches Kulturmedium hinzugefügt. Die Zellsuspension wurde bei 170 g 3 Minuten lang zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes und Zugabe frischen Mediums wurde die Zellzahl mittels einer Neubauer Zählkammer nach der folgenden Formel bestimmt:

$$Z = z * 10^4 * V$$

Z = Zellzahl gesamt

z = Zellzahl in 0,1 µl

V = Verdünnungsfaktor

Die gewünschte Zellzahl betrug $2,5 \cdot 10^5$ für 75 cm² Zellkulturflaschen; $5,0 \cdot 10^5$ für 175 cm² Zellkulturflaschen, sowie jeweils pro Vertiefung $1,3 \cdot 10^4$ für 96-Wellplatten; $7,0 \cdot 10^4$ für 24-Wellplatten und $2,0 \cdot 10^5$ für 6-Well-Platten.

2.2.1.5 Zellen einfrieren

Für die Kryokonservierung wurden die Zellen in 175 cm² Flaschen kultiviert.

Die MDBK Zellen wurden nach den in Kapitel 2.2.1.4 beschriebenen Methoden in Suspension gebracht und gezählt.

Eine Zellsuspension mit $1,5 \cdot 10^6$ Zellen pro 1,5 ml Medium wurde hergestellt und in 1,5 ml Kryotubes gegeben. In jedes Kryotube wurden 5% DMSO hinzugefügt. Anschließend wurden die Gefäße eine Stunde lang bei -20 °C und danach bei -80 °C über Nacht eingefroren.

Ab dem folgenden Tag wurden die Kryotubes in flüssigem Stickstoff (-196 °C) gelagert. Eine Woche nach der Kryokonservierung wurde der Erfolg überprüft, indem die Zellen aus einem Kryotube in einer 25 cm² Flasche kultiviert wurden.

2.2.2 MTT-Test

Zur Ermittlung geeigneter Konzentrationen der Testsubstanzen Tunicamycin und Thapsigargin wurde ein Viabilitätstest durchgeführt.

Der Test beruht auf der Reduktion des Tetrazoliumsalses 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-tetrazoliumbromid (MTT) zu Formazankristallen.

Aufgrund des verwendeten Tetrazoliumsalses wird diese Vitalitätsprüfung auch MTT-Test genannt.

Das wasserlösliche, gelbgefärbte MTT wird intrazellulär von lebenden, aktiven Zellen zum wasserunlöslichen, blaugefärbten Formazan reduziert (124). An der MTT-Reduktion beteiligte Enzyme sind NAD(P)H-abhängige Enzyme des Endoplasmatischen Retikulums sowie die Succinatdehydrogenase der Mitochondrien (125). Eine Schädigung der Zellen führt zu einer reduzierten Formazanbildung. Bei toten Zellen findet keine MTT-Reduktion statt (124).

Für den MTT-Test wurde nach Trypsinierung und Zählung der MDBK-Zellen eine 96-Wellplatte mit $1,3 \cdot 10^4$ Zellen in 0,2 ml Kulturmedium pro Well ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Am folgenden Tag wurde kurz vor der Behandlung der Zellen eine Verdünnungsreihe der zu testenden Substanz, Tunicamycin bzw. Thapsigargin, hergestellt. Beide Substanzen waren in DMSO gelöst, zu einer Endkonzentration von 5 mg/ml Tunicamycin und 1 mM Thapsigargin. Die Verdünnungsreihe wurde so hergestellt, dass der Anteil an DMSO in allen Lösungen gleich war. Dieser betrug 0,1% für die Tunicamycin- und 0,5% für die Thapsigarginlösungen. Das Kontrollmedium bestand für Tunicamycin aus MEM/EBSS, 10% FKS und 0,1% DMSO; für Thapsigargin aus MEM/EBSS, 10% FKS und 0,5% DMSO.

Tunicamycin wurde in folgenden Konzentrationen getestet: 0,01 µg/ml, 0,05 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml und 5 µg/ml. Die getesteten Konzentrationen von Thapsigargin waren 0,01 µM, 0,05 µM, 0,1 µM, 0,5 µM, 1 µM und 5 µM.

Bei einer Konfluenz von 70% wurde aus der 96-Wellplatte das alte Medium abgesaugt und die oben genannten Lösungen auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden anschließend 24 Stunden inkubiert.

Eine MTT-Lösung aus MTT in Pulverform und sterilem 1 x PBS wurde hergestellt, zu einer MTT-Endkonzentration von 1 mg/ml.

Nach der 24-stündigen Inkubation wurde das Medium abgesaugt und in jede Vertiefung wurden 100 µl der MTT-Lösung pipettiert. Im Anschluss wurde die Platte 4 Stunden lang inkubiert. Danach wurde die von gelb zu grün-blau verfärbte Lösung abgesaugt und 200 µl sterilfiltriertes Isopropanol mit 0,04 N HCl hinzugegeben. Auf einem horizontalen Schüttler wurde die Platte 15 Minuten lang bei 50 Bewegungen pro Minute geschüttelt.

Bei einer Wellenlänge von 450 nm mit Mehrfachmessungen pro Well (4x4, circle) wurde die optische Dichte am TECAN Infinite® M200 gemessen und mit Microsoft Excel ausgewertet.

2.2.3 In-vitro Inkubationsversuche mit Tunicamycin

Die MDBK Zellen wurden 24 Stunden mit Tunicamycin inkubiert.

Als Kontrolle diente das sogenannte Kontrollmedium (TM), bestehend aus MEM/EBSS, 10% FKS und 0,1% DMSO.

Es wurden zwei Behandlungsmedien hergestellt. Im Behandlungsmedium A (TM) lag Tunicamycin in einer Konzentration von 0,1 µg/ml vor, im Behandlungsmedium B (TM) betrug die Tunicamycinkonzentration 1 µg/ml.

Für die Genanalyse wurden 24-Wellplatten mit $7,0 \cdot 10^4$ Zellen in 0,5 ml Kulturmedium pro Vertiefung ausgesät und inkubiert. Bei einer Konfluenz von 70% wurden die Zellen mit Kontrollmedium, Behandlungsmedium A (TM) bzw. Behandlungsmedium B (TM) versetzt. 24 Stunden nach der Behandlung wurden die Vertiefungen der Platte mit 1 x PBS gewaschen und bei -80 °C bis zur nachfolgenden RNA-Isolierung gelagert.

Für den ELISA-Test wurden die MDBK-Zellen ebenfalls nach den selben Versuchsbedingungen in 24-Wellplatten ausgesät. 24 Stunden nach Behandlung wurde der Zellüberstand gewonnen, bei 200 g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert und bei -80 °C aufbewahrt.

Für die Proteingewinnung wurden 6-Wellplatten mit $2,0 \cdot 10^5$ Zellen in 2 ml Kulturmedium pro Vertiefung ausgesät. Bei einer Konfluenz von 70% wurden die Zellen mit Kontrollmedium und Behandlungsmedium B (TM) versetzt. 24 Stunden nach Behandlung konnte aus den 6-Wellplatten Gesamtprotein oder dessen zytoplasmatische bzw. nukleäre Fraktion gewonnen werden.

Alle Versuche wurden drei Mal mit unterschiedlichen Passagen durchgeführt.

2.2.4 In-vitro Inkubationsversuche mit Thapsigargin

Der Aufbau des Versuchs mit Thapsigargin ähnelte dem in Kapitel 2.2.3 beschriebenen Versuch.

Die Zellen wurden 24 Stunden lang mit Thapsigargin bzw. dem Kontrollmedium inkubiert. Das Kontrollmedium (TG) bestand aus MEM/EBSS + 10% FKS + 0,5% DMSO. Es wurden zwei Behandlungsmedien hergestellt: die Thapsigarginkonzentration in Behandlungsmedium A (TG) betrug 0,1 µM, in Behandlungsmedium B (TG) 1 µM.

Für die RTD-PCR und den ELISA-Test wurden die Zellen mit Thapsigargin in beiden Konzentrationen behandelt, für den Western Blot wurden die Zellen mit 1 µM Thapsigargin behandelt. Die Zellkulturarbeit erfolgte wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben.

Alle Versuche wurden drei Mal mit unterschiedlichen Passagen durchgeführt.

2.2.5 In-vivo Milchviehlaktationsversuch

Um Zusammenhänge zwischen ER-Stress, Laktation und Vitamin-D-Stoffwechsel beim Rind näher zu untersuchen wurden in der vorliegenden Arbeit Vitamin-D-Enzyme und -Metaboliten in Leber- und Plasmaproben von Milchkühen untersucht. Das für die vorliegende Arbeit verwendete Probenmaterial stammt aus einem Milchkuhversuch, mit dem gezeigt wurde, dass im Lebergewebe frühlaktierender Kühe eine Aktivierung der UPR stattgefunden hatte (51).

Der in-vivo Versuch wurde an der Versuchsstation für Tierernährung (Staatsgut Hirschau) der Technischen Universität München durchgeführt (Az.: 55.2-1-54-2531-78-09). Initial wurde bei dem Versuch die Wirkung von pansengeschützten konjugierten Linolsäuren (CLA) auf verschiedene Fleischqualitätsparameter sowie auf den hepatischen Lipidstoffwechsel beim Rind während Trächtigkeit und Laktation untersucht (126). Weitere Untersuchungen, wie u.a. der oben zitierte Nachweis von ER-Stress-Genen, wurden mit der Kontrollgruppe durchgeführt, also mit der Gruppe, der keine CLAs zugefüttert wurden. In der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls ausschließlich Proben aus der Kontrollgruppe verwendet, da der Zeitverlauf unabhängig von der Fütterung im Fokus der Untersuchungen stand. Versuchstiere waren 20 weibliche Holsteinrinder (4 Färsen und 16 Kühe) in einem Zeitraum, der von drei Wochen *ante partum* bis zu 14 Wochen *post partum* ging. Die Haltung und die Fütterung der Tiere sowie die Beschreibung der angewandten Methoden ist in der entsprechenden Veröffentlichung von Gessner et al. detailliert beschrieben (51).

3 Wochen *ante partum* ($20,4 \pm 5,8$ Tage) und 1, 5 und 14 Wochen *post partum* ($3,8 \pm 1,4$, $31,5 \pm 2,1$ und $94,9 \pm 2,9$ Tage *post partum*) wurden Leberbiopsien entnommen und Blutproben gewonnen.

Aus den Leberbiopsien wurde RNA isoliert, cDNA synthetisiert sowie die relative mRNA-Konzentration der Referenzgene gemessen. Die bei -20 °C gelagerte cDNA wurde in dieser Arbeit verwendet, um die relative mRNA-Konzentration des Enzyms Vitamin-D-25-Hydroxylase (CYP2R1) zu messen. Aus den Blutproben wurde Plasma isoliert und bei -80 °C gelagert. Mittels Massenspektrometrie wurde dort die Konzentration von 25-Hydroxyvitamin D₂ und 25-Hydroxyvitamin D₃ bestimmt.

2.2.6 In-vivo Fütterungsversuche mit Rindern in der Frühaktation

Das Probenmaterial stammt aus zwei in-vivo Versuchen mit Milchkühen, die an der Lehr- und Versuchsanstalt Hofgut Neumühle in Rheinland-Pfalz durchgeführt wurden (23 177-07/G 12 20-074).

Die Studien, aus denen das Probenmaterial für die vorliegende Arbeit stammt, gingen der Hypothese nach, dass eine Zufütterung von polyphenolhaltigen Produkten im peripartalen Zeitraum und in der Frühaktation zu einer verminderten Expression von ER-Stress-Genen beim Rind führen würde. Durch die Analyse der hepatischen Vitamin-D-25-Hydroxylase sollte mit der vorliegenden Arbeit ein möglicher Zusammenhang zwischen Vitamin-D-Stoffwechsel, Laktation, ER-Stress und die Wirkung von Polyphenolen näher untersucht werden.

Versuchstiere aus dem ersten Versuch waren 27 weibliche Holsteinrinder (8 Färsen und 19 Kühe). Die Tiere wurden in zwei Gruppen aufgeteilt: eine Kontrollgruppe (n=14) und eine zweite Gruppe (n=13), deren Futter im Zeitraum von 3 Wochen *ante partum* bis 9 Wochen *post partum* mit einem polyphenolhaltigen Pflanzenpräparat angereichert war, das aus grünem Tee (95%) und Curcumaextrakt (5%) bestand. Das Pflanzenprodukt war in der Trockenmischration (TMR) in Weizenkleie untergemischt (1% der TMR). Der Kontrollgruppe wurde dieselbe Menge an Weizenkleie ohne Pflanzenpräparat gefüttert. Nähere Details zum Versuchsaufbau sind aus der entsprechenden Publikation von Winkler et al. zu entnehmen (120).

Versuchstiere aus dem zweiten Versuch waren 28 weibliche Holsteinrinder. Auch hier wurden die Tiere in zwei Gruppen aufgeteilt: eine Kontrollgruppe (n=14, davon 4 Färsen und 10 Kühe) und eine zweite Gruppe (n=14, davon ebenfalls 4 Färsen und 10 Kühe), deren Futter im Zeitraum von 3 Wochen *ante partum* bis 9 Wochen *post partum* mit Traubenkern- und Traubentrestereextrakten (GSGME, *grape seed and grape marc meal extract*) angereichert war. Auch hier betrug das in Weizenkleie untergemischte Produkt 1% der TMR, während die Kontrollgruppe die gleiche Menge Weizenkleie bekam. In der Veröffentlichung von Gessner et al. sind weitere Details zum Versuchsaufbau beschrieben (121).

Eine Woche und drei Wochen *post partum* wurden aus den Tieren beider Versuche Leberbiopsien entnommen. Daraus wurden wie in einer vorherigen Studie RNA extrahiert und cDNA synthetisiert (127) und mittels RTD-PCR die Referenzgene gemessen (121; 120).

Die bei -20 °C aufbewahrte cDNA beider Versuche wurde in dieser Arbeit für die Ermittlung der relativen mRNA-Konzentrationen der Vitamin-D-25-Hydroxylase (CYP2R1) verwendet.

2.2.7 Gewinnung des Gesamtproteins

Im Anschluss an die Inkubationsversuche mit Tunicamycin und Thapsigargin in 6-Well-Platten (siehe Kapitel 2.2.3 und 2.2.4), wurde das Gesamtprotein gewonnen. Dafür wurden die Zellen mit vorgekühltem 1 x PBS gewaschen und mittels Zellschaber und 1 x PBS von der Platte gelöst. Die abgelösten Zellen dreier Vertiefungen einer Platte wurden je in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß zusammengeführt.

Die Zellen wurden 5 Minuten lang bei 350 g und 4 °C zentrifugiert. Das dabei entstandene Zellpellet wurde mit 30 µl RIPA-Puffer gelöst. Um der Aktivität von Proteasen und Phosphatasen entgegenzuwirken wurden Proteaseinhibitoren (PIC, Protease Inhibitor Cocktail, zu 1:100 verdünnt) und Phosphataseinhibitoren (eine Tablette PhosSTOP® in 10 ml RIPA-Puffer) hinzugegeben. Diese Lösung wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert und alle 10 Minuten gevortext. Anschließend wurden die Proben 15 Minuten lang bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert.

Der Überstand, also das isolierte Gesamtprotein, wurde in neue vorgekühlte Eppendorf Gefäße überführt und bei -80 °C gelagert.

2.2.8 Proteingewinnung mit dem *Nuclear Extract Kit*

Aus 6-Well-Platten wurde Protein mit dem *Nuclear Extract Kit* nach Angaben des Herstellers gewonnen. Auch hier wurden jeweils 3 Wells einer Platte zusammengeführt. Zur Gewinnung der zytoplasmatischen Fraktion wurde das Zellpellet mit 70 µl *hypotonic buffer* resuspendiert und bei 17.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand, also die zytoplasmatische Fraktion, wurde in vorgekühlte Eppendorf Gefäße überführt und bei -80 °C aufbewahrt.

Das verbleibende Pellet wurde mit 15 µl *Complete Lysis Buffer* resuspendiert und ebenfalls bei 17.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand, also die nukleäre Fraktion, wurde in vorgekühlte Eppendorf Gefäße überführt und bei -80 °C aufbewahrt.

Um für die Analysen ausreichendes Protein zu gewinnen, wurden die Volumina der *hypotonic buffer* und *complete lysis buffer* der Zelllinie angepasst.

2.2.9 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration des gewonnenen Proteins wurde mittels *BCA Protein Assay Kit* (Uptima®) bestimmt.

Das Prinzip des Tests beruht auf der Reduktion in alkalischer Lösung von Cu^{2+} -Ionen zu Cu^+ durch die Peptidbindungen der Proteine. Die Cu^+ -Ionen bilden anschließend einen violett gefärbten Komplex mit der Bichinchoninsäure (BCA). Die Komplexbildung ist proportional zum vorhandenen Protein. Die Farbreaktion wird photometrisch gemessen, um eine quantitative Proteinkonzentration zu ermitteln.

Auf eine 96-Well-Platte wurden BSA-Standards (von 0 bis 1000 μg Protein pro ml) als Dreifachbestimmung und die Proben als Doppelbestimmung aufgetragen. Es wurden jeweils 25 μl Probe bzw. BSA-Standard und 200 μl BCA-Reagenz (Lösung A und Lösung B standen im Verhältnis 50:1 zueinander) pipettiert. Die Platte wurde mit Parafilm abgedeckt und 30 Minuten lang bei 37 °C inkubiert.

Anschließend wurde die Proteinkonzentration am TECAN Infinite® M200 bei 562 nm gemessen und mit Microsoft Excel ausgewertet.

2.2.10 SDS-PAGE

Bei der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) handelt es sich um eine Methode, die der Proteinanalyse dient.

Als Basis dient ein diskontinuierliches Gel auf Polyacrylamidbasis, durch das die aufgetragenen Proteine in einem elektrischen Feld wandern und nach ihrer Größe aufgetrennt werden.

Die Proteine werden vor Beginn der Elektrophorese denaturiert und von den negativ geladenen SDS-Molekülen umgeben und gebunden. Somit sind alle Proteine linear und negativ geladen und können in einem elektrischen Feld in Richtung positiver Ladung wandern. Dabei wandern kleinere Proteine schneller als größere.

Für die SDS-PAGE wurden zunächst zwei Gele gegossen: das Sammelgel, das das Sammeln der Proteine unabhängig von ihrer Größe auf einer Ebene ermöglichte,

sowie das Trenngel, in dem die Proteine sich nach ihrer Größe auftrennten. Beide Gele setzten sich aus unterschiedlichen Mengen Acrylamid, Wasser, 10%iges SDS, APS und TEMED zusammen, sowie Sammelgel- bzw. Trenngelpuffer. Für die genaue Zusammensetzung siehe Kapitel 2.1.3.3.

Sammel- und Trenngel wiesen unterschiedliche pH-Werte auf, so dass die Proteine sich an der Grenze zwischen beiden Gelen sammeln konnten. Dies diente dazu, dass die aufgetragenen Proteine unabhängig von ihrer Größe ab derselben Startlinie gleichzeitig durch das Trenngel wandern konnten.

Die Proben mussten zunächst vorbereitet werden. Abhängig von der jeweiligen Proteinkonzentration wurden zu jeder Probe unterschiedliche Volumina an RIPA-Puffer hinzugegeben, um ein Gesamtvolumen von 15 µl und eine Proteinmasse von 15 µg pro Probe zu erreichen. 5 µl Rotiload® wurden anschließend hinzugegeben. Die Proben wurden 5 Minuten lang bei 95 °C im Thermoshaker bei 900 Umdrehungen pro Minute aufgekocht.

Anschließend wurde die SDS-PAGE Apparatur mit SDS-Laufpuffer gefüllt und die Proben in die Geltaschen appliziert. Außerdem wurden rechts und links von den Proben zwei Marker appliziert, die der späteren Auswertung dienen: PageRuler™ Prestained Protein Ladder und Broad Range Protein Molecular Weight Markers.

Die Proben liefen im Sammelgel bei 100 V und 12 mA, im Trenngel bei 200 V und 20 mA.

2.2.11 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode, die es ermöglicht aus dem durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteingemisch ein spezielles Protein nachzuweisen.

Für den Western Blot wurde das Tankblotsystem BIO RAD Mini Trans-Blot® Cell verwendet. Nach Anleitung des Herstellers wurde ein Sandwich zusammengestellt, bestehend aus in Transferpuffer getränkten Fiber Pads (BIO RAD, Mini Trans-Blot®), Blotpapier, Nitrocellulosemembran (Bio Trace™ NT, Pure Nitrocellulose Blotting Membran) und Polyacrylamidgel.

Die Apparatur wurde so zusammengestellt, dass sich die Bestandteile senkrecht zu einem elektrischen Feld befanden und die Proteine von dem Gel in Richtung Anode

auf die Nitrocellulosemembran übertragen werden konnten. Der Transfer erfolgte über die Dauer von 1,5 Stunden bei 100 V und 300 mA.

Um den Erfolg des Transfers zu überprüfen wurden die Proteine mit Ponceau S gefärbt. Dieser Farbstoff wurde anschließend mit 1 x TBST ausgewaschen.

Im Anschluss wurde die Membran mit 5%igem Milchpulver in 1 x TBST bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Schritt diente dazu, die freien Bindungsstellen der Proteine zu blockieren.

Nach einmaligem Waschen mit 1 x TBST wurde der primäre Antikörper des zu detektierenden Proteins auf die Membran gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C.

Am nächsten Tag wurde nach dreimaligem Waschen mit 1 x TBST der sekundäre Antikörper über 1,5 Stunden bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben.

Die Entwicklung der Blots erfolgte mit dem ECL Plus Kit (GE Healthcare) für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Im Kit befand sich ein chemilumineszentes Substrat (Luminol). Luminol wurde durch die Meerrettichperoxidase, also durch das Enzym, das an den sekundären Antikörper gebunden hatte, in seine oxidative Form umgewandelt. Bei dieser Reaktion kam es zu einer Lichtemission, die mittels G:Box (Lumineszenzimager, SYNGENE) und dem Programm Gene Snap (SYNGENE) detektiert und aufgenommen wurde.

Die anschließende Auswertung erfolgte mit dem Programm Gene Tools (SYNGENE).

Tabelle 1: Eigenschaften der verwendeten Antikörper

| Protein | Molekulargewicht (kDa) | Primärer Antikörper | Sekundärer Antikörper | Probe |
|----------------------|-------------------------------|--|---|-------------------|
| ACTB | 43 | Mouse monoclonal anti-β-Aktin (ab6276) ¹ ; 1:10000 | Anti mouse ² ; 1:10000 | Gesamtprotein |
| Phosphorylierte PERK | 170 | Rabbit monoclonal anti-Phospho-PERK (Th980) ³ ; 1:1000 | Anti rabbit ⁴ ; 1:10000 | Gesamtprotein |
| PERK total | 125 | Goat polyclonal anti-PERK (T-19, sc-9477) ⁵ ; 1:1000 | Donkey anti-goat ⁵ ; 1:10000 | Gesamtprotein |
| NF-κB p50 | 50 | Rabbit polyclonal anti-NF-κB p50 (H-119; sc-7178) ⁵ ; 1:200 | Anti rabbit ⁴ ; 1:10000 | Nukleäre Fraktion |

¹ Abcam, England

² Jackson Immuno Research, USA

³ Cell Signaling Technology, USA

⁴ Sigma, USA

⁵ Santa-Cruz Biotechnology, Heidelberg

2.2.12 RNA-Isolierung

Aus den tiefgefrorenen 24-Well Platten (siehe Kapitel 2.2.3 und 2.2.4) wurde RNA isoliert.

Für die Zellyse wurden 150 µl Trizol pro Vertiefung auf die Zellen gegeben. Die Platte wurde anschließend 5 Minuten lang geschwenkt. Der Inhalt der Wells wurde in 1,5 ml Eppendorf Gefäße überführt; dabei wurde der Inhalt je zweier Vertiefungen zusammengeführt. Anschließend wurden 60 µl Chloroform hinzugefügt. Nach kurzem Schwenken und Inkubieren bei Raumtemperatur wurden die Gefäße für 15 Minuten bei 15.000 g pro Minute und 4 °C zentrifugiert.

Für die RNA-Präzipitation wurde zunächst die wässrige Phase in neue Gefäße überführt. 150 µl Isopropanol wurden hinzugegeben und die Zellen 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden sie 10 Minuten lang bei 15.000 g und 4 °C zentrifugiert.

Nachdem der Überstand verworfen wurde, folgte das Waschen der RNA. Dafür wurden in jedes Gefäß 300 µl 75%iges Ethanol auf das Pellet gegeben und der gesamte Inhalt kurz aufgewirbelt. Die Gefäße wurden 5 Minuten lang bei 15.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet trocknen lassen.

Nach Zugabe von je 20 µl DEPC-Wasser wurde die RNA 10 Minuten lang bei 60 °C und 900 rpm im Thermomixer gelöst.

Die isolierte RNA wurde bei -80 °C gelagert.

2.2.13 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Konzentration der gewonnenen RNA wurde mit Hilfe einer NanoQuant plate™ und dem TECAN infinite 200 bestimmt.

Die photometrische Messung erfolgte bei den Wellenlängen 260 und 280 nm. Aus den Absorptionen der zwei Wellenlängen wurde eine *ratio* gebildet, dessen Wert eine Aussage über den Reinheitsgrad der RNA gab. Werte zwischen 1,8 und 2,0 wurden als gut bewertet.

Für die Konzentrationsbestimmung wurden 2 µl der gelösten RNA benötigt.

2.2.14 cDNA-Synthese

Aus 1,2 µg der isolierten einsträngigen RNA wurde komplementäre doppelsträngige cDNA synthetisiert.

Dafür wurden die RNA-Proben mit DEPC-H₂O auf ein Gesamtvolumen von 5 µl verdünnt und anschließend mit 20 µl Mastermix versetzt. Der Mastermix bestand aus 5fach Puffer, dNTPs, Oligo-dTs und reverser Transkriptase. Für die genaue Zusammensetzung siehe Tabelle 2.

Die cDNA-Synthese erfolgte 60 Minuten lang bei 42 °C im Thermocycler. Anschließend wurde die Temperatur 10 Minuten lang auf 70 °C eingestellt und zum Abschluss auf 4 °C heruntergekühlt.

Nach der Synthese wurde die cDNA nochmals mit DEPC-H₂O im Verhältnis 1:2 verdünnt und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 2: Zusammensetzung des cDNA-Synthese-Mastermix

| Mastermixreagenzien | Volumen je Reaktionsansatz (µl) |
|---|---------------------------------|
| DEPC-H ₂ O | 12,45 |
| 5fach Puffer | 5 |
| dNTP (10 mM) | 1,25 |
| OligodT-18 Primer (100 mM) | 1 |
| RevertAid™ Reverse Transkriptase (200 U/µl) | 0,3 |

2.2.15 RTD-PCR

Die *realtime detection* Polymerase-Kettenreaktion (RTD-PCR) ist eine Methode, mit der spezifische Genabschnitte vervielfältigt und detektiert werden können. Es handelt sich dabei um eine Abwandlung der klassischen PCR.

Die PCR ist ein Prozess, der in dreiphasigen Zyklen abläuft. Benötigt werden die zuvor synthetisierte cDNA, die den gewünschten DNA-Abschnitt enthält, spezifische Primer, die sich an die DNA anlagern, eine thermostabile DNA Polymerase, die die Primer verlängert, sowie Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTPs), Mg²⁺-Ionen und Stabilisatoren, die den Verlängerungsvorgang ermöglichen.

Vor dem ersten Zyklus werden durch eine hohe Temperatur die DNA-Doppelstränge zu Einzelsträngen denaturiert.

Die Denaturierung der DNA erfolgt in jedem Zyklus und bildet dessen erste Phase. Es folgt eine Annealingphase, bei der die Primer an die DNA binden. Je nach Größe des Genprodukts ist die optimale Temperatur während dieser Phase unterschiedlich. Die letzte Phase ist die Elongationsphase, bei der die DNA-Polymerase die Primer verlängert und den komplementären DNA-Strang synthetisiert. Die neu gebildeten Doppelstränge, die mit der darauffolgenden Denaturierungsphase wieder voneinander gelöst werden, dienen als Ausgangsmaterial für den folgenden Zyklus. Die PCR ist also eine exponentielle Reaktion.

In der RTD-PCR wird zusätzlich ein Farbstoff in die DNA eingelagert, dessen Fluoreszenz eine Aussage über die Menge der gebildeten Genprodukte ermöglicht. Gemessen wird die Fluoreszenz am Ende jeder Elongationsphase.

Für die RTD-PCR wurde mit KAPA™ SYBR® FAST QPCR MasterMix gearbeitet. Diesem fügte man DEPC-H₂O, Primer *forward* und Primer *reverse* zu einem Gesamtvolumen von 9 µl hinzu. Für die genaue Zusammensetzung des Mix siehe Tabelle 3. Anschließend wurden 2 µl cDNA hinzugefügt. Der Kontrolle dienen bei jeder Messung zwei Proben ohne cDNA-Zusatz (sogenannte NTCs, *No Template Control*).

Tabelle 3: Zusammensetzung des PCR-Mastermix

| Mastermixreagenzien | Volumen je Reaktionsansatz (µl) |
|---------------------------------|--|
| DEPC-H ₂ O | 3,6 |
| Primer (for) | 0,2 |
| Primer (rev) | 0,2 |
| KAPA™ SYBR® FAST QPCR MasterMix | 5 |

Die RTD-PCR erfolgte mit einem Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Deutschland).

Die initiale Denaturierung erfolgte für 3 Minuten bei 95 °C. Danach folgten 25-35 Zyklen, bei denen die drei beschriebenen Phasen sich folgendermaßen wiederholten: die Denaturierungsphase erfolgte für 5 Sekunden bei 95 °C, die Annealingphase für 20 Sekunden bei unterschiedlichen Temperaturen (die Annealingtemperaturen sind aus Tabelle 5 zu entnehmen) und die Amplifikationsphase für 1 Sekunde bei 72 °C. Abschließend wurde eine Schmelzkurve erstellt, in dem die Temperatur von 50 °C auf

95 °C kontinuierlich anstieg. Die relativen mRNA-Konzentrationen wurden als ct-Werte (*cycle threshold*) bei 0,06 mit der Software Rotor-Gene Q (Version 2.0.2) ermittelt. Sechs Referenzgene und die Zielgene wurden gemessen (siehe Tabelle 5). Von den gemessenen Referenzgenen wurden für die Berechnung der Normalisierungsfaktoren (128) mittels GeNorm die drei stabilsten ausgewählt (Tunicamycin: *PPIA*, *RPL12*, *RPS9*; Thapsigargin: *ATP5B*, *RPL12*, *RPS9*), die unter der Tabelle 4 aufgeführt sind.

Tabelle 4: Expressionsstabilitäten (M-Werte) der drei stabilsten Referenzgene in MDBK-Zellen gemäß „GeNorm“

| Behandlung mit Tunicamycin | | Behandlung mit Thapsigargin | |
|----------------------------|--------|-----------------------------|--------|
| Gen | M-Wert | Gen | M-Wert |
| <i>PPIA</i> | 0,328 | <i>ATP5B</i> | 0,558 |
| <i>RPL12</i> | 0,300 | <i>RPL12</i> | 0,425 |
| <i>RPS9</i> | 0,277 | <i>RPS9</i> | 0,422 |

Die angegebenen M-Werte sind Mittelwerte aus denen für jede synthetisierte cDNA von GeNorm errechneten M-Werte.

Abkürzungen: *ATP5B* ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide; *PPIA* Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A); *RPL12* ribosomal protein L12; *RPS9* ribosomal protein S9.

Tabelle 5: Eigenschaften der verwendeten Primer

| Gen | Primersequenz | Annealingtemperatur (°C) | Produktgröße (bp) | NCBI Genbank |
|---------------------|-------------------------------|------------------------------|----------------------|----------------|
| Referenzgene | ACTB F: ACTTGCGCAGAAAAACGAGAT | 57 | 120 | AY141970 |
| | R: CACCTTCACCGTTCAGTTT | | | |
| ATP5B | F: GGACTCAGCCCTTCAGCGCC | 65 | 229 | NM_175796.3 |
| | R: GCCTGGTCTCCCTGCCTTGC | | | |
| PPIA | F: GGCAAAATGCTGGCCCCAACACA | 60 | 87 | NM_178320.2 |
| | R: AGTACCACGTGCTTGCCCATCCA | | | |
| RPL12 | F: CACCAGCCGCCCTCCACCCATG | 65 | 84 | NM_205797.1 |
| | R: CGACTTCCCCACCGGTGCAC | | | |
| RPS9 | F: GTGAGGTCTGGAGGGTCAAA | 60 | 108 | BC148016 |
| | R: GGGCATTACCCTTCGAACAGA | | | |
| SDHA | F: GCAGAACCTGATGCTTTGTG | 60 | 185 | NM_174178 |
| | R: CGTAGGAGAGCGTGTGCTT | | | |
| Zielgene | ACACA F: CTCTCCGACAGGTTCAAGC | 60 | 270 | NM_174224.2 |
| | R: AGTCCCCGCACCTCACATAAC | | | |
| ATF4 | F: TGGTCTCAGACAACAGCAAG | 59 | 130 | NM_001034342.2 |
| | R: AGCTCATCTGGCATGGTTTC | | | |

Material und Methoden

| | | | | |
|---------|--|----|-----|----------------|
| ATP1A1 | F: CCTGCCTATCCTGAAGCGGG R: GCTCACCTGCATTGGCGTTC | 61 | 185 | NM_001076798.1 |
| ATP2B1 | F: CATGCATTGCTGTTGTGGGG R: TTTGGTGGCAATAGCCCGAG | 60 | 115 | NM_174696.2 |
| BAX | F: TCTGACGGCAACTTCAACTG R: ATGGTCACTGTCTGCCATGT | 59 | 224 | NM_173894.1 |
| CALB1 | F: TTCGACGCTGACGGAAGTGG R: CTGCTGGCATCGGAAAAGCA | 60 | 222 | NM_001076195.1 |
| CASP3 | F: AGCACCTGGTTACTTTTCCTGG R: CCGAGTAAGAATGTGCATGAGC | 59 | 118 | NM_001077840.1 |
| CAT | F: TGGACCCAACTATCTCCAG R: AAGTGGTCTCTGTGCCAG | 59 | 178 | NM_001035386.2 |
| CAV1 | F: GGAGATAGATCTGGTCAACC R: CTTTGTACAGTGAAGGTGG | 60 | 148 | NM_174004.3 |
| CYP24A1 | F: TGGACGACAAAATCAACGAG R: CTCATACAGCACAAAGGCAGA | 60 | 140 | NM_001191417.1 |
| CYP27B1 | F: TCTCCTGGGCTCTGTATGAA R: TTCACCCACACAAAATGTCTC | 60 | 221 | NM_001192284.1 |
| CYP2R1 | F: CATTGCAACCCAGCCCTAC R: TTGGGGGTGAGGCAAAACAAC | 60 | 90 | NM_001076267.2 |
| DDIT3 | F: AGTCACTGCCTTTCTCCTTC R: TCTTCCTCCTTGTTTCCAGG | 59 | 133 | NM_001078163.1 |
| DNAJC3 | F: GTACGAAAGGTGCTGAATGTG R: ATCAGGGTCACCATCTACTG | 59 | 133 | NM_174756.3 |
| EDEM1 | F: TCGGCTACGACAACTACATG R: GTATCCAACGCATCAACCAG | 59 | 157 | NM_001103092.2 |

Material und Methoden

| | | | | |
|---------|---|----|-----|----------------|
| ELOVL6 | F: TCCGAAGATCAGCCCAGTGA R: GGTGCCGACCACCAAAGACA | 60 | 165 | NM_001102155.1 |
| FASN | F: GCTGAGCCTGATGCGTCTGAGC R: GGATGGCAGTGAGGCTCACGAA | 64 | 138 | NM_001012669.1 |
| G6PD | F: AGCAGCGAAGCACAGAGAGC R: TCGGGCAAAAAGGCCATCTCG | 60 | 211 | NM_001244135.1 |
| GPX3 | F: ACCACCGCACCCACGGTCAAC R: GCCCGTGTGGTGGACTTGGG | 63 | 127 | NM_174077.3 |
| HERPUD1 | F: CCGTGTTCAGTATCCTC R: TCTTGATTCACAGCCTCCTG | 59 | 169 | NM_001102265.2 |
| HMOX1 | F: GATGGTCCTCACACTCAGC R: AACAGTTTTCATGGCCCCCA | 59 | 101 | NM_001014912.1 |
| HSPA5 | F: CAAGTTGATGTTGGAGGTGG R: AAGCCTCAGCAGTTTCCTTC | 59 | 94 | NM_001075148.1 |
| IL1B | F: GCTGCATCCAACACCTGGA R: GGATGCTCCTCAGGTCATC | 63 | 177 | NM_174093.1 |
| IL-6 | F: ACTCCCGCTTCACAAAGCGCCTTC R: AAGTAGTCTGCCCTGGGGTGGTGTC | 61 | 134 | NM_173923.2 |
| INSIG1 | F: TTCTTCTCGGAGGCGTGAC R: CGCGGACTTTCTCCCAAAC | 60 | 191 | NM_001077909.1 |
| INSIG2 | F: GTGTGATCGGTTGTAGCC R: GCTGAGTGACCACAGTTGCC | 60 | 135 | XM_003581843.4 |
| MGST3 | F: GGGCTTGGCCTGGATCGTTGG R: CACAGTGGTGCCCATCAGGCC | 64 | 124 | NM_001035046.2 |
| MT1A | F: ATCCGACCAGTGGATCTGCTTTGCC R: AGACACAGCCCTGGGCACACT | 63 | 209 | NM_001040492.2 |

Material und Methoden

| | | | | |
|--------|--|----|----------------------------------|----------------------------------|
| MT2A | F: GACCCAGCCTCCAGTTCAGCTC R: CTTTGCATTTGCAGGAGCCGGC | 64 | 93 | NM_001075140.1 |
| NQO1 | F: AACCAACAGACCAGCCAATC R: CCTCCCATCCTTTCCCTCTTC | 59 | 146 | NM_001034535.1 |
| PDIA4 | F: AGGTTTGACGTGAGTGGCTA R: CATCGAAGTTGTCCTTGGTC | 59 | 175 | NM_001045879.2 |
| PYCARD | F: GGAAGTCTTGACAGAGGA R: CTTGCAGGTCATATTCAGG | 60 | 110 | NM_174730.2 |
| SAA3 | F: CCTCAAGGAAGCTGGTCAAGGGGCT R: CAGGCACCCCCAGGTCCCCCT | 61 | 141 | NM_181016.3 |
| SCAP | F: GGTCACTTTCCGGGATGGCA R: GTGGTAGCAGCAGGCTAAGAT | 60 | 171 | NM_001101889.1 |
| SLC2A1 | F: GGCTCCCTGCAGTTTGGCTA R: CACAGACAGGGACCAGAGCGG | 61 | 144 | NM_174602.2 |
| SLC3A1 | F: TTCCGTGCTCGTGCTCATTG R: TCTGGTACATGGTCCCTGCC | 60 | 92 | NM_001034633.2 |
| SLC7A8 | F: CTGTTCTTTGCCGGAGCCAG R: CGGTGACAAGCATCAGCAGG | 61 | 127 | NM_001192889.1 |
| SOD1 | F: TGTTGCCATCGTGGATATTG R: CAGCGTTGCCAGTCTTTGTA | 55 | 143 | NM_174615.2 |
| TNF | F: TCTTCTCCACCTCAGTTACC R: GCCCTGAGCCCATAAATTC | 60 | 89 | NM_173966.3 |
| VDR | F: GCATCCAGAAGGTCATCGGC R: CACTCGACTTCAGCAGCAGC | 60 | 90 | NM_001167932.1 |
| XBP1 | F: TGAAGGAGGAAAGCAGAG R: CAATGCCATCAGAGTCCATG | 59 | 129 (spliced) 155 (unspliced) | NM_001271737.1 NM_001034727.3 |

2.2.16 DNA-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Genprodukte wurde eine DNA-Gelelektrophorese durchgeführt. Dafür wurde ein 1,5%iges Agarosegel (2,25 g Agarose in 150 ml 1 x TAE-Puffer) hergestellt und mit 3 µl GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain versetzt. Um das Splicing des Zielgens XBP1 nachzuweisen wurde ein 2%iges Agarosegel hergestellt. Als Laufpuffer diente ebenfalls 1 x TAE-Puffer. Die Genprodukte wurden mit 4 µl Green GoTaq® Flexi Buffer versetzt und in die Geltaschen appliziert. Zum Vergleich wurde mittig eine DNA-Leiter GeneRuler™ 100 bp pipettiert.

Die DNA-Gelelektrophorese erfolgte bei 120 Volt.

Die Genprodukte sowie die DNA-Leiter wurden mittels UV-Fluoreszenz mithilfe des GeneFlash dargestellt.

2.2.17 ELISA

Mittels ELISA wurde die Konzentration von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ im Zellüberstand gemessen.

Das *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) ist ein antikörperbasiertes Verfahren, das mithilfe einer Farbreaktion den Nachweis eines Antigens ermöglicht. In dieser Arbeit wurde ein kompetitives ELISA verwendet. Das Prinzip dieses Verfahrens beruht darauf, dass das zu untersuchende Antigen und ein enzymgekoppeltes Antigen auf eine mit einem speziellen Antikörper vorbeschichtete Platte gegeben werden und um die Antikörperbindungsstellen konkurrieren. Der enzymkonjugierte Stoff, in diesem Fall ein *Horseradish* Peroxidase (HRP) konjugiertes 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Hapten, löst nach weiteren Schritten eine Farbreaktion aus. Da diese Reaktion nach Bindung des zu untersuchenden Antigens ausbleibt ist die Farbintensität umgekehrt proportional zur Antigenkonzentration.

Der Konzentrationsmessung von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ diente der aus 24-Wellplatten gewonnene Zellüberstand (siehe Kapitel 2.2.4 und 2.2.5). Dafür wurde ein ELISA-Kit der Firma Cusabio® (Katalognummer CSB-EQ027278BO) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Der Überstand von MDBK-Zellen, deren Medium mit 1 µg/ml Tunicamycin bzw. 1 µM Thapsigargin versetzt war, wurde untersucht. Als Kontrolle diente der Überstand von Zellen, die mit MEM/EBSS, 10% FKS und 0,5% DMSO inkubiert waren.

2.2.18 Massenspektrometrische Analysen

Mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) kombiniert mit einem Tandem-Massenspektrometer (LC-MS/MS) wurden die Vitamin-D-Metaboliten 25-Hydroxyvitamin D₂ und 25-Hydroxyvitamin D₃ im Plasma laktierender Rinder quantitativ nachgewiesen. Das Plasma stammt aus dem in Kapitel 2.2.6 beschriebenen Milchviellaktationsversuch. Die Messungen fanden im Institut für Agrar und Ernährungswissenschaften der Universität Halle-Wittenberg statt. Für die Versuche wurde das Kit MassChrom® 25-OH-Vitamin D₃/D₂ in Serum/Plasma – LC-MS/MS (Chromsystems) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Außerdem benötigt wurde das HPLC System Agilent 1100 (Agilent Technologies) und der Massenspektrometer API 2000 (Sciex).

Bei der Methode werden verschiedene Massenspektrometereinheiten nacheinandergeschaltet. Dies gewährleistet eine sehr selektive Identifizierung spezieller Analyte aus einem Proteingemisch, in diesem Fall aus Plasma. Die Kopplung mit einer HPLC-Säule ermöglicht eine hohe Reinheit der zu analysierenden Substanzen.

2.2.19 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der *in-vitro* Versuche wurde das Statistikprogramm Minitab (Version 13.0., Minitab Inc., State College, PA, USA) verwendet.

Alle Daten wurden zunächst mit Hilfe des Anderson-Darling-Tests auf Normalverteilung geprüft. Wurde die Kontrolle mit nur einer Behandlung verglichen, wurden die Ergebnisse paarweise mittels *student's t-test* ausgewertet. Gab es zusätzlich zur Kontrolle zwei Behandlungen, wurden sie mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) ausgewertet, auf die ein multipler Mittelwertvergleich mittels *Fisher's test* folgte.

Die Irrtumswahrscheinlichkeit lag bei 5%. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

Die statistische Auswertung der In-vivo Versuche, bei denen mehrere Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten aus demselben Gewebe entnommen wurden, erfolgte mit einem *linear mixed-effects model* mittels R software (Version 3.1.1, R Core Team 2014) (129), durch Verwendung der Pakete lmerTest (130) und lsmeans (131).

In die Statistik der Fütterungsversuche flossen Behandlung, Woche der Probenentnahme, Laktationsnummer (1, 2, 3 oder ≥ 4) und die Interaktion Woche x Behandlung als feste Faktoren und die Tiere als zufällige Faktoren ein.

Bekamen alle Tiere dasselbe Futter flossen Woche der Probenentnahme und Parität der Färsen bzw. Kuh als feste Faktoren und die Tiere als zufällige Faktoren in die Statistik ein.

Die Mittelwerte zu jedem Biopsienentnahmezeitpunkt wurden paarweise miteinander verglichen.

So wie bei den In-vitro Versuchen wurde auch hier ein p-Wert $\leq 0,05$ als statistisch signifikant angesehen.

Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Daten als Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung eines Zellmodells zur Untersuchung des ER-Stresses in der Niere beim Rind

Zur Untersuchung des ER-Stresses in der Rinderniere wurde anhand der MDBK-Zelllinie ein Versuchsmodell etabliert. Dafür wurde zunächst die Zellviabilität unter Einfluss von zwei ER-Stressoren, Tunicamycin und Thapsigargin beurteilt. Da der ER-Stress *per se* bei dem aktuellen Stand der Wissenschaft nicht darstellbar ist, wurde als Hinweis für dessen Auftreten die Aktivierung der UPR erforscht. Demnach wurde untersucht, ob Gene der UPR durch die genannten Stressoren induziert werden konnte. Es folgte schließlich ein Nachweis der UPR-Induktion auf Proteinebene.

3.1.1 Zellviabilität der MDBK-Zellen unter Einfluss von Tunicamycin und Thapsigargin

Um die Zellviabilität der MDBK-Zellen unter Einfluss von Tunicamycin und Thapsigargin zu untersuchen wurde der MTT-Test angewandt. Die Zellen wurden über 24 Stunden mit Tunicamycin und Thapsigargin in steigenden Konzentrationen inkubiert.

Tunicamycin bewirkte einen Abfall der Zellviabilität bis zu durchschnittlich 76 % in der höchsten Konzentration (5 µg/ml), in Relation zur Kontrolle (Abbildung 2). Bei einer Inkubation mit 0,1 und 1 µg/ml Tunicamycin zeigte sich eine durchschnittliche Zellviabilität von respektiv 85 % und 83 %. Mit diesen zwei Konzentrationen wurden die nachfolgenden Zellversuche durchgeführt.

Thapsigargin hatte einen stärkeren Einfluss als Tunicamycin auf die Zellviabilität der MDBK-Zellen (Abbildung 3), besonders in den initialen Konzentrationen. Die mittlere Zellviabilität in den Konzentrationen 0,1 und 1 µM war respektiv 72 % und 68 % der Kontrolle. Die nachfolgenden Zellversuche mit Thapsigargin wurden mit diesen zwei Konzentrationen durchgeführt.

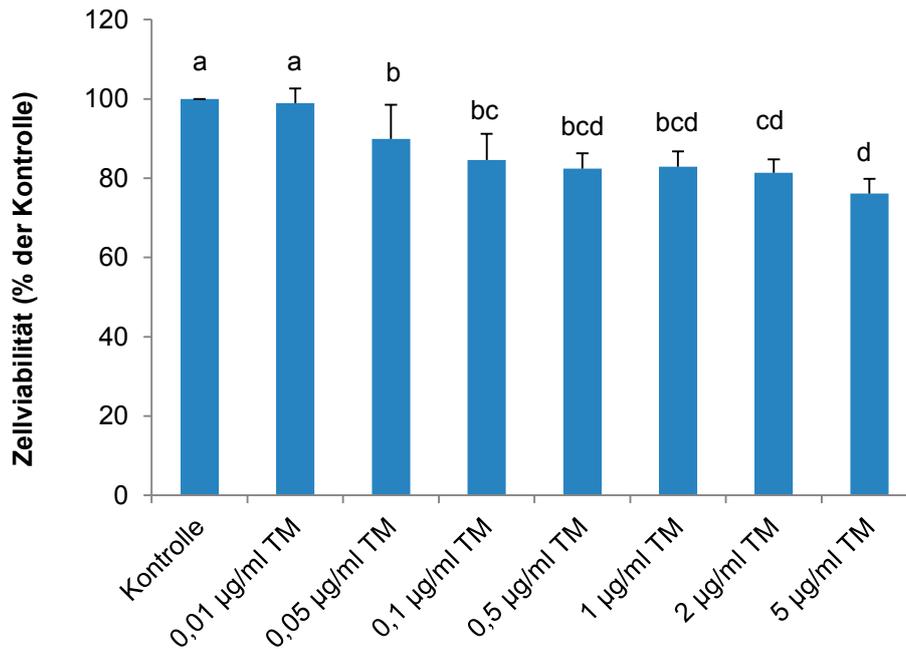


Abbildung 2: MTT-Test: Zellviabilität der MDBK-Zellen unter Einfluss von Tunicamycin. Konzentrationsabhängige Wirkung von Tunicamycin auf die Zellviabilität der MDBK-Zellen nach einer Inkubation mit Tunicamycin für 24 Stunden. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten (n=3). Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). TM = Tunicamycin

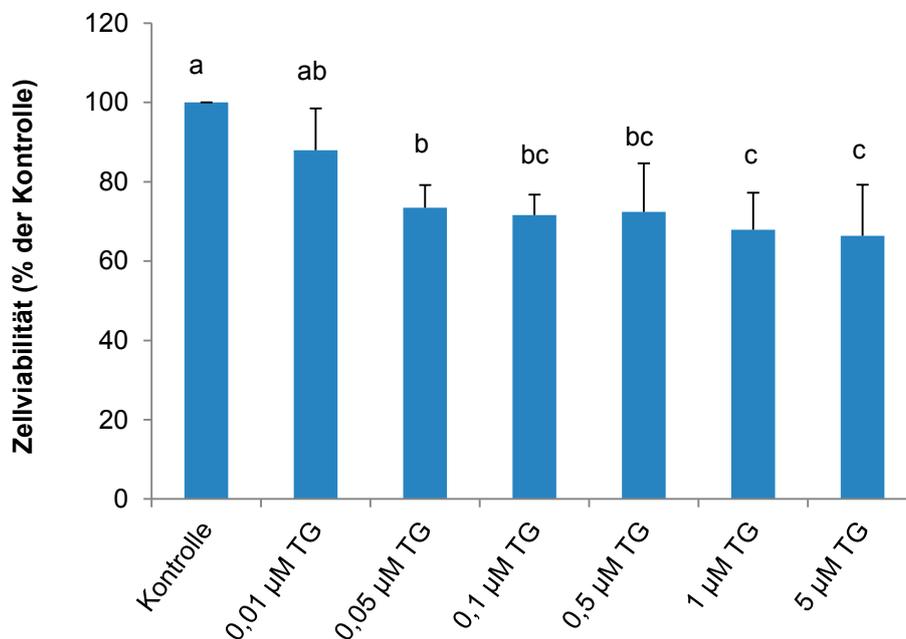


Abbildung 3: MTT-Test. Zellviabilität der MDBK-Zellen unter Einfluss von Thapsigargin. Konzentrationsabhängige Wirkung von Thapsigargin auf die Zellviabilität der MDBK-Zellen nach einer Inkubation mit Thapsigargin für 24 Stunden. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten (n=3). Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). TG = Thapsigargin

3.1.2 Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Gene der UPR

Unter Einfluss von 0,1 und 1 µg/ml Tunicamycin und 0,1 und 1 µM Thapsigargin wurden jeweils 10 Gene der UPR auf mRNA-Ebene untersucht. Dazu zählten die Chaperone BiP (HSPA5) und DNAJC3, die Proteindisulfidomerase PDIA4, Vertreter aus dem PERK-Signalweg (ATF4) und aus dem IRE1-Signalweg (XBP1) und das durch XBP1 induziertes Gen EDEM1; außerdem durch den ATF6-Signalweg induzierte Gene (CASP3, HERPUD1, BAX) und DDIT3 als wichtigster Induktor der Apoptose.

Wurden die Zellen mit Tunicamycin inkubiert, zeigten 9 von 10 Genen einen signifikanten Anstieg der mRNA-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle (Tabelle 6). Der Effekt bei ATF4, HSPA5, CASP3, DDIT3, DNAJC3, HERPUD1, PDIA4 und XBP1 war konzentrationsunabhängig, da bereits bei einer Behandlung mit 0,1 µg/ml Tunicamycin eine Sättigung eingetreten war. Die mRNA-Konzentration von BAX war hingegen erst bei einer Dosis von 1 µg/ml Tunicamycin signifikant höher als die der Kontrolle. EDEM1 wies als einziges der untersuchten ER-Stress Gene keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe auf.

Tabelle 6: Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter ER-Stress Gene unter Einfluss von Tunicamycin.

| Gen | Kontrolle | + Tunicamycin | |
|----------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | 0,1 µg/ml | 1 µg/ml |
| <i>ATF4</i> | 1,00 ± 0,00 ^b | 2,14 ± 0,37 ^a | 2,12 ± 0,23 ^a |
| <i>BAX</i> | 1,00 ± 0,00 ^b | 1,31 ± 0,19 ^{ab} | 1,54 ± 0,22 ^a |
| <i>CASP3</i> | 1,00 ± 0,00 ^b | 1,33 ± 0,16 ^a | 1,34 ± 0,06 ^a |
| <i>DDIT3</i> | 1,00 ± 0,00 ^b | 17,34 ± 0,44 ^a | 18,13 ± 0,68 ^a |
| <i>DNAJC3</i> | 1,00 ± 0,00 ^b | 3,37 ± 0,45 ^a | 3,48 ± 0,88 ^a |
| <i>EDEM1</i> | 1,00 ± 0,00 | 1,17 ± 0,07 | 1,23 ± 0,34 |
| <i>HERPUD1</i> | 1,00 ± 0,00 ^b | 3,33 ± 0,53 ^a | 4,08 ± 0,85 ^a |
| <i>HSPA5</i> | 1,00 ± 0,00 ^b | 9,01 ± 0,47 ^a | 9,56 ± 0,64 ^a |
| <i>PDIA4</i> | 1,00 ± 0,00 ^b | 2,09 ± 0,42 ^a | 1,96 ± 0,42 ^a |
| <i>XBP1</i> | 1,00 ± 0,00 ^b | 1,74 ± 0,21 ^a | 1,70 ± 0,16 ^a |

MDBK-Zellen wurden 24 Stunden lang mit 0,1 µg/ml und 1 µg/ml Tunicamycin inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen als Vielfaches der Kontrolle (Kontrolle wurde 1 gesetzt) aus drei unabhängigen Experimenten (n=3). Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). *ATF4* = activating transcription factor 4; *BAX* = BCL2-associated X protein; *CASP3* = Caspase 3; *DDIT3* = DNA damage-inducible transcript 3; *DNAJC3* = DnaJ homolog subfamily C member 3; *EDEM1* = ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like 1; *HERPUD1* = Homocysteine-responsive endoplasmic reticulum-resident ubiquitin-like domain member 1 protein; *HSPA5* = heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa); *PDIA4* = protein disulfide isomerase family A, member 4; *XBP1* = X-box binding protein 1.

Unter Einfluss von Thapsigargin (Tabelle 7) waren die Effekte auf mRNA-Ebene ähnlich, allerdings war in diesem Fall die Genexpression von EDEM1 tendenziell erhöht ($0,05 < p < 0,1$) und BAX zeigte im Vergleich zur Kontrolle keine signifikanten Veränderungen der relativen mRNA-Konzentrationen.

Tabelle 7: Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter ER-Stress Gene unter Einfluss von Thapsigargin

| Gen | Kontrolle | + Thapsigargin | |
|----------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | | 0,1 μ M | 1 μ M |
| <i>ATF4</i> | 1,00 \pm 0,00 ^b | 2,43 \pm 0,52 ^a | 2,42 \pm 0,56 ^a |
| <i>BAX</i> | 1,00 \pm 0,00 | 1,22 \pm 0,20 | 1,28 \pm 0,18 |
| <i>CASP3</i> | 1,00 \pm 0,00 ^b | 3,41 \pm 0,68 ^a | 3,67 \pm 1,07 ^a |
| <i>DDIT3</i> | 1,00 \pm 0,00 ^b | 20,27 \pm 4,85 ^a | 19,99 \pm 3,72 ^a |
| <i>DNAJC3</i> | 1,00 \pm 0,00 ^b | 3,16 \pm 0,41 ^a | 3,43 \pm 0,78 ^a |
| <i>EDEM1</i> | 1,00 \pm 0,00 | 1,73 \pm 0,45 | 1,75 \pm 0,42 |
| <i>HERPUD1</i> | 1,00 \pm 0,00 ^b | 5,54 \pm 0,70 ^a | 6,47 \pm 1,13 ^a |
| <i>HSPA5</i> | 1,00 \pm 0,00 ^b | 17,23 \pm 2,90 ^a | 19,22 \pm 5,44 ^a |
| <i>PDIA4</i> | 1,00 \pm 0,00 ^b | 2,69 \pm 0,70 ^a | 2,52 \pm 0,55 ^a |
| <i>XBP1</i> | 1,00 \pm 0,00 ^b | 3,04 \pm 0,50 ^a | 3,32 \pm 0,87 ^a |

MDBK-Zellen wurden 24 Stunden lang mit 0,1 μ M und 1 μ M Thapsigargin inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen als Vielfaches der Kontrolle (Kontrolle wurde 1 gesetzt) aus drei unabhängigen Experimenten (n=3). Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). *ATF4* = activating transcription factor 4; *BAX* = BCL2-associated X protein; *CASP3* = Caspase 3; *DDIT3* = DNA damage-inducible transcript 3; *DNAJC3* = DnaJ homolog subfamily C member 3; *EDEM1* = ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like 1; *HERPUD1* = Homocysteine-responsive endoplasmic reticulum-resident ubiquitin-like domain member 1 protein; *HSPA5* = heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa); *PDIA4* = protein disulfide isomerase family A, member 4; *XBP1* = X-box binding protein 1.

Als weiterer Hinweis für die Induktion von ER-Stress durch Tunicamycin und Thapsigargin wurde das Splicing von XBP1 in einem DNA-Gel untersucht. Sowohl unter Einfluss von Tunicamycin als auch von Thapsigargin zeigte sich bereits bei der geringeren Dosis der zwei Induktoren ein signifikanter Anstieg der gespleißten Form von XBP1 (129 bp) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Ergebnisse zum XBP1-Splicing in Bezug auf Tunicamycin und Thapsigargin sind jeweils in Abbildung 4 und Abbildung 5 aufgeführt. Als Referenzgen wurde in beiden Versuchen PPIA (87 bp) aufgetragen. Mittels ImageJ wurde der Anstieg des gespleißten XBP1 unter Einfluss von Tunicamycin und Thapsigargin quantitativ ermittelt. Die ungespleißte Form des

XBP1 (155 bp) blieb unter Einfluss von Tunicamycin unverändert, jedoch bewirkte Thapsigargin eine signifikante Verminderung ihrer Signalstärke im DNA-Gel.

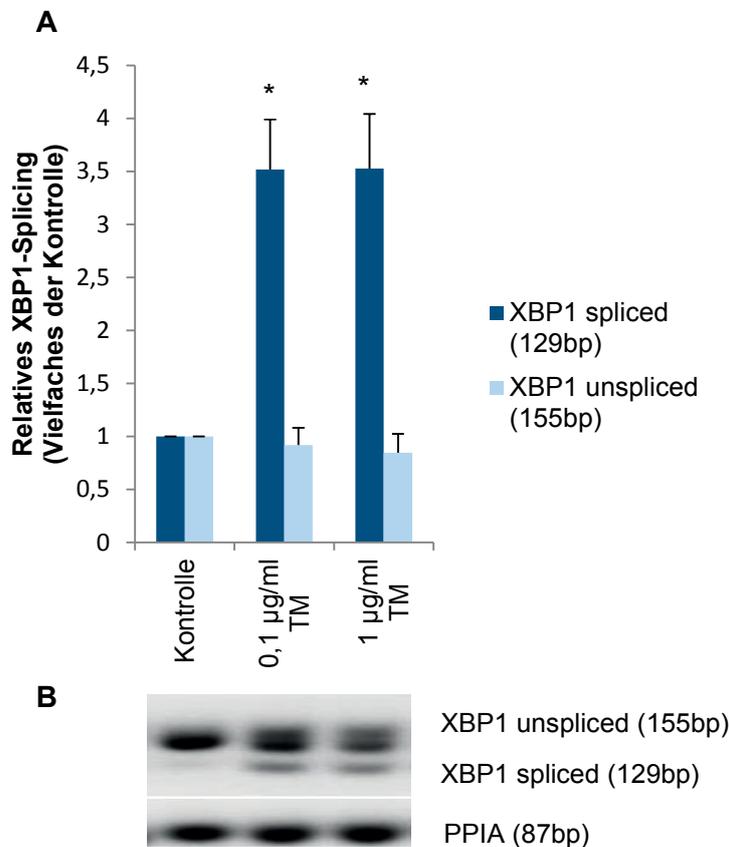


Abbildung 4: XBP1-Splicing unter Einfluss von Tunicamycin

MDBK-Zellen wurden 24 Stunden lang mit 0,1 µg/ml und 1 µg/ml Tunicamycin inkubiert.

A. Relatives XBP1-Splicing nach Behandlung mit Tunicamycin für 24 Stunden. Dargestellt sind relative Mittelwerte ± Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten (n=3). Die Kontrolle wurde 1 gesetzt. Zeichen (*) kennzeichnet signifikanten Unterschied zur Kontrolle ($p < 0,05$). **B.** Repräsentatives Bild der PCR-Produkte, aufgetrennt in 2%igem Agarosegel. Dargestellt sind XBP1 unspliced, XBP1 spliced, sowie das Haushaltsgen PPIA. PPIA = Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A); TM = Tunicamycin; XBP1 = X-box binding protein 1

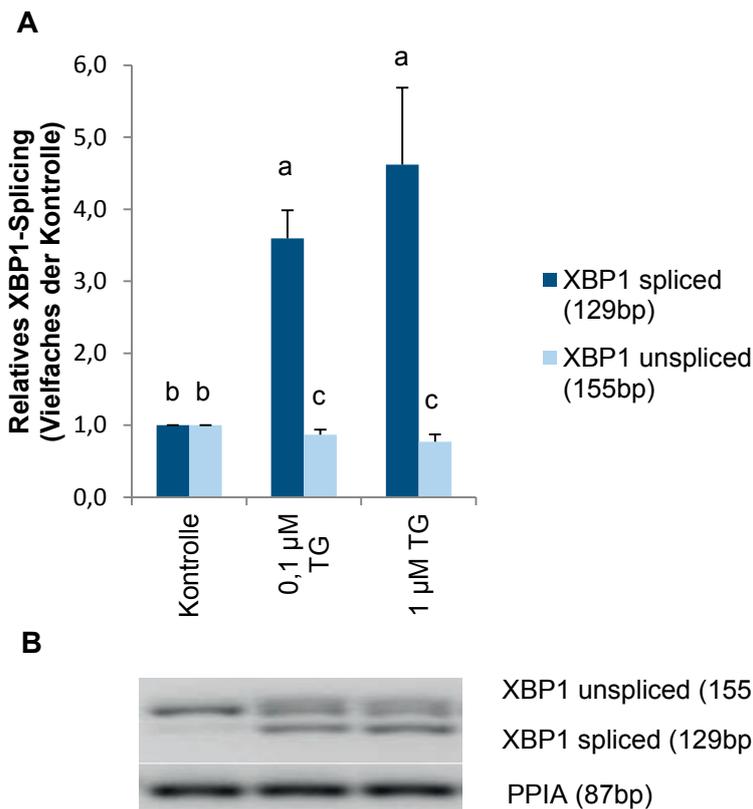


Abbildung 5: XBP1-Splicing unter Einfluss von Thapsigargin

MDBK-Zellen wurden 24 Stunden lang mit 0,1 µM und 1 µM Thapsigargin inkubiert.

A. Relatives XBP1-Splicing nach Behandlung mit Thapsigargin für 24 Stunden. Dargestellt sind relative Mittelwerte ± Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten (n=3). Die Kontrolle wurde 1 gesetzt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede (p < 0,05). TG = Thapsigargin **B.** Repräsentatives Bild der PCR-Produkte aufgetrennt in 2%igem Agarosegel. Dargestellt sind XBP1 unspliced, XBP1 spliced, sowie das Haushaltsgen PPIA.

PPIA = Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A); TM = Tunicamycin; XBP1 = X-box binding protein 1

3.1.3 Proteinexpression der phosphorylierten und der totalen PERK

Um eine Bestätigung der UPR-Induktion auf Proteinebene zu erhalten, wurden mittels Western Blot die totale und die phosphorylierte Form der *protein kinase RNA like endoplasmic reticulum kinase* (PERK) im Gesamthomogenat der MDBK-Zellen detektiert. Die Zellen wurden mit 1 µg/ml Tunicamycin bzw. 1 µM Thapsigargin über 24 Stunden inkubiert. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der relativen Proteinkonzentration der phosphorylierten Form der PERK (Phospho-PERK) unter Einfluss von Tunicamycin (Abbildung 6) und Thapsigargin (Abbildung 7) im Vergleich zur Kontrolle, während die totale PERK keine statistisch signifikanten Veränderungen zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe aufwies. Der Quotient aus der relativen

Ergebnisse

Proteinkonzentration von Phospho-PERK und PERK wurde berechnet. Als Referenzprotein diente β -Actin (ACTB).

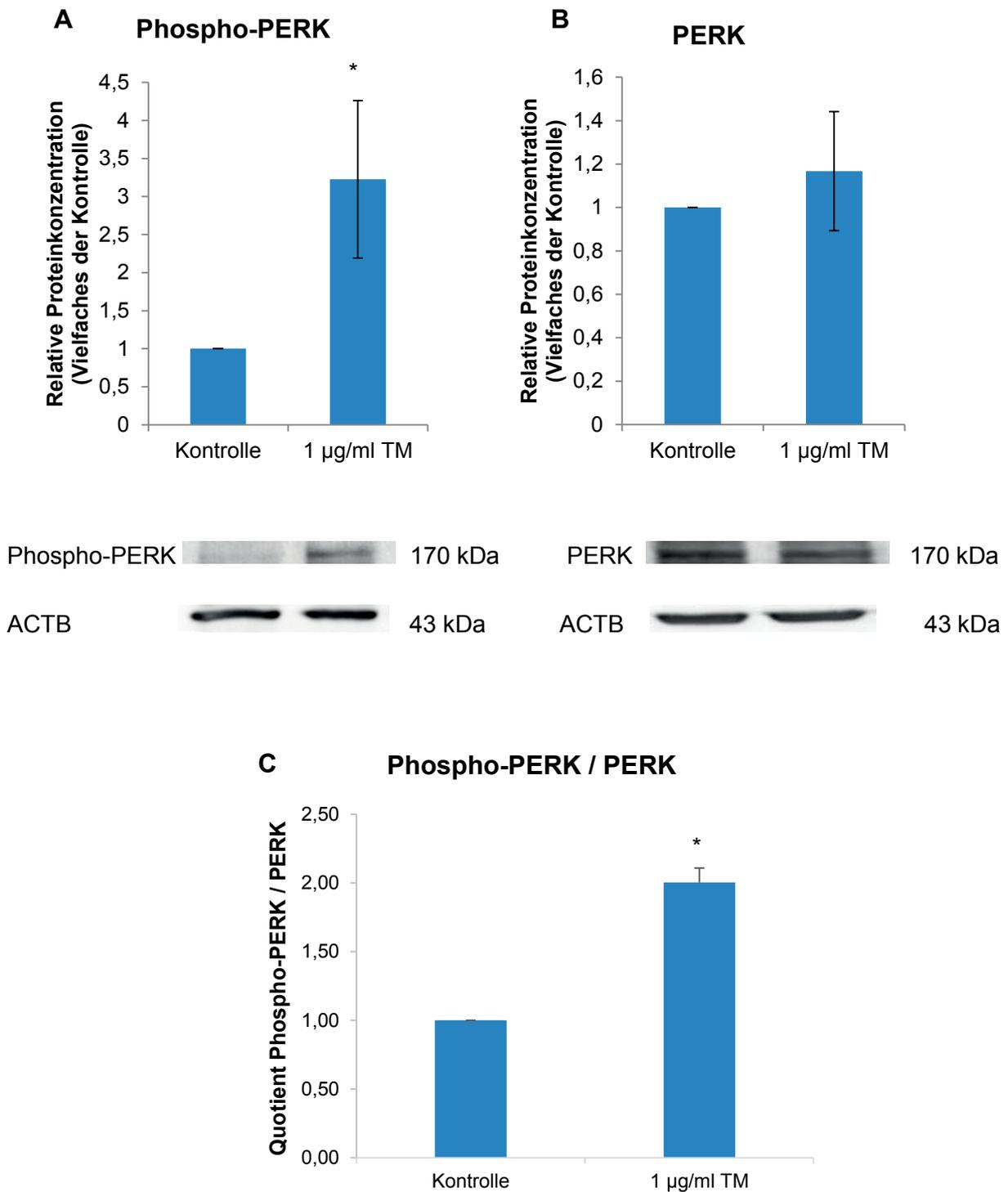


Abbildung 6: Relative Proteinkonzentration der PERK und der phosphorylierten PERK unter Einfluss von Tunicamycin

MDBK-Zellen wurden 24 Stunden lang mit 1 µg/ml Tunicamycin inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Experimenten (n=3), ein repräsentativer Blot der phosphorylierten PERK (**A**), ein repräsentativer Blot der totalen PERK (**B**) jeweils aus einem unabhängigen Experiment. ACTB diente in beiden Fällen als Referenzprotein. Der Quotient aus der relativen Proteinkonzentration von Phospho-PERK und PERK wurde aus zwei Versuchen mit Zellen derselben Passage berechnet (**C**). Zeichen (*) kennzeichnet signifikanten Unterschied zur Kontrolle ($p < 0,05$). ACTB = β -Actin; PERK = protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase; TM = Tunicamycin.

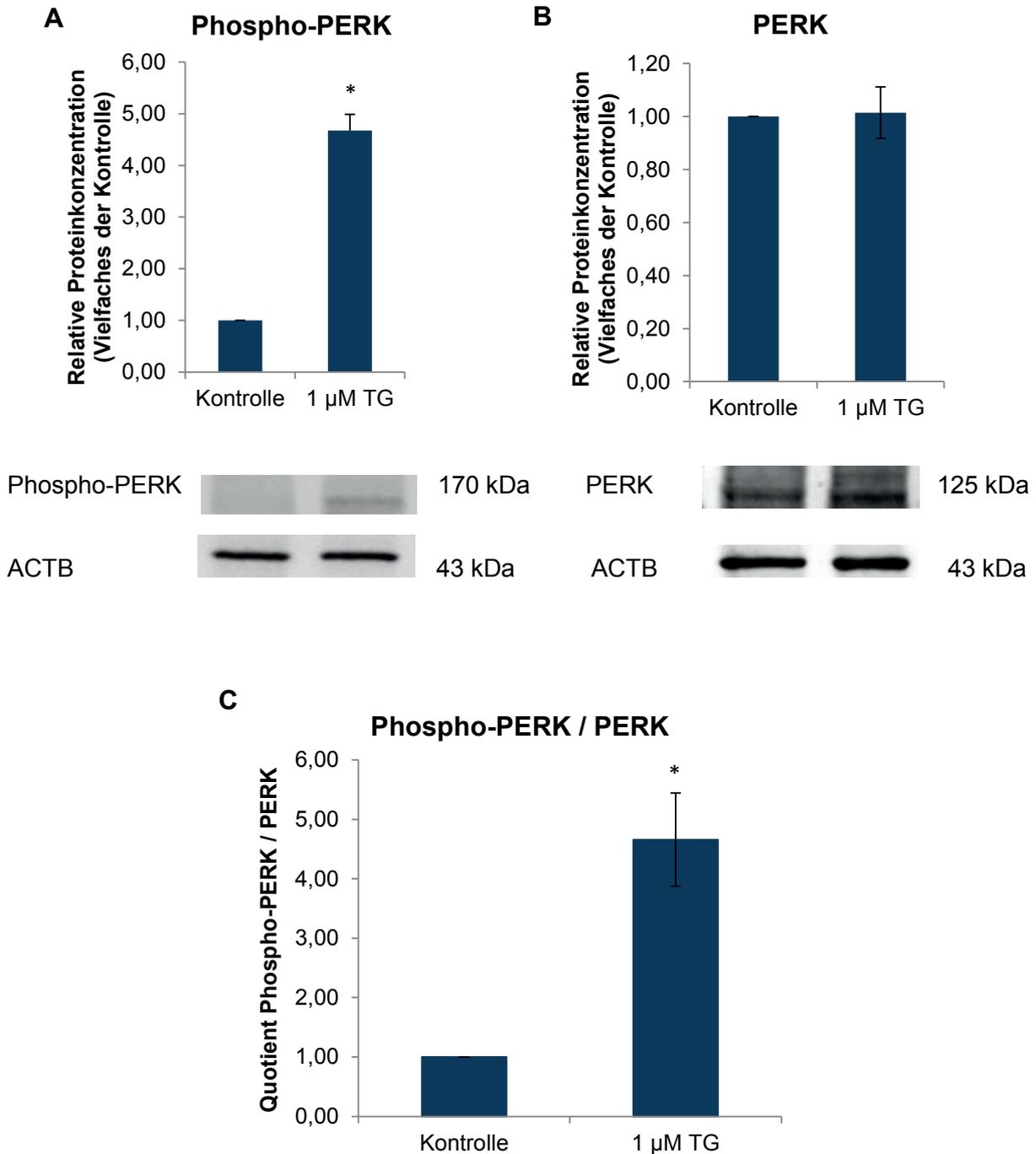


Abbildung 7: Relative Proteinkonzentration der PERK und der phosphorylierten PERK unter Einfluss von Thapsigargin

MDBK-Zellen wurden 24 Stunden lang mit 1 μ M Thapsigargin inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Experimenten (n=3), ein repräsentativer Blot der phosphorylierten PERK (**A**), ein repräsentativer Blot der totalen PERK (**B**) jeweils aus einem unabhängigen Experiment. ACTB diente in beiden Fällen als Referenzprotein. Der Quotient aus der relativen Proteinkonzentration von Phospho-PERK und PERK wurde aus drei Versuchen mit Zellen derselben Passage berechnet (**C**). Zeichen (*) kennzeichnet signifikanten Unterschied zur Kontrolle ($p < 0,05$). ACTB = β -Actin; PERK = protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase; TG =Thapsigargin.

3.2 Einfluss von Tunicamycin und Thapsigargin auf den Lipidstoffwechsel in MDBK-Zellen

Der Einfluss von dem durch Tunicamycin und Thapsigargin induzierten ER-Stress auf den Lipidstoffwechsel in MDBK-Zellen wurde untersucht. Dabei standen SREBP1-Zielgene im Fokus der Untersuchungen.

3.2.1 Relative mRNA-Konzentrationen des SREBF1 und ausgewählter SREBP1-Zielgene und -Regulatoren

SREBP1, kodiert durch das *sterol regulatory element binding transcription factor 1* (SREBF1), und die an der Fettsäuresynthese beteiligten Zielgene *Acetyl-CoA-Carboxylase alpha* (ACACA), *fatty acid elongase 6* (ELOVL6), *fatty acid synthase* (FASN) und *glucose-6-phosphate dehydrogenase* (G6PD) wurden auf Genebene untersucht. Im Fokus der Untersuchungen standen außerdem das *SREBF cleavage activating protein* (SCAP) und die insulin-induzierten Gene INSIG1 und INSIG2, die für Proteine kodieren, die die SREBP1-Aktivierung regulieren.

SREBF1 und seine Zielgene (ACACA, ELOVL6, FASN, G6PD) waren unabhängig von der verwendeten Substanz und schon bereits bei einer niedrigen Dosis derselben stets runterreguliert im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ergebnisse in Bezug auf Tunicamycin sind in Tabelle 8 aufgeführt, in Bezug auf Thapsigargin in Tabelle 9.

Die mRNA-Konzentration von SCAP war wiederum sowohl unter Einfluss von Tunicamycin als auch von Thapsigargin bereits bei der niedrigsten Dosis der jeweiligen Substanz signifikant höher als die der Kontrolle. Die mRNA-Konzentrationen der zwei Regulatoren INSIG1 und INSIG2 waren etwas inhomogener. Unter Einfluss von Tunicamycin war INSIG1 unabhängig von der verwendeten Dosis signifikant herunterreguliert im Vergleich zur Kontrolle, während es unter Einfluss von Thapsigargin keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle gab. INSIG2 blieb nach Behandlung mit Tunicamycin unverändert, während Thapsigargin bereits bei der niedrigsten Behandlungsdosis zu einem signifikanten Anstieg der mRNA-Konzentrationen führte.

Tabelle 8: Relative mRNA-Konzentrationen des SREBF1, ausgewählter SREBP1-Zielgene und -Regulatoren unter Einfluss von Tunicamycin

| Gen | Kontrolle | + Tunicamycin | |
|---------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | 0,1 µg/ml | 1 µg/ml |
| <i>ACACA</i> | 1,00 ± 0,00 ^a | 0,54 ± 0,04 ^b | 0,56 ± 0,10 ^b |
| <i>ELOVL6</i> | 1,00 ± 0,00 ^a | 0,39 ± 0,08 ^b | 0,24 ± 0,05 ^c |
| <i>FASN</i> | 1,00 ± 0,00 ^a | 0,36 ± 0,04 ^b | 0,36 ± 0,05 ^b |
| <i>G6PD</i> | 1,00 ± 0,00 ^a | 0,13 ± 0,02 ^b | 0,08 ± 0,01 ^c |
| <i>INSIG1</i> | 1,00 ± 0,00 ^a | 0,51 ± 0,08 ^b | 0,41 ± 0,05 ^b |
| <i>INSIG2</i> | 1,00 ± 0,00 | 1,06 ± 0,20 | 0,96 ± 0,21 |
| <i>SCAP</i> | 1,00 ± 0,00 ^b | 1,89 ± 0,23 ^a | 1,56 ± 0,40 ^a |
| <i>SREBF1</i> | 1,00 ± 0,00 ^a | 0,69 ± 0,01 ^b | 0,70 ± 0,10 ^b |

MDBK-Zellen wurden 24 Stunden lang mit 0,1 µg/ml und 1 µg/ml Tunicamycin inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen als Vielfaches der Kontrolle (Kontrolle wurde 1 gesetzt) aus drei unabhängigen Experimenten (n=3). Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). *ACACA* = Acetyl-CoA-Carboxylase alpha; *ELOVL6* = *fatty acid elongase 6*; *FASN* = Fatty acid synthase; *G6PD* = *glucose-6-phosphate dehydrogenase*; *INSIG1* = *insulin induced gene 1*; *INSIG2* = *insulin induced gene 2*; *SCAP* = SREBF cleavage activating protein; *SREBF1* = sterol regulatory element binding transcription factor 1.

Tabelle 9: Relative mRNA-Konzentrationen des SREBF1, ausgewählter SREBP1-Zielgene und -Regulatoren unter Einfluss von Thapsigargin

| Gen | Kontrolle | + Thapsigargin | |
|---------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | 0,1 μ M | 1 μ M |
| <i>ACACA</i> | 1,00 \pm 0,00 ^a | 0,57 \pm 0,12 ^b | 0,58 \pm 0,07 ^b |
| <i>ELOVL6</i> | 1,00 \pm 0,00 ^a | 0,57 \pm 0,22 ^b | 0,38 \pm 0,10 ^b |
| <i>FASN</i> | 1,00 \pm 0,00 ^a | 0,42 \pm 0,09 ^b | 0,31 \pm 0,07 ^b |
| <i>G6PD</i> | 1,00 \pm 0,00 ^a | 0,39 \pm 0,14 ^b | 0,32 \pm 0,07 ^b |
| <i>INSIG1</i> | 1,00 \pm 0,00 ^{ab} | 1,21 \pm 0,19 ^a | 0,82 \pm 0,18 ^b |
| <i>INSIG2</i> | 1,00 \pm 0,00 ^b | 2,22 \pm 0,30 ^a | 2,42 \pm 0,45 ^a |
| <i>SCAP</i> | 1,00 \pm 0,00 ^b | 2,22 \pm 0,51 ^a | 2,27 \pm 0,29 ^a |
| <i>SREBF1</i> | 1,00 \pm 0,00 ^a | 0,78 \pm 0,10 ^b | 0,81 \pm 0,06 ^b |

MDBK-Zellen wurden 24 Stunden lang mit 0,1 μ M und 1 μ M Thapsigargin inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen als Vielfaches der Kontrolle (Kontrolle wurde 1 gesetzt) aus drei unabhängigen Experimenten (n=3). Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). *ACACA* = Acetyl-CoA-Carboxylase alpha; *ELOVL6* = *fatty acid elongase 6*; *FASN* = Fatty acid synthase; *G6PD* = *glucose-6-phosphate dehydrogenase*; *INSIG1* = *insulin induced gene 1*; *INSIG2* = *insulin induced gene 2*; *SCAP* = SREBF cleavage activating protein; *SREBF1* = sterol regulatory element binding transcription factor 1.

3.3 Einfluss von Tunicamycin und Thapsigargin auf inflammatorische Prozesse in MDBK-Zellen

Es wurde der Einfluss einer Aktivierung der UPR auf inflammatorische Prozesse in MDBK-Zellen untersucht. Dabei standen NF κ B-Zielgene und Inflammasombestandteile im Fokus der Analysen. NF- κ B p50 wurde außerdem mittels Western Blot untersucht.

3.3.1 Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter NF- κ B-Zielgene

Um das Entzündungsgeschehen in MDBK-Zellen unter Einfluss von Tunicamycin und Thapsigargin zu untersuchen, wurden die relativen mRNA-Konzentrationen ausgewählter NF- κ B-Zielgene ermittelt. Darunter befanden sich der

Tumornekrosefaktor α (TNF), die Interleukine 1B und 6, das akute Phase Protein SAA3, sowie das Caveolin 1 als Bestandteil der Caveolae.

Unter Einfluss von Tunicamycin waren die relativen mRNA-Konzentrationen der NF κ B-Zielgene CAV1, IL1B und TNF signifikant vermindert. IL6 und SAA3 waren unverändert (Tabelle 10). Bei allen Genen waren die Ergebnisse nicht dosisabhängig, so dass davon auszugehen ist, dass bereits bei der geringeren Dosis an Tunicamycin eine Sättigung erreicht war.

Tabelle 10: Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter NF κ B-Zielgene unter Einfluss von Tunicamycin

| Gen | Kontrolle | + Tunicamycin | |
|-------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | 0,1 μ g/ml | 1 μ g/ml |
| <i>CAV1</i> | 1,00 \pm 0,00 ^a | 0,53 \pm 0,15 ^b | 0,49 \pm 0,15 ^b |
| <i>IL1B</i> | 1,00 \pm 0,00 ^a | 0,54 \pm 0,07 ^b | 0,56 \pm 0,06 ^b |
| <i>IL6</i> | 1,00 \pm 0,00 | 1,35 \pm 0,53 | 0,91 \pm 0,41 |
| <i>SAA3</i> | 1,00 \pm 0,00 | 1,13 \pm 0,22 | 1,25 \pm 0,09 |
| <i>TNF</i> | 1,00 \pm 0,00 ^a | 0,48 \pm 0,06 ^b | 0,47 \pm 0,03 ^b |

MDBK-Zellen wurden 24 Stunden lang mit 0,1 μ g/ml und 1 μ g/ml Tunicamycin inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen als Vielfaches der Kontrolle (Kontrolle wurde 1 gesetzt) aus drei unabhängigen Experimenten (n=3). Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). *CAV1* = Caveolin 1; *IL1b* = Interleukin 1b; *IL6* = Interleukin 6; *SAA3* = Serum Amyloid A; *SOD1* = superoxide dismutase 1; *TNF* = Tumornekrosefaktor.

Unter Einfluss von Thapsigargin war das Erscheinungsbild ungleichmäßiger, obwohl auch hier keine Unterschiede zwischen den zwei verwendeten Konzentrationen an Thapsigargin zu beobachten waren. Die relative mRNA-Konzentration von TNF war so wie unter Tunicamycin signifikant vermindert. Dennoch waren die mRNA-Konzentrationen des Serumamyloid SAA3 und die des IL6 signifikant erhöht. CAV1 und IL1B und blieben unverändert (Tabelle 11).

Tabelle 11: Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter NFκB-Zielgene unter Einfluss von Thapsigargin

| Gen | Kontrolle | + Thapsigargin | |
|-------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | 0,1 μM | 1 μM |
| <i>CAV1</i> | 1,00 ± 0,00 | 0,91 ± 0,10 | 0,83 ± 0,14 |
| <i>IL1B</i> | 1,00 ± 0,00 | 0,80 ± 0,13 | 0,90 ± 0,13 |
| <i>IL6</i> | 1,00 ± 0,00 ^b | 2,11 ± 0,50 ^a | 2,43 ± 0,54 ^a |
| <i>SAA3</i> | 1,00 ± 0,00 ^b | 2,14 ± 0,33 ^a | 2,44 ± 0,32 ^a |
| <i>TNF</i> | 1,00 ± 0,00 ^a | 0,67 ± 0,06 ^b | 0,63 ± 0,06 ^b |

MDBK-Zellen wurden 24 Stunden lang mit 0,1 μM und 1 μM Thapsigargin inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen als Vielfaches der Kontrolle (Kontrolle wurde 1 gesetzt) aus drei unabhängigen Experimenten (n=3). Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). *CAV1* = Caveolin 1; *IL1B* = Interleukin 1b; *IL6* = Interleukin 6; *SAA3* = Serum Amyloid A; *SOD1* = superoxide dismutase 1; *TNF* = Tumornekrosefaktor.

3.3.2 Proteinexpression des NF-κB p50

NF-κB p50 wurde mittels Western Blot in der Nuklearfraktion der MDBK-Zellen detektiert. Die Ergebnisse zeigen einen signifikanten Abfall seiner relativen Proteinkonzentrationen unter Einfluss von Tunicamycin (Abbildung 8).

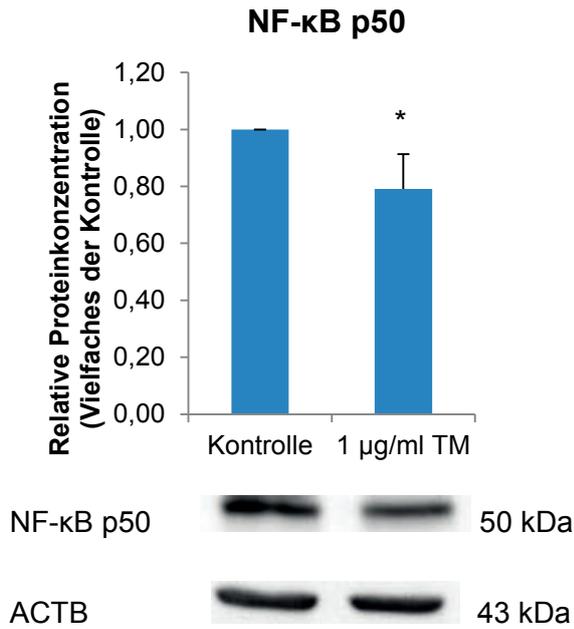


Abbildung 8: Relative Proteinkonzentration des NF-κB p50 unter Einfluss von Tunicamycin

MDBK-Zellen wurden 24 Stunden lang mit 1 µg/ml Tunicamycin inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Experimenten (n=3) und ein repräsentativer Blot des NF-κB p50 sowie des ACTB aus einem unabhängigen Experiment. Zeichen (*) kennzeichnet signifikanten Unterschied zur Kontrolle ($p < 0,05$). ACTB = β-Actin; NF-κB = nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells

Wurde der ER-Stress durch Thapsigargin ausgelöst, konnte keine statistisch signifikante Verminderung der Proteinkonzentration des NFκB p50 beobachtet werden. (Abbildung 9).

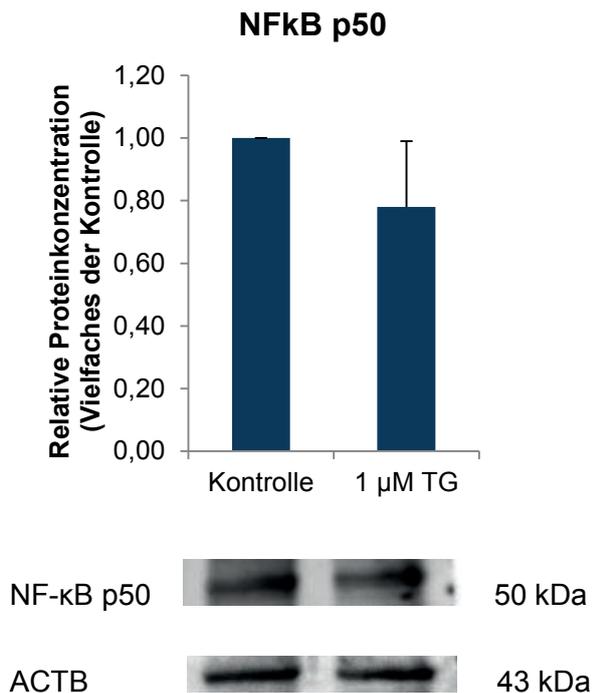


Abbildung 9: Relative Proteinkonzentration des NF-κB p50 unter Einfluss von Thapsigargin

MDBK-Zellen wurden 24 Stunden lang mit 1 μM Thapsigargin inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen (SD) aus einem unabhängigen Experimenten mit vier Replikaten pro Gruppe (n=3) und ein repräsentativer Blot des NF-κB p50 sowie des ACTB. ACTB = β-Actin; NF-κB = nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells

3.3.3 Relative mRNA-Konzentrationen eines repräsentativen Gens des Inflammasoms

Als Vertreter des Inflammasoms wurde die Genexpression von PYCARD, einem Inflammasomsbestandteil gemessen.

Unter Einfluss von 1 μg/ml Tunicamycin war dessen mRNA-Konzentration signifikant erniedrigt (Tabelle 12).

Tabelle 12: Relative mRNA-Konzentrationen eines repräsentativen Gens des Inflammasoms unter Einfluss von Tunicamycin

| Gen | Kontrolle | + Tunicamycin | |
|---------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | 0,1 µg/ml | 1 µg/ml |
| <i>PYCARD</i> | 1,00 ± 0,00 ^a | 0,81 ± 0,14 ^b | 0,70 ± 0,06 ^b |

MDBK-Zellen wurden 24 Stunden lang mit 0,1 µg/ml und 1 µg/ml Tunicamycin inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen als Vielfaches der Kontrolle (Kontrolle wurde 1 gesetzt) aus drei unabhängigen Experimenten (n=3). *PYCARD* = Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD or ASC.

Unter Einfluss von 0,1 und 1 µM Thapsigargin waren die mRNA-Konzentrationen von *PYCARD* nicht signifikant niedriger als die der Kontrollgruppe (Tabelle 13).

Tabelle 13: Relative mRNA-Konzentrationen eines repräsentativen Gens des Inflammasoms unter Einfluss von Thapsigargin

| Gen | Kontrolle | + Thapsigargin | |
|---------------|-------------|----------------|-------------|
| | | 0,1 µM | 1 µM |
| <i>PYCARD</i> | 1,00 ± 0,00 | 0,78 ± 0,10 | 0,88 ± 0,18 |

MDBK-Zellen wurden 24 Stunden lang mit 0,1 µM und 1 µM Thapsigargin inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen als Vielfaches der Kontrolle (Kontrolle wurde 1 gesetzt) aus drei unabhängigen Experimenten (n=3). Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). *PYCARD* = Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD or ASC.

3.4 Einfluss von Tunicamycin und Thapsigargin auf die antioxidative Abwehr in MDBK-Zellen

Um zu testen, ob ER-Stress einen Einfluss auf den oxidativen Stress und dessen Abwehr hat wurden verschiedene Zielgene des Transkriptionsfaktors *Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2* (Nrf2) untersucht. Dazu gehörten die Katalase CAT, die Glutathionperoxidase GPX3 und Glutathiontransferase MGST3, die Hämoxigenase HMOX1, die Metallothioneine MT1A und MT2A, die NAD(P)H-Oxidoreduktase NQO1 und die Superoxiddismutase SOD1.

3.4.1 Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Nrf2-Zielgene

Von den untersuchten Nrf2-Zielgenen wiesen SOD1 und MT2A eine signifikant verminderte ($p < 0,05$) und MGST3 eine tendenziell verminderte ($0,05 < p < 0,1$) mRNA-Konzentration auf, unabhängig davon, ob Tunicamycin in einer Dosis von 0,1 oder 1 $\mu\text{g/ml}$ verwendet wurde. Im Gegensatz dazu war die mRNA-Konzentration von MT1A dosisabhängig signifikant erhöht. Die restlichen Gene (CAT, GPX3, HMOX1 und NQO1) wiesen zwischen Kontrolle und Behandlungen keine Unterschiede auf (Tabelle 14).

Tabelle 14: Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Nrf2-Zielgene unter Einfluss von Tunicamycin

| Gen | Kontrolle | + Tunicamycin | |
|--------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| | | 0,1 $\mu\text{g/ml}$ | 1 $\mu\text{g/ml}$ |
| <i>CAT</i> | 1,00 \pm 0,00 | 0,90 \pm 0,21 | 0,90 \pm 0,12 |
| <i>GPX3</i> | 1,00 \pm 0,00 | 0,93 \pm 0,23 | 0,93 \pm 0,08 |
| <i>HMOX1</i> | 1,00 \pm 0,00 | 1,12 \pm 0,31 | 0,85 \pm 0,08 |
| <i>MGST3</i> | 1,00 \pm 0,00 | 0,89 \pm 0,08 | 0,85 \pm 0,08 |
| <i>MT1A</i> | 1,00 \pm 0,00 ^b | 1,26 \pm 0,26 ^{ab} | 1,56 \pm 0,28 ^a |
| <i>MT2A</i> | 1,00 \pm 0,00 ^a | 0,27 \pm 0,04 ^b | 0,24 \pm 0,02 ^b |
| <i>NQO1</i> | 1,00 \pm 0,00 | 1,09 \pm 0,14 | 1,18 \pm 0,25 |
| <i>SOD1</i> | 1,00 \pm 0,00 ^a | 0,63 \pm 0,05 ^b | 0,63 \pm 0,18 ^b |

MDBK-Zellen wurden 24 Stunden lang mit 0,1 $\mu\text{g/ml}$ und 1 $\mu\text{g/ml}$ Tunicamycin inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen als Vielfaches der Kontrolle (Kontrolle wurde 1 gesetzt) aus drei unabhängigen Experimenten ($n=3$). Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). *CAT* = catalase; *GPX3* = glutathione peroxidase 3; *HMOX1* = Hämoxygenase-1; *MGST3* = microsomal glutathione S-transferase 3; *MT1A* = Metallothionein 1A; *MT2A* = Metallothionein 2A; *NQO1* = NAD(P)H quinone oxidoreductase 1; *SOD1* = Superoxiddismutase 1.

Wurden die MDBK-Zellen mit Thapsigargin behandelt, wiesen MGST3 und MT2A signifikant verminderte relative mRNA-Konzentrationen in beiden Behandlungen auf. Die Genexpression von CAT war nach einer Behandlung mit 1 μM Thapsigargin ebenfalls signifikant vermindert. Eine tendenzielle Erhöhung der relativen mRNA-Konzentrationen war in beiden Behandlungen bei MT1A zu beobachten, sowie bei

GPX3 nach Behandlung mit 0,1 µM Thapsigargin. Die relativen mRNA-Konzentrationen von NQO1 waren unabhängig von der verwendeten Dosis an Thapsigargin signifikant erhöht, während die von HMOX1 und SOD1 keine Veränderungen aufwiesen (Tabelle 15).

Tabelle 15: Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Nrf2-Zielgene unter Einfluss von Thapsigargin

| Gen | Kontrolle | + Thapsigargin | |
|--------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| | | 0,1 µM | 1 µM |
| <i>CAT</i> | 1,00 ± 0,00 ^a | 0,93 ± 0,05 ^{ab} | 0,90 ± 0,05 ^b |
| <i>GPX3</i> | 1,00 ± 0,00 | 1,65 ± 0,38 | 1,54 ± 0,36 |
| <i>HMOX1</i> | 1,00 ± 0,00 | 0,73 ± 0,32 | 0,71 ± 0,21 |
| <i>MGST3</i> | 1,00 ± 0,00 ^a | 0,64 ± 0,08 ^b | 0,56 ± 0,06 ^b |
| <i>MT1A</i> | 1,00 ± 0,00 | 1,63 ± 0,29 | 1,74 ± 0,56 |
| <i>MT2A</i> | 1,00 ± 0,00 ^a | 0,59 ± 0,15 ^b | 0,73 ± 0,17 ^b |
| <i>NQO1</i> | 1,00 ± 0,00 ^b | 3,50 ± 0,99 ^a | 3,56 ± 1,24 ^a |
| <i>SOD1</i> | 1,00 ± 0,00 | 0,82 ± 0,14 | 0,84 ± 0,20 |

MDBK-Zellen wurden 24 Stunden lang mit 0,1 µM und 1 µM Thapsigargin inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen als Vielfaches der Kontrolle (Kontrolle wurde 1 gesetzt) aus drei unabhängigen Experimenten (n=3). Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). *CAT* = catalase; *GPX3* = glutathione peroxidase 3; *HMOX1* = Hämoxygenase-1; *MGST3* = microsomal glutathione S-transferase 3; *MT1A* = Metallothionein 1A; *MT2A* = Metallothionein 2A; *NQO1* = NAD(P)H quinone oxidoreductase 1; *SOD1* = Superoxiddismutase 1.

3.5 Einfluss von Tunicamycin und Thapsigargin auf die mRNA-Konzentration von Genen, die für Transporter in MDBK-Zellen kodieren

Es wurde der Einfluss von ER-Stress auf die mRNA-Konzentration verschiedener Gene untersucht, die für Transportproteine in MDBK-Zellen kodieren. Dazu zählten die Natrium-Kalium-ATPase, verschiedene Kalziumtransporter, GLUT1 als Vertreter der Glucosetransporter sowie zwei Aminosäuretransporter. Dies verschaffte einen Überblick über mögliche Effekte des ER-Stresses auf renale Transporter beim Rind.

3.5.1 Relative mRNA-Konzentrationen der Natrium-Kalium-ATPase

Tunicamycin und Thapsigargin hatten keinen Einfluss auf die relativen mRNA-Konzentrationen der in der basolateralen Zellmembran verankerten Natrium-Kalium-ATPase (Tabelle 16, Tabelle 17).

Tabelle 16: Relative mRNA-Konzentrationen der Natrium-Kalium-ATPase unter Einfluss von Tunicamycin

| Gen | Kontrolle | + Tunicamycin | |
|---------------|-------------|---------------|-------------|
| | | 0,1 µg/ml | 1 µg/ml |
| <i>ATP1A1</i> | 1,00 ± 0,00 | 1,09 ± 0,09 | 1,27 ± 0,45 |

MDBK-Zellen wurden 24 Stunden lang mit 0,1 µg/ml und 1 µg/ml Tunicamycin inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen als Vielfaches der Kontrolle (Kontrolle wurde 1 gesetzt) aus drei unabhängigen Experimenten (n=3). *ATP1A1* = Na⁺/K⁺-ATPase alpha 1 polypeptide.

Tabelle 17: Relative mRNA-Konzentrationen der Natrium-Kalium-ATPase unter Einfluss von Thapsigargin

| Gen | Kontrolle | + Thapsigargin | |
|---------------|-------------|----------------|-------------|
| | | 0,1 µM | 1 µM |
| <i>ATP1A1</i> | 1,00 ± 0,00 | 1,14 ± 0,18 | 1,26 ± 0,28 |

MDBK-Zellen wurden 24 Stunden lang mit 0,1 µM und 1 µM Thapsigargin inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen als Vielfaches der Kontrolle (Kontrolle wurde 1 gesetzt) aus drei unabhängigen Experimenten (n=3). *ATP1A1* = Na⁺/K⁺-ATPase alpha 1 polypeptide.

3.5.2 Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Kalziumtransporter

Der renale Kalziumtransport nimmt verschiedene Transporter in Anspruch. In der vorliegenden Arbeit wurden die mRNA-Konzentrationen des zytoplasmatischen Kalziumtransporter Calbindin 1 (CALB1) sowie des basolateralen Transporter Ca²⁺-ATPase ATP2B1 untersucht.

Unter Einfluss von 0,1 und 1 µg/ml Tunicamycin wurde CALB1 signifikant hochreguliert, während die relativen mRNA-Konzentrationen des ATP2B1 nach Behandlung mit 0,1 µg/ml unverändert, mit 1 µg/ml jedoch signifikant vermindert war (Tabelle 18).

Tabelle 18: Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Kalziumtransporter unter Einfluss von Tunicamycin

| Gen | Kontrolle | + Tunicamycin | |
|---------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | 0,1 µg/ml | 1 µg/ml |
| <i>ATP2B1</i> | 1,00 ± 0,00 ^a | 0,85 ± 0,09 ^a | 0,68 ± 0,11 ^b |
| <i>CALB1</i> | 1,00 ± 0,00 ^b | 1,79 ± 0,32 ^a | 1,55 ± 0,15 ^a |

MDBK-Zellen wurden 24 Stunden lang mit 0,1 µg/ml und 1 µg/ml Tunicamycin inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen als Vielfaches der Kontrolle (Kontrolle wurde 1 gesetzt) aus drei unabhängigen Experimenten (n=3). Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). *ATP2B1* = ATPase, Ca⁺⁺ transporting, plasma membrane 1; *CALB1* = calbindin 1, 28kDa.

Unter Einfluss von 0,1 und 1 µM Thapsigargin waren die relativen mRNA-Konzentrationen des intrazellulären *CALB1* signifikant vermindert. *ATP2B1* blieb nach den Behandlungen unverändert (Tabelle 19).

Tabelle 19: Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Kalziumtransporter unter Einfluss von Thapsigargin

| Gen | Kontrolle | + Thapsigargin | |
|---------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | 0,1 µM | 1 µM |
| <i>ATP2B1</i> | 1,00 ± 0,00 | 0,99 ± 0,17 | 1,05 ± 0,14 |
| <i>CALB1</i> | 1,00 ± 0,00 ^a | 0,29 ± 0,07 ^b | 0,18 ± 0,06 ^b |

MDBK-Zellen wurden 24 Stunden lang mit 0,1 µM und 1 µM Thapsigargin inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen als Vielfaches der Kontrolle (Kontrolle wurde 1 gesetzt) aus drei unabhängigen Experimenten (n=3). Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). *ATP2B1* = ATPase, Ca⁺⁺ transporting, plasma membrane 1; *CALB1* = calbindin 1, 28kDa.

3.5.3 Relative mRNA-Konzentrationen eines repräsentativen Glukosetransporters

Der passive Glukosetransport wurde anhand des Gens *SLC2A1* untersucht, das für den sich an der basolateralen Membran befindlichen GLUT1-Transporter kodiert. Tunicamycin bewirkte eine Erhöhung der relativen mRNA-Konzentrationen von *SLC2A1*, die jedoch erst nach Behandlung mit 1 µg/ml signifikant höher als die der Kontrolle war (Tabelle 20).

Tabelle 20: Relative mRNA-Konzentrationen des GLUT1-Transporters unter Einfluss von Tunicamycin

| Gen | Kontrolle | + Tunicamycin | |
|---------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| | | 0,1 µg/ml | 1 µg/ml |
| <i>SLC2A1</i> | 1,00 ± 0,00 ^b | 1,31 ± 0,31 ^{ab} | 1,64 ± 0,23 ^a |

MDBK-Zellen wurden 24 Stunden lang mit 0,1 µg/ml und 1 µg/ml Tunicamycin inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen als Vielfaches der Kontrolle (Kontrolle wurde 1 gesetzt) aus drei unabhängigen Experimenten (n=3). *SLC2A1* = solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1 (GLUT 1).

Unter Einfluss von Thapsigargin war der Glukosetransporter ebenfalls signifikant hochreguliert, diesmal unabhängig von den verwendeten Konzentrationen der Substanz. (Tabelle 21).

Tabelle 21: Relative mRNA-Konzentrationen des GLUT1-Transporters unter Einfluss von Thapsigargin

| Gen | Kontrolle | + Thapsigargin | |
|---------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | 0,1 µM | 1 µM |
| <i>SLC2A1</i> | 1,00 ± 0,00 ^b | 2,99 ± 0,62 ^a | 3,83 ± 0,76 ^a |

MDBK-Zellen wurden 24 Stunden lang mit 0,1 µM und 1 µM Thapsigargin inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen als Vielfaches der Kontrolle (Kontrolle wurde 1 gesetzt) aus drei unabhängigen Experimenten (n=3). Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). *SLC2A1* = solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1 (GLUT 1).

3.5.4 Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter

Aminosäuretransporter

Als Vertreter der Aminosäuretransporter wurden der luminale SLC3A1- und der basolaterale SLC7A8-Transporter auf Genebene untersucht.

Die Behandlung mit 0,1 und 1 µg/ml Tunicamycin bewirkte eine signifikante Herunterregulierung beider Transporter (Tabelle 22).

Tabelle 22: Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Aminosäuretransporter unter Einfluss von Tunicamycin

| Gen | Kontrolle | + Tunicamycin | |
|---------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | 0,1 µg/ml | 1 µg/ml |
| <i>SLC3A1</i> | 1,00 ± 0,00 ^a | 0,25 ± 0,04 ^b | 0,27 ± 0,06 ^b |
| <i>SLC7A8</i> | 1,00 ± 0,00 ^a | 0,62 ± 0,10 ^b | 0,57 ± 0,13 ^b |

MDBK-Zellen wurden 24 Stunden lang mit 0,1 µg/ml und 1 µg/ml Tunicamycin inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen als Vielfaches der Kontrolle (Kontrolle wurde 1 gesetzt) aus drei unabhängigen Experimenten (n=3). Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). *SLC3A1* = solute carrier family 3 (amino acid transporter heavy chain); *SLC7A8* = solute carrier family 7 (amino acid transporter light chain, L system), member 8.

Unter Einfluss von Thapsigargin war der Effekt bezüglich *SLC3A1* ähnlich, da das Gen unabhängig von der eingesetzten Dosis des ER-Stressors ebenfalls signifikant herunterreguliert wurde. Bei *SLC7A8* war hingegen ein statistisch signifikanter Anstieg der relativen mRNA-Konzentrationen zu sehen, der ebenfalls dosisunabhängig war (Tabelle 23).

Tabelle 23: Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Aminosäuretransporter unter Einfluss von Thapsigargin

| Gen | Kontrolle | + Thapsigargin | |
|---------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | 0,1 µM | 1 µM |
| <i>SLC3A1</i> | 1,00 ± 0,00 ^a | 0,46 ± 0,15 ^b | 0,53 ± 0,22 ^b |
| <i>SLC7A8</i> | 1,00 ± 0,00 ^b | 1,51 ± 0,21 ^a | 1,61 ± 0,23 ^a |

MDBK-Zellen wurden 24 Stunden lang mit 0,1 µM und 1 µM Thapsigargin inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen als Vielfaches der Kontrolle (Kontrolle wurde 1 gesetzt) aus drei unabhängigen Experimenten (n=3). Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). *SLC3A1* = solute carrier family 3 (amino acid transporter heavy chain); *SLC7A8* = solute carrier family 7 (amino acid transporter light chain, L system), member 8.

3.6 Einfluss von Tunicamycin und Thapsigargin auf den Vitamin-D-Stoffwechsel in MDBK-Zellen

Aufgrund der zentralen Rolle der Niere im Vitamin-D-Stoffwechsel wurde der Einfluss von ER-Stress auf die zwei Hydroxylasen CYP24A1 und CYP27B1, den Vitamin-D-Rezeptor VDR und die Synthese von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ untersucht.

3.6.1 Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Vitamin-D-Hydroxylasen und des Vitamin-D-Rezeptors

Unabhängig vom ER-Stressor war eine signifikante Verminderung der relativen mRNA-Konzentrationen der 24-Hydroxylase CYP24A1 und eine signifikante Erhöhung der relativen mRNA-Konzentrationen der 1 α -Hydroxylase CYP27B1 sowie des Vitamin-D-Rezeptors VDR zu beobachten. Die Veränderungen traten schon bei der niedrigsten Dosis an Tunicamycin bzw. Thapsigargin ein. Eine Ausnahme bildete CYP27B1, bei der zwar die Behandlung mit 0,1 μ g/ml Tunicamycin ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der mRNA-Konzentration führte, diese aber signifikant niedriger war als die nach Behandlung mit 1 μ g/ml Tunicamycin. Die relativen mRNA-Konzentrationen von VDR zeigten erst nach Behandlung mit der höheren Dosis Tunicamycin einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle.

In Tabelle 24 sind die Ergebnisse bezüglich der Behandlung mit Tunicamycin aufgeführt. Ergebnisse zur Behandlung mit Thapsigargin sind in Tabelle 25 zu sehen.

Tabelle 24: Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Vitamin-D-Hydroxylasen und des Vitamin-D-Rezeptors unter Einfluss von Tunicamycin

| Gen | Kontrolle | + Tunicamycin | |
|----------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| | | 0,1 μ g/ml | 1 μ g/ml |
| <i>CYP24A1</i> | 1,00 \pm 0,00 ^a | 0,34 \pm 0,10 ^b | 0,24 \pm 0,07 ^b |
| <i>CYP27B1</i> | 1,00 \pm 0,00 ^c | 2,25 \pm 0,40 ^b | 2,80 \pm 0,07 ^a |
| <i>VDR</i> | 1,00 \pm 0,00 ^b | 1,54 \pm 0,19 ^{ab} | 1,95 \pm 0,46 ^a |

MDBK-Zellen wurden 24 Stunden lang mit 0,1 μ g/ml und 1 μ g/ml Tunicamycin inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen als Vielfaches der Kontrolle (Kontrolle wurde 1 gesetzt) aus drei unabhängigen Experimenten (n=3). Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). *CYP24A1* = Cytochrom P450. Familie 24, Subfamilie A, Polypeptid 1 (24-Hydroxylase); *CYP27B1* = Cytochrom P450. Familie 27, Subfamilie B, Polypeptid 1 (1 α -Hydroxylase); *VDR* = Vitamin-D-Rezeptor.

Tabelle 25: Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Vitamin-D-Hydroxylasen und des Vitamin-D-Rezeptors unter Einfluss von Thapsigargin

| Gen | Kontrolle | + Thapsigargin | |
|----------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | 0,1 μM | 1 μM |
| <i>CYP24A1</i> | 1,00 \pm 0,00 ^a | 0,12 \pm 0,01 ^b | 0,10 \pm 0,02 ^b |
| <i>CYP27B1</i> | 1,00 \pm 0,00 ^b | 4,18 \pm 1,00 ^a | 5,26 \pm 1,08 ^a |
| <i>VDR</i> | 1,00 \pm 0,00 ^b | 4,03 \pm 1,15 ^a | 4,62 \pm 1,05 ^a |

MDBK-Zellen wurden 24 Stunden lang mit 0,1 μM und 1 μM Thapsigargin inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen als Vielfaches der Kontrolle (Kontrolle wurde 1 gesetzt) aus drei unabhängigen Experimenten (n=3). Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). *CYP24A1* = Cytochrom P450. Familie 24, Subfamilie A, Polypeptid 1 (24-Hydroxylase); *CYP27B1* = Cytochrom P450. Familie 27, Subfamilie B, Polypeptid 1 (1 α -Hydroxylase); *VDR* = Vitamin-D-Rezeptor.

3.6.2 1,25-Dihydroxyvitamin-D₃-Konzentration im Zellüberstand

Im Überstand von MDBK-Zellen wurde mittels ELISA die Synthese von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ gemessen. Es wurde der Effekt von 1 $\mu\text{g/ml}$ Tunicamycin und 1 μM Thapsigargin auf die Calcitriolsynthese untersucht. Als Kontrolle diente das Medium bestehend aus MEM/EBSS, 10% FKS und 0,5% DMSO.

Die Synthese von Calcitriol war nach Behandlung mit Tunicamycin und Thapsigargin signifikant erhöht (Abbildung 10).

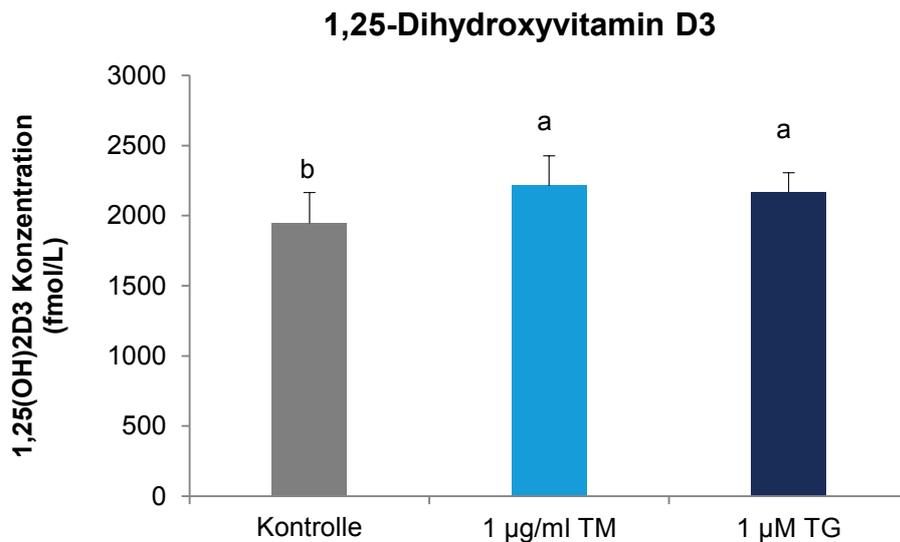


Abbildung 10 Synthese von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ im Überstand von MDBK-Zellen. MDBK-Zellen wurden 24 Stunden lang mit einem Kontrollmedium (MEM/EBSS + 10% FKS + 0,5% DMSO), 1 µg/ml Tunicamycin bzw. 1 µM Thapsigargin inkubiert. Die Konzentration von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ im Zellüberstand wurde mittels ELISA gemessen und ist in fmol/L angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten (n=3). Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikanten Unterschied zur Kontrolle ($p < 0,05$). 1,25(OH)2D₃ = 1,25 Dihydroxyvitamin D₃; TM = Tunicamycin; TG = Thapsigargin

3.7 Einfluss von Geburt und Laktation auf den Vitamin-D-Stoffwechsel beim Rind

In Leberproben aus einem Versuch mit Milchkühen wurde eine vermehrte Expression von ER-Stress-Genen während der Frühlaktation nachgewiesen (51). Aufgrund der interessanten Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit bezüglich des Vitamin-D-Stoffwechsels *in vitro* unter Einfluss von ER-Stressoren, wurden Vitamin-D-Enzyme und -Metaboliten in Probenmaterial aus dem zitierten Milchkuhversuch ebenfalls untersucht, um erste Zusammenhänge zwischen Vitamin-D-Stoffwechsel und ER-Stress zu erforschen.

Insbesondere wurde die Genexpression der Vitamin-D-25-Hydroxylase CYP2R1 in Leberbiopsien gemessen, sowie die Konzentration von 25-Hydroxyvitamin D₂ und 25-Hydroxyvitamin D₃ in Plasmaproben. Es lagen Leber- und Plasmaproben von 13 Milchkühen aus verschiedenen Zeitpunkten vor. Der Kontrollzeitpunkt entsprach der Gruppe an trächtigen Rindern, dessen Proben 3 Wochen vor der Geburt entnommen wurden. Weitere Proben von denselben Tieren wurden 1 Woche, 5 Wochen und 14

Wochen *post partum* entnommen. Mehr Details zu dem Versuch sind aus dem Kapitel 2.2.5, sowie der Originalstudie zu entnehmen (51).

3.7.1 Relative mRNA-Konzentrationen der Vitamin-D-25-Hydroxylase

In Leberbiopsien von 13 Rindern aus verschiedenen Zeitpunkten wurde die mRNA-Konzentration der Vitamin-D-25-Hydroxylase ermittelt. Der Zeitpunkt 3 Wochen vor der Geburt wurde als Kontrolle gesetzt. Biopsien von denselben Tieren wurden 1 Woche, 5 Wochen und 14 Wochen nach der Geburt entnommen und die gemessene mRNA-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle berechnet.

Die Vitamin-D-25-Hydroxylase war zum ersten untersuchten Zeitpunkt nach der Geburt ca. dreifach erhöht und fiel in den nachfolgenden Wochen wieder ab (Tabelle 26). Die relativen mRNA-Konzentrationen des Zeitpunktes 1 Woche *post partum* unterschieden sich signifikant von allen anderen Zeitpunkten. Der Zeitpunkt 5 Wochen *post partum* wies auch signifikant höhere mRNA-Konzentrationen auf als die Kontrolle. Der Zeitpunkt 14 Wochen *post partum* zeigte keine signifikanten Unterschiede weder zur Kontrolle noch zum Zeitpunkt 5 Wochen *post partum*.

Tabelle 26: Relative mRNA-Konzentrationen der Vitamin-D-25-Hydroxylase in der Rinderleber 3 Wochen *ante partum* und 1, 5 und 14 Wochen *post partum*

| Gen | 3 Wochen a.p. | 1 Woche p.p. | 5 Wochen p.p. | 14 Wochen p.p. |
|---------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| <i>CYP2R1</i> | 1,00 ± 0,66 ^c | 3,33 ± 1,45 ^a | 2,00 ± 0,81 ^b | 1,37 ± 0,93 ^{bc} |

Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen (n=13).

Die mRNA des Zeitpunktes 3 Wochen *ante partum* wurde 1 gesetzt und die mRNA der anderen Gruppen in Relation dazu ermittelt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). a.p. = *ante partum*; p.p. = *post partum*;

CYP2R1 = cytochrome P450, family 2, subfamily R, polypeptide 1 (Vitamin-D-25-Hydroxylase).

3.7.2 25-Hydroxyvitamin-D₂- und 25-Hydroxyvitamin-D₃-Konzentrationen im Plasma

Analog zur Entnahme der Leberbiopsien wurden 3 Wochen a.p. und 1 Woche, 5 Wochen und 14 Wochen p.p. Blutproben von 13 Rindern *post partum* gewonnen.

Mithilfe von massenspektrometrischen Analysen wurde die Konzentration von 25-Hydroxyvitamin D₂ und von 25-Hydroxyvitamin D₃ im Plasma gemessen.

Die Konzentration von 25-OH Vitamin D₂ war *ante partum* signifikant höher als im gesamten gemessenen Zeitraum *post partum*, in dem sie weitgehend unverändert geblieben ist. Die Konzentration von 25-OH Vitamin D₃ ist ab der 5. bis zur 14. Woche *post partum* signifikant angestiegen (siehe Tabelle 27).

Tabelle 27: Konzentrationen in ng/ml von 25-Hydroxyvitamin D₂ und 25-Hydroxyvitamin D₃ im Plasma von Rindern 3 Wochen *ante partum* und 1, 5 und 14 Wochen *post partum*

| Metabolit (ng/ml) | 3 Wochen a.p. | 1 Woche p.p. | 5 Wochen p.p. | 14 Wochen p.p. | Pooled SEM |
|----------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------|
| 25-OH VitD2 | 28,04 ^a | 22,32 ^b | 20,68 ^b | 21,04 ^b | 1,00 |
| 25-OH VitD3 | 18,65 ^{cd} | 19,91 ^c | 27,92 ^b | 41,70 ^a | 1,22 |

Dargestellt sind Mittelwerte ± *pooled SEM* (n=13).

Alle Werte sind in ng/ml angegeben. Die Gruppe 3 Wochen *ante partum* diente als Kontrolle. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede (p < 0,05).

25-OH VitD2 = 25-Hydroxyvitamin D₂; 25-OH VitD3 = 25-Hydroxyvitamin D₃; a.p. = *ante partum*; SEM = *standard error of the mean*; p.p. = *post partum*.

3.8 Einfluss von Traubentrester und Pflanzenpräparaten auf den Vitamin-D-Stoffwechsel in der Rinderleber in der Früh-laktation

In zwei Fütterungsversuchen mit Milchkühen wurde die Auswirkung einer Gabe von polyphenolhaltigem Futter auf ER-Stress-Genen in der Leber während der Früh-laktation untersucht. Es wurde gezeigt, dass Polyphenole zu einer leichten Herunterregulierung von ER-Stress-Genen führte (120; 121). In beiden Versuchen gab es eine Kontrollgruppe und eine Gruppe, die im Zeitraum von 3 Wochen *ante partum* bis 9 Wochen *post partum* eine polyphenohaltige Zusatzfütterung bekam. In einem Versuch bestand die Zusatzfütterung aus Traubentrester (121), in dem anderen aus einem Pflanzenpräparat, das zu 95% aus grünem Tee und zu 5% aus Curcumaextrakt bestand (120). Weitere Details zu den Versuchen sind aus dem Kapitel 2.2.6 oder aus den jeweiligen Originalstudien zu entnehmen (120; 121)

Die Vitamin-D-25-Hydroxylase wurde in Leberproben von Kühen aus einem weiteren Versuch gemessen, bei dem Auswirkungen von Polyphenolen auf ER-Stress

untersucht wurden. In zwei Versuchen waren Leberbiopsien von Kühen und Färsen eine Woche und drei Wochen *post partum* entnommen worden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde den Tieren zusätzlich zur totalen Mischration 1% Traubentrester oder 1% eines Pflanzenpräparats (bestehend zu 95% aus grünem Tee und zu 5% aus Curcumaextrakt) gegeben.

3.8.1 Relative mRNA-Konzentrationen der Vitamin-D-25-Hydroxylase

Eine Woche *post partum* zeigten eine Zusatzfütterung mit Traubentrester oder mit einem aus grünem Tee und Curcumaextrakt bestehenden Pflanzenpräparat keine signifikanten Unterschiede der mRNA-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle. Drei Wochen *post partum* ergaben sich aus den gleichen Gruppen ebenfalls keine signifikanten Veränderungen. Alle mRNA-Konzentrationen zum Zeitpunkt 3 Wochen *post partum* wurden im Verhältnis zur Kontrollgruppe eine Woche *post partum* berechnet (Tabelle 28).

Tabelle 28: Relative mRNA-Konzentrationen der Vitamin-D-25-Hydroxylase in der Rinderleber 1 Woche *post partum* unter Einfluss von Traubentrester und Kräutern

| Zeipunkt | Gen | Kontrolle (n=14) | Traubentrester (n=14) | Pflanzenpräparat(*) (n=13) |
|---------------|--------|---------------------|--------------------------|-------------------------------|
| 1 Woche p.p. | CYP2R1 | 1,00 ± 0,52 | 0,88 ± 0,52 | 0,90 ± 0,58 |
| 3 Wochen p.p. | | 1,16 ± 0,70 | 1,35 ± 0,76 | 1,58 ± 1,17 |

Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen.

Die mRNA der Kontrollgruppe 1 Woche *post partum* wurde 1 gesetzt und die mRNA der anderen Gruppen in Relation dazu ermittelt.

CYP2R1 = cytochrome P450, family 2, subfamily R, polypeptide 1 (Vitamin-D-25-Hydroxylase).

p.p. = post partum

(*) Das Pflanzenpräparat bestand aus grünem Tee (95%) und Curcumaextrakt (5%).

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen von ER-Stress auf verschiedene zelluläre Stoffwechselwege in Rindernierenzellen, den MDBK-Zellen untersucht. Aus der Literatur ist bekannt, dass in der Leber frühlaktierender Rinder eine erhöhte Expression von ER-Stress-Genen nachweisbar ist (51). Die Autoren vermuten, dass ein Zusammenhang zwischen ER-Stress und der pathologischen Zustände, an denen Milchkühe in der Frühaktation oftmals leiden (hepatische Lipidose, Ketose) bestehen könnte, da ER-Stress schon oft in Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen gebracht worden ist, wie zum Beispiel Diabetes mellitus Typ 2 und kardiovaskulären Erkrankungen (7).

Bisher ist wenig über die Folgen von ER-Stress beim Rind bekannt. Kenntnisse darüber konnten mit der vorliegenden Arbeit gewonnen und vertieft werden.

Die für die *in-vitro*-Versuche verwendeten MDBK-Zellen sind eine kommerzielle bovine Zelllinie, die aus dem distalen Nierentubulus stammen. Diese biologische Eigenschaft ermöglichte die Untersuchung von nierenspezifischen Genen, schränkte allerdings die Vergleiche zu den Ergebnissen von Gessner et al. (51), die ER-Stress in der Leber lactierender Rinder nachgewiesen hatten, ein. Als einzige kommerzielle bovine Zelllinie bieten die MDBK-Zellen eine zuverlässige Reproduzierbarkeit der Versuche. MDBK-Zellen wurden von Jordan et al. im Jahr 2002 erstmals verwendet, um eine virale Auslösung von ER-Stress zu untersuchen (50). Dieses Beispiel aus der Literatur zeigt, dass MDBK-Zellen ein geeignetes Zellmodell für ER-Stress sind.

Als Marker für ER-Stress zählt die Aktivierung der UPR. Diese wurde experimentell induziert und auf Gen- und Proteinebene nachgewiesen. Es wurden unabhängig voneinander zwei Substanzen (Tunicamycin und Thapsigargin) verwendet, um die UPR zu aktivieren. Beide Substanzen sind übliche ER-Stress-Induktoren, die regelmäßig zu diesem Zweck für wissenschaftliche Untersuchungen verwendet werden. Die Induktion der UPR entsteht auf unterschiedlicher Weise: Tunicamycin hemmt die N-gebundene Glykosylierung, Thapsigargin führt zu einer Verschiebung der Ca^{2+} Reserven im ER durch Hemmung der Ca^{2+} ATPase SERCA (11).

Analysen zum ER-Stress und dessen Auswirkungen auf die Zellphysiologie der MDBK-Zellen wurden mit verschiedenen Methoden (RTD-PCR, Western Blot, ELISA) durchgeführt. Insbesondere wurden Indikatoren für mögliche Auswirkungen von ER-Stress auf den Lipidstoffwechsel, inflammatorische und antioxidative Prozesse, sowie auf renale Transportmechanismen und den renalen Vitamin-D-Stoffwechsel untersucht. Versuche für die Genanalysen wurden mit beiden Substanzen in jeweils zwei unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt. Da auf Genebene meist keine dosisabhängigen Effekte zu beobachten waren, wurden die Versuche auf Proteinebene nur mit der jeweils höheren Konzentration an Tunicamycin bzw. Thapsigargin durchgeführt.

Probenmaterial aus der oben zitierten Milchkuhstudie (51) konnte für die vorliegende Arbeit verwendet werden, um einen tieferen Einblick in den bovinen Metabolismus während der Früh lactation bzw. bei einer gesteigerten Expression von ER-Stress-Genen zu gewinnen. Insbesondere wurde der Vitamin-D-Stoffwechsel näher untersucht und mögliche Zusammenhänge zwischen letzterem, Laktation und ER-Stress hergestellt. Probenmaterial aus zwei weiteren Versuchen mit Milchkuhen wurden für die vorliegende Arbeit verwendet. Die Studien hatten gezeigt, dass eine Zufütterung polyphenolhaltiger Futtermittel während der Früh lactation zu einer leichten Hemmung von ER-Stress-Genen beim Rind geführt hatte (120; 121). In der vorliegenden Arbeit wurde Probenmaterial aus den genannten Studien verwendet, um mögliche Effekte von Polyphenolen auf den Vitamin-D-Stoffwechsel zu untersuchen.

4.1 ER-Stress in MDBK-Zellen

Zunächst wurden mittels MTT-Test geeignete Konzentrationen der ER-Stress Induktoren Tunicamycin und Thapsigargin für die nachfolgenden Versuche ermittelt. Dafür wurden die Zellen mit der jeweiligen Substanz in steigenden aus der Literatur bekannten Konzentrationen inkubiert und die Zellviabilität der MDBK-Zellen wurde ermittelt. Wie erwartet, nahm die Zellviabilität bei steigender Konzentration der Substanzen ab, wobei Thapsigargin stärkere Effekte hervorrief als Tunicamycin. In beiden Fällen wurden für nachfolgende Analysen zwei Konzentrationen im mittleren Bereich der Skala gewählt. Tunicamycin wurde infolgedessen in den Konzentrationen

0,1 und 1 µg/ml und Thapsigargin in den Konzentrationen 0,1 und 1 µM verwendet. Da es sich bei Tunicamycin um ein Stoffgemisch handelt, der demnach keine molare Masse besitzt, wurde dessen Konzentration wie in der Literatur üblich in µg/ml angegeben.

ER-Stress ist definiert als Ungleichgewicht zwischen der Proteinfaltungskapazität und dem Proteinaufkommen im ER, was zu einer Ansammlung ungefalteter oder fehlgefalteter Proteine führt (8). Eine direkte Messung der angesammelten un- und fehlgefalteten Proteine wäre ideal, um ER-Stress zu detektieren. Eine derartige Methode ist bislang technisch nicht etabliert, weswegen standardmäßig die Aktivierung der drei UPR-Signalwege über IRE1 α , PERK und ATF6 als zuverlässiger Indikator für das Vorliegen von ER-Stress gilt (57). Dies wurde in der vorliegenden Arbeit auf verschiedenen Ebenen überprüft.

Mittels RTD-PCR wurden ausgewählte ER-Stress-Gene untersucht. Es wurde die Hypothese bestätigt, dass die Mehrzahl der gemessenen Gene in beiden Experimenten hochreguliert war.

Die Chaperone BiP (HSPA5) und DNAJC3, beide sowohl ATF-6 Zielgene (4), als auch XBP1 Zielgene (44) waren in ihrer Genexpression durch Behandlung der Zellen mit den ER-Stress-Induktoren deutlich hochreguliert. So auch die Proteindisulfidisomerase PDIA4, ebenfalls XBP1-Zielgen (44). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch die UPR das Ziel verfolgt wurde, ein Gleichgewicht zwischen Proteinaufkommen und Proteinfaltung wiederherzustellen.

Der höchste Effekt war allerdings beim Apoptoseinduktor CHOP (DDIT3) zu sehen, dessen Expression bis zu 20-fach erhöht war. CHOP wird hauptsächlich durch die PERK-eIF2 α -ATF4 Achse reguliert, wobei alle UPR-Signalwege dessen Expression induzieren können (47). Es handelt sich dabei um einen Transkriptionsfaktor, der die Expression von Genen aus der BCL-2-Familie so beeinflusst, dass proapoptotische Proteine stärker exprimiert werden als antiapoptotische (47). Interessanterweise war trotz der sehr hohen relativen mRNA-Konzentrationen von CHOP kein vergleichbarer Anstieg des proapoptotischen Proteins BAX zu beobachten. Dieses blieb mit Ausnahme der Behandlung mit 1 µg/ml Tunicamycin in seiner Genexpression sogar unverändert. Im Gegensatz dazu stieg die Caspase 3, die ebenfalls an apoptotischen Signalwegen beteiligt ist (47), nach Behandlung mit Tunicamycin leicht und nach Behandlung mit Thapsigargin deutlich an. Die Ergebnisse deuten also teilweise auf

eine Induktion der Apoptose hin. Diese wird infolge von ER-Stress dann eingeleitet, wenn ein Gleichgewicht im ER nicht wiederhergestellt werden kann (11; 12). Die gleichzeitige Aktivierung von Signalwegen, die das Überleben der Zelle anstreben und solcher, die den programmierten Zelltod einleiten, zeigt, dass die UPR in Eukaryoten ein komplexer Mechanismus ist und die Übergänge zwischen den verschiedenen Signalwegen fließend sind.

Die Komplexität der Vorgänge bei ER-Stress war auch im Zusammenhang mit dem ERAD-System zu sehen. Letzteres dient dazu, dauerhaft fehlgefaltete Proteine ins Zytoplasma zu schleusen, damit sie dort proteolytisch abgebaut werden (7). XBP1-Zielgene aus dem ERAD-System wurden unterschiedlich durch die ER-Stressoren beeinflusst. Während HERPUD1 (43) in beiden Versuchen eine deutlich erhöhte Genexpression aufwies, blieben die mRNA-Konzentrationen von EDEM1 (44) unverändert.

Zusätzlich zur quantitativen PCR wurden weitere Methoden angewendet, um eine Aktivierung der UPR zu detektieren.

Mittels Western Blot wurde der PERK-Signalweg auf Proteinebene untersucht.

Das ER-Transmembranprotein PERK liegt unter physiologischen Bedingungen als Monomer vor. Nach Aktivierung durch ER-Stress findet eine Oligomerisierung und Phosphorylierung des Proteins statt (10). Dies führt unter anderem zu einer vermehrten Genexpression von ATF4 (33).

In der vorliegenden Arbeit wurden beide Formen des Transmembranproteins mittels Western Blot detektiert und das Verhältnis zueinander berechnet. Es konnte nachgewiesen werden, dass die phosphorylierte Form im Vergleich zur totalen Form von PERK in beiden Experimenten signifikant erhöht war. Dies bestätigte die Ergebnisse auf Genebene bezüglich ATF4, dessen mRNA-Konzentration nach Behandlung mit Tunicamycin und Thapsigargin signifikant erhöht war.

Mittels DNA-Gelelektrophorese konnte eine Aktivierung des IRE1 α -Signalwegs durch Darstellung des XBP1-Splicings bestätigt werden.

IRE1 α besitzt eine Endoribonukleaseeinheit, mit der sie ein Intron aus der mRNA von XBP1 entfernt. Werden die zwei Enden wieder zusammengespleißt, entsteht der Transkriptionsfaktor XBP1s (41), der unter anderem die Expression oben genannter Zielgene induziert. Die Entfernung des Introns durch IRE1 führt dazu, dass XBP1s aus einer geringeren Anzahl an Basenpaaren zusammengesetzt ist als XBP1u. Somit

konnte in der vorliegenden Arbeit der signifikante Anstieg von XBP1s im Vergleich zu XBP1u bildlich dargestellt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die kommerzielle Zelllinie der MDBK-Zellen ein geeignetes Modell für ER-Stress lieferte, wie schon zuvor von Jordan et al. gezeigt worden war (50) und eine Aktivierung der UPR nach Behandlung mit Tunicamycin und Thapsigargin stattgefunden hatte. Dies war auf verschiedenen Ebenen nachweisbar und stellte die Grundlage für die weiteren Analysen dar.

4.2 Wirkung von ER-Stress-Induktoren auf verschiedene Stoffwechselwege in MDBK-Zellen

Es wurden mögliche Auswirkungen von ER-Stress auf den Lipidstoffwechsel, inflammatorische und antioxidative Prozesse, Transportmechanismen und den Vitamin-D-Stoffwechsel untersucht.

4.2.1 Wirkung von ER-Stress-Induktoren auf die mRNA-Konzentrationen von SREBF1, SREBP1-Zielgenen und -Regulatoren

Die Auswirkungen von ER-Stress auf SREBP-Zielgene und -Regulatoren wurden untersucht.

SREBPs spielen eine zentrale Rolle im Lipidstoffwechsel. In vorliegender Arbeit wurde insbesondere die durch SREBP-1c regulierte Lipidsynthese (55) bei ER-Stress untersucht. Das Protein wird von dem *sterol regulatory element binding factor 1* (SREBF1) kodiert (55).

Aus der Literatur ist bekannt, dass alle Signalwege der UPR zu einer gesteigerten Lipidsynthese durch Aktivierung der SREBPs führen (7). Es wurde also die Hypothese aufgestellt, dass auch in MDBK-Zellen eine Hochregulierung der Genexpression ausgewählter SREBP-1 Zielgene stattfinden würde. Zu den untersuchten Zielgenen gehörten die an der Lipogenese beteiligten ACACA, ELOVL6, FASN und G6PD.

Die Induktion einer gesteigerten Lipidsynthese durch die Aktivierung der UPR wurde insbesondere in der Leber vielfach untersucht (7; 56; 57). Sun et al. haben im Jahr 2002 zudem gezeigt, dass SREBPs in der Niere diabetischer Ratten sowie in humanen und murinen Nierenzellen bei Hyperglykämie hochreguliert waren und zu einer gesteigerten FASN-Expression mit nachfolgender Triglyzeridakkumulierung geführt haben (132). Diabetes wurde mehrmals in Zusammenhang mit ER-Stress gebracht (59; 60). Aus diesem Grund hatte die Studie von Sun et al. eine weitere Grundlage für die Hypothese gegeben, dass bei ER-Stress SREBPs auch in Nierenzellen hochreguliert werden.

Im Gegensatz zu den Erwartungen, waren alle SREBP1-Zielgene in beiden Versuchen signifikant herunterreguliert. Dass es keine wesentlichen Unterschiede zwischen einer Behandlung mit Tunicamycin und einer mit Thapsigargin gab, deutet darauf hin, dass nicht die Substanzen *per se* zu einem Abfall der Genexpression geführt haben, sondern die Aktivierung der UPR.

In der Literatur ist beschrieben, dass anhaltender oder sehr starker ER-Stress zu einer Hemmung der Lipidsynthese führen kann (58). Dabei kommt es zu einer dauerhaften hochregulierten Expression von CHOP, die die Hemmung verschiedener Gene herbeiführen kann, die in die Lipidhomöostase involviert sind (133). Mögliche Ursachen der Herunterregulierung des SREBP-Signalwegs in den durchgeführten Versuchen könnten demnach die lange Inkubationszeit von 24 Stunden und die hohe Expressionrate von CHOP sein. Ein Folgeversuch wäre notwendig, um die Auswirkungen von ER-Stress auf den Lipidstoffwechsel im Zeitverlauf und bei steigenden Konzentrationen der ER-Stressoren darzustellen.

Um die durch Tunicamycin und Thapsigargin herbeigeführte Hemmung von SREBF1 und seiner Zielgene näher zu untersuchen wurde die mRNA-Expression von SCAP, INSIG1 und INSIG2 gemessen. SCAP ist das Protein, über das SREBPs im inaktiven Zustand an das ER gebunden sind. Die Bindung des SCAP-SREBP-Komplexes an dem ER ist durch sogenannte Insig-Proteine gewährleistet. Durch äußere Einflüsse kann sich diese Bindung lösen und die Konformation von SCAP ändern. SCAP ist dann in der Lage die SREBPs zum Golgi-Apparat zu eskortieren, wo sie über Spaltungsprozesse aktiviert werden (53). Beispiele aus der Literatur zeigen, dass eine Überexpression von INSIG1 zu einer Unterdrückung der SREBF1-Aktivierung und der hepatischen Lipidsynthese führt (134) und eine SCAP-Induktion mit der Aktivierung

von SREBF1 verbunden ist (135). Aus diesem Grund wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine Behandlung mit Tunicamycin oder Thapsigargin zu einer gesteigerten mRNA-Konzentration von INSIG1 und INSIG2 sowie zu einer verminderten mRNA-Konzentration des SCAP führen würde. Unerwarteterweise war in den MDBK-Zellen die Genexpression von SCAP unabhängig vom verwendeten ER-Stressors signifikant hochreguliert. Außerdem waren die Ergebnisse bezüglich der zwei INSIG-Formen inhomogen: INSIG1 war unter Einfluss von Tunicamycin signifikant herunterreguliert, unter Einfluss von Thapsigargin allerdings vorwiegend unverändert. Wurden die MDBK-Zellen mit Tunicamycin behandelt, blieb die mRNA-Konzentration von INSIG2 unverändert, während Thapsigargin zu einem Anstieg derselben führte. Diese Ergebnisse sind im Widerspruch mit den mRNA-Konzentrationen von SREBF1 und denen der untersuchten SREBP1-Zielgene. Weitere Untersuchungen wären notwendig, um den Wirkmechanismus einer aktivierten UPR auf die Lipidsynthese aufzuklären.

4.2.2 Wirkung von ER-Stress-Induktoren auf die mRNA-Konzentration und die Expression inflammatorischer und antioxidativer Gene in MDBK-Zellen

Es wurden verschiedene Signalwege, die mit Entzündungsprozessen und antioxidativer Abwehr verbunden sind, untersucht.

NLRP3-Inflammasome sind Proteinkomplexe, die aus dem Rezeptor NLRP3, dem Adapterprotein PYCARD und der Pro-Caspase 1 zusammengesetzt sind. Letzterer Bestandteil wird durch den Zusammenbau des Inflammasoms aktiviert und führt unter anderem zur Reifung und Freisetzung der inflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-18 (77). Als Vertreter dieser Gruppe wurden PYCARD und IL-1 β untersucht. IL-1 β ist zusammen mit weiteren inflammatorischen Zytokinen, wie die hier untersuchten IL-6 und TNF α , ein NF- κ B Zielgen (75). NF- κ B ist ein ubiquitär verbreiteter Transkriptionsfaktor, der durch die Aktivierung einer Vielzahl von Zielgenen eine zentrale Rolle in Immunabwehr und Entzündung spielt (64). Der Transkriptionsfaktor selbst wurde hier mittels Western Blot untersucht. Das Akute-Phase-Proteine SAA3 gehört ebenfalls zu den NF- κ B Zielgenen (136; 137) und wurde in der vorliegenden Arbeit auf Genebene untersucht. Das gemessene Caveolin-1 (CAV1) ist ein

Bestandteil der Caveolae, Invaginationen der Zellmembran, deren Hauptfunktion die Endozytose ist. Es wurde entdeckt, dass CAV1 ebenfalls ein NF- κ B Zielgen ist (138), wobei die genaue Rolle, die das Protein im Entzündungsgeschehen spielt, unklar ist (139).

Aus der Literatur ist bekannt, dass ER-Stress zu einer Aktivierung des NLRP-3 Inflammasoms (103; 102) und des NF- κ B Signalwegs (97; 98; 101) führt. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Insgesamt wurden die beschriebenen Signalwege durch ER-Stress vorwiegend herunterreguliert.

PYCARD und das durch das Inflammasom aktivierte IL-1 β wurden durch Tunicamycin signifikant herunterreguliert. Auch die Proteinexpression von NF- κ B war signifikant vermindert. Eine Behandlung mit Thapsigargin rief ähnliche Effekte hervor, diese waren allerdings statistisch nicht signifikant. TNF α war in beiden Versuchen signifikant vermindert. CAV1 wurde durch Tunicamycin ebenfalls gehemmt, während Thapsigargin keine statistisch signifikanten Effekte hervorrief. Zusammenfassend hatte ER-Stress eine vorwiegend antiinflammatorische Wirkung in MDBK-Zellen, insbesondere wenn die Behandlung mit Tunicamycin erfolgte.

Eine Ausnahme war durch IL-6 und SAA3 gegeben. Durch eine Behandlung mit Thapsigargin waren beide Gene in ihrer Expression signifikant erhöht, während sie nach einer Behandlung mit Tunicamycin weitgehend unverändert blieben. IL-6 ist der Hauptregulator der Akute-Phase-Proteine (140). Dies erklärt, warum SAA3 nach einer Behandlung mit Thapsigargin ebenfalls hochreguliert wurde. Dass NF- κ B allerdings nicht vermehrt aktiviert war, spiegelt die Komplexität des Entzündungsgeschehens wider. Anhand der vorliegenden Ergebnisse ist es nicht möglich, eine Aussage darüber zu treffen, ob die Aktivierung der Akute-Phase-Antwort durch den ER-Stress zustande kam, denn eine Behandlung mit Tunicamycin blieb in dem Bereich weitgehend folgenlos, im Gegensatz zur Behandlung mit Thapsigargin. Es ist lediglich zu beobachten, dass IL-6 und SAA3, im Gegensatz zu den anderen untersuchten Genen, nach einer Behandlung mit Tunicamycin keine verminderten mRNA-Konzentrationen aufwiesen. Der intrazelluläre Ca²⁺-Anstieg, der durch Thapsigargin hervorgerufen wird, könnte ein Grund für den IL-6 Anstieg sein. Es wurde in der Vergangenheit gezeigt, dass in murinen peritonealen Makrophagen (141; 142) und in humanen Mikrogliazellen (143) ein intrazellulärer Ca²⁺-Anstieg zu einer vermehrten IL-6 Expression geführt hatte.

Um genauere Aussagen treffen zu können, wäre es nötig, die Expression von IL-6 unter Einfluss weiterer ER-Stressoren zu untersuchen. Außerdem wäre es von Interesse zu sehen, ob auch hier, so wie bei Sattayaprasert et al. nur die Expression des Gens induziert war, oder ob die Zytokinproduktion durch Thapsigargin ebenfalls induziert war.

Mit Ausnahme des Akute-Phase-Proteins IL6 deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dennoch auf eine antiinflammatorische Wirkung von Thapsigargin und Tunicamycin in MDBK-Zellen. Dies zeigte sich sowohl in Bezug auf den NF- κ B-Signalweg, als auch den NLRP3-Inflammasomsignalweg. Diese Ergebnisse unterscheiden sich deutlich zu den meisten Angaben aus der Literatur (32; 97; 101), sind allerdings konform mit anderen Studien, für die ebenfalls Nierenzellen verwendet wurden, wie z.B. Glomerulum- oder Mesangiumzellen der Ratte. Es ist beschrieben, dass ER-Stress eine Resistenz auf inflammatorische Stimuli in Glomerulumzellen verursacht (144; 145). Weiterhin ist in der Literatur beschrieben, dass ER-Stress die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs in Mesangiumzellen von Mensch und Ratte inhibiert, entweder über eine Induktion des NF- κ B-Suppressors C/EBP β (146) oder über eine XBP1-Aktivierung und dadurch Inhibierung von IRE1 (147).

Werden diese Beispiele aus der Literatur zusammen mit den Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit betrachtet, liegt die Vermutung nahe, dass die antiinflammatorische Wirkung von ER-Stress ein nierenspezifisches Phänomen ist.

Ein weiterer Weg, der zu einer Aktivierung des Inflammasoms und des NF- κ B Signalwegs führen kann, ist die Entstehung von Sauerstoffradikalen (102; 97). In der vorliegenden Arbeit war die antioxidative Abwehr nicht induziert. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass ER-Stress keinen oxidativen Stress verursacht hat, was wiederum ein Ausbleiben der Entzündungsreaktion erklären könnte.

Die antioxidative Abwehr wird hauptsächlich durch Nrf2 reguliert, ein Transkriptionsfaktor, zu dessen Zielgenen Antioxidantien und weitere zytoprotektive Enzyme gehören (82). Mittels quantitativer PCR wurden in dieser Arbeit die Antioxidantien SOD1, CAT, NQO1, MGST3, GPX3 untersucht. Genannte Enzyme katalysieren verschiedene Reaktionen, die potentiell schädliche Sauerstoffradikale neutralisieren (82). Weiterhin untersucht wurden die Metallothioneine MT1A und MT2A, Proteine, die in der Lage sind, Metallionen zu binden (86). Die Hämoxigenase

HMOX1, die als Antwort auf Stresssignale gebildet wird, gehört ebenfalls zu den Nrf2 Zielgenen (82) und wurde hier untersucht.

Der Nrf2-Signalweg und die damit verbundene antioxidative Abwehr werden bei ER-Stress in der Regel aktiviert (100). Grund dafür ist die vermehrte Bildung von Sauerstoffradikalen während der Faltungsprozesse im ER, die eine antioxidative Abwehr induzieren (97). Ein weiterer Grund für eine Nrf2-Aktivierung durch ER-Stress ist die Tatsache, dass Nrf2 direkt durch den PERK-Signalweg aktiviert werden kann (99).

In beiden durchgeführten Versuchen blieben die untersuchten Nrf2 Zielgene allerdings meist unverändert oder waren leicht herunterreguliert. Eine Ausnahme stellten MT1A und NQO1 dar. Letzteres Gen war unter Einfluss von Thapsigargin signifikant erhöht. MT1A war unter Einfluss von Tunicamycin konzentrationsabhängig ebenfalls signifikant erhöht, während Thapsigargin zu einem tendenziellen Anstieg des Gens führte.

Der Nachweis der Aktivierung des PERK-Signalwegs hat die Hypothese unterstützt, dass es durch die Behandlungen mit Tunicamycin und Thapsigargin zu einem Anstieg der Nrf2-Zielgene kommen würde. Die Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit der erwartete Anstieg ausblieb, deutet darauf hin, dass der ausgelöste ER-Stress in MDBK-Zellen keine Ansammlung von ROS bewirkt hat. ROS sind starke Induktoren des Nrf2-Signalwegs (81). Die Hemmung des Nf- κ B-Signalwegs und die damit fehlende Entzündungsantwort auf ER-Stress könnten eine weitere Erklärung dafür sein, dass der Nrf2-Signalweg nicht aktiviert wurde, da proinflammatorische Zytokine zur Bildung von ROS beitragen (148). Demnach ist es möglich, dass die fehlende Aktivierung der antioxidativen Abwehr ebenfalls eine nierenspezifische Folge von ER-Stress ist.

Unter den untersuchten Nrf2-Zielgenen befanden sich auch zwei Metallothioneine (MT). MTs sind intrazelluläre metallbindende Proteine, die unter anderem eine Rolle in Homöostase und Transport essentieller Metallionen (Zn^{2+} , Cu^{2+}) und in Entgiftungsprozessen durch Bindung von Schwermetallen (Cd^{2+} , Hg^{2+}) spielen. Ihre Expression wird unter anderem durch Oxidantien stimuliert, weswegen eine Rolle in der antioxidativen Abwehr vermutet wird (86). Die Isoformen MT1 und MT2 werden in

der Literatur häufig als gleichwertig betrachtet, weswegen oftmals die Begriffe „MT“ oder „MT1/MT2“ zu finden sind, wenn beide Isoformen gemeint sind (86; 149).

In der vorliegenden Arbeit war der Effekt von ER-Stress auf die zwei Isoformen (die hier anhand der Gene MT1A und MT2A untersucht wurden) nicht gleichwertig. Während MT2A in beiden Versuchen signifikant herunterreguliert war, stieg MT1A vorwiegend an. Diese Ergebnisse werden durch eine Studie unterstützt, bei der festgestellt wurde, dass MT1 und MT2 unterschiedliche Bindungsaffinität zu Metallionen haben und dadurch nicht als funktionell gleichwertige Isoformen betrachtet werden können (149).

Weitere Untersuchungen sind angebracht, um die genauen Funktionen von MT1 und MT2 bei ER-Stress zu untersuchen.

Zu den Wirkungen von ER-Stress auf inflammatorische und antioxidative Prozesse in MDBK-Zellen lässt sich abschließend sagen, dass die untersuchten Zielgene nach einer 24-stündigen Behandlung nicht den erwarteten Anstieg gezeigt haben. Zusätzliche Versuche im Zeitverlauf und die direkte Detektierung von Sauerstoffradikalen wären in einer Folgearbeit notwendig, um für weitere Aufklärung zu sorgen.

4.2.3 Wirkung von ER-Stress-Induktoren auf die mRNA-Konzentration ausgewählter Transporter in MDBK-Zellen

Die Niere spielt eine essentielle Rolle in der Erhaltung des Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalts (1). Die Gene einiger renaler Transporter wurden mittels quantitativer PCR untersucht, um zu beurteilen, ob sie durch ER-Stress beeinflusst sein könnten. Die verwendeten MDBK-Zellen sind bovine Nierenzellen, die das Verhalten von distalen Tubuluszellen zeigen (122).

Die basolaterale Na^+/K^+ -ATPase ist von großer Bedeutung für den Elektrolythaushalt, da sie die Na^+ -Konzentration im Zellinneren niedrig hält und dadurch den Antrieb für sekundär aktive Transporter gibt (1). Das dafür kodierende Gen, ATP1A1 wurde weder durch Tunicamycin noch durch Thapsigargin beeinflusst. Das deutet darauf hin, dass

ER-Stress keinen Einfluss auf diesen primären Transporter in distalen Tubuluszellen hat.

Die Expression verschiedener Ca^{2+} -Transporter wurde untersucht. Aus der Literatur ist bekannt, dass der transzelluläre Ca^{2+} -Transport eine wichtige Rolle in distalen Nierentubuli spielt. Dieser Prozess, der durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und Parathormon stimuliert wird (150) bewirkt, dass 98-99% des filtrierte Ca^{2+} in Nierentubuli reabsorbiert werden (151). Aus der Literatur ist bekannt, dass distale Tubuluszellen zwei basolaterale Ca^{2+} -Transporter ATP2B1 und SLC8A1 exprimieren, wie auch den intrazellulären Ca^{2+} -Transporter CALB1 (152). Die Niere ist im Zusammenhang mit der Ca^{2+} -Homöostase ein wichtiges Zielorgan von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Die Behandlung von MDBK-Zellen mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ hatte die Expression von ATP2B1 und CALB1 in MDBK-Zellen induziert (122; 152).

In der vorliegenden Studie wurden Ca^{2+} -Transporter sowohl durch Tunicamycin als auch durch Thapsigargin in ihrer Genexpression beeinflusst, allerdings waren die Effekte interessanterweise nicht homogen. Tunicamycin führte zu einer signifikant erhöhten Expression des intraluminalen Transporters CALB1, während Thapsigargin diesen signifikant herunterregulierte. Die basolaterale Ca^{2+} -ATPase ATP2B1 blieb weitgehend unverändert; lediglich eine Behandlung mit $1 \mu\text{g/ml}$ Tunicamycin führte zu einer signifikanten Verminderung deren relativen mRNA-Konzentration.

Die unterschiedlichen Ergebnisse, die Tunicamycin und Thapsigargin hervorriefen, deuten darauf hin, dass nicht ER-Stress allein den Ca^{2+} -Transport beeinflusst, sondern, dass noch weitere Faktoren eine Rolle spielen. Thapsigargin ist eine Substanz, die im Gegensatz zu Tunicamycin aktiv in den intrazellulären Ca^{2+} -Haushalt eingreift, indem sie die Ca^{2+} -Pumpe des Endoplasmatischen Retikulums SERCA hemmt und dadurch einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bewirkt (11). Eine vermehrte Expression des CALB1 würde dem Ca^{2+} -Anstieg entgegenwirken und Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration geringhalten. Die verminderte Genexpression von CALB1 nach einer Behandlung mit Thapsigargin könnte sich dadurch erklären lassen, dass der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration so hoch war, dass dieser Weg von der Zelle für die Einleitung der Apoptose genutzt werden sollte. Ein Ca^{2+} -Überschuss im Zytosol und der Verbrauch der zellulären Calciumreserven aus dem Endoplasmatischen Retikulum können über verschiedene Wege die Apoptose einleiten (153; 154). In der Literatur ist beschrieben, dass der

Einfluss, den Thapsigargin auf die Ca^{2+} -Homöostase in prostatistischen Tumorzellen hat (Aufbrauch des Calciumpools aus dem ER und sekundärer Anstieg der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration) mit der Einleitung der Apoptose zusammenhängen könnte (155). Die erhöhte Genexpression von CALB1, die stattdessen nach einer Behandlung mit Tunicamycin festzustellen ist, könnte darauf hindeuten, dass eine Apoptose durch Ca^{2+} -Überschuss in diesem Fall verhindert werden sollte. Unterstützend zu dieser Hypothese können die Ergebnisse aus dem MTT-Test herangezogen werden. In den verwendeten Konzentrationen hatte Thapsigargin die Zellviabilität der MDBK-Zellen deutlich stärker beeinträchtigt als Tunicamycin. Während die hohe Dosis von Tunicamycin zu einer verminderten Zellviabilität von circa 18% führte zeigten Zellen, die mit der hohen Dosis Thapsigargin behandelt wurden eine verminderte Zellviabilität von circa 32%.

Um diese Hypothese weiter zu verfolgen, wäre es von Vorteil die intrazelluläre Kalziumkonzentration in einer Folgearbeit zu messen.

Die mRNA-Konzentration von Transportern von Zuckern und Aminosäuren wurde mittels quantitativer PCR ebenfalls untersucht.

Linden et al. hatten gezeigt, dass der weitverbreitete Glucosetransporter GLUT1 über das gesamte Nephron der Ratte verteilt ist. GLUT1 befindet sich auf der basolateralen Membran der Zellen und transportiert Glucose entlang des Konzentrationsgradienten (156). Einen Nachweis, dass luminale Na^+ -Glucose-Symporter ebenfalls im distalen Nephron zu finden sind, gibt es nach unserem Wissen nicht. Dies entspricht den bisherigen Kenntnissen, dass die Rückresorption von Glucose aus dem Primärharn nur in den proximalen Teilen des Nephrons stattfindet (1).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Genexpression von GLUT1 (SLC2A1) nach einer Behandlung mit Tunicamycin konzentrationsabhängig und mit Thapsigargin konzentrationsunabhängig signifikant erhöht war.

Da die distalen Tubuli keine Rolle in der Glucoserückresorption zu spielen scheinen, ist es mit den MDBK-Zellen nicht möglich festzustellen, ob die Rückresorption von Glucose aus dem Primärharn bei ER-Stress prinzipiell erhöht ist. Es können dennoch Vermutungen geäußert werden, dass es eine mögliche Verbindung zwischen ER-Stress und Diabetes Typ 2 geben könnte. Die Hypothese wird dadurch unterstützt, dass die Expression von GLUT1 in den proximalen Tubuli diabetischer Ratten

signifikant erhöht war (156) und eine Behandlung diabetischer Ratten mit Insulin zu einer verminderten tubulären Expression von SLC2A1 führte (157). Charakteristisch für Diabetes Typ 2 ist eine anhaltende Hyperglykämie, bedingt durch Insulinresistenz in Muskel-, Fett- und Leberzellen und/oder eine unzureichende Insulinproduktion durch β -Zellen aus dem Pankreas (158). Lindenmeyer et al. haben gezeigt, dass Hyperglykämie ER-Stress in renalen Epithelzellen induziert (159). Demnach ist es wahrscheinlich, dass die erhöhte Expression von SLC2A1 in mit TM oder TG behandelten MDBK-Zellen eine Folge von ER-Stress ist. Einige Studien haben außerdem gezeigt, dass ER-Stress eine vermehrte Expression von natriumabhängigen Glukosetransportern (SGLT) 1 und 2 in verschiedenen Zellpopulationen bewirkt (160; 161; 162). Dieser Effekt wurde als zytoprotektiver Mechanismus um den erhöhten metabolischen Stoffwechsel während ER-Stress abzudecken interpretiert (163). Da es sich bei MDBK-Zellen um distale Tubuluszellen handelt und diese nicht in der primären Glukoseresorption involviert sind, wurde die SGLT-Expression in dieser Studie nicht berücksichtigt. Weitere Untersuchungen, die sich spezifisch mit proximalen Tubulusabschnitten beschäftigen, wären nötig, um die genannten Hypothesen weiter zu verfolgen.

Ein weiterer Vorgang, der zu 95-99% in proximalen Tubulusabschnitten stattfindet, ist der Transport von Aminosäuren (164). In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass Aminosäuretransporter sowohl luminal als auch basolateral ebenfalls in distalen Tubuluszellen zu finden sind. Untersucht wurden SLC3A1 als Bestandteil des luminalen Cystintransporters rBAT/ $b^{0,+}$ AT und SLC7A8 als Bestandteil des basolateralen Transporter für neutrale Aminosäuren 4F2hc/LAT2.

Der luminale Transporter rBAT/ $b^{0,+}$ AT besteht aus einer schweren Kette (rBAT, SLC3A1) und einer leichten Kette ($b^{0,+}$ AT, SLC7A9). Er ist ein obligatorischer Antiporter, der Cystin und kationische Aminosäuren ins Zellinnere transportiert und mit neutralen Aminosäuren austauscht. Angeborene Defekte dieses Transporters verursachen Cystinurie. Der basolaterale Transporter 4F2hc/LAT2 besteht ebenfalls aus einer schweren (4F2hc, SLC3A2) und einer leichten Kette (LAT2, SLC7A8). Auch hier findet ein obligatorischer Antiport statt, der vorwiegend dazu dient, das intrazelluläre Cystin aus der Zelle auszuschleußen, im Tausch gegen andere neutrale Aminosäuren (164).

In der vorliegenden Arbeit führte eine Behandlung mit Tunicamycin zu einem signifikanten Abfall beider Transporter, während Thapsigargin nur den luminalen SLC3A1 herunterregulierte. SLC7A8 wurde durch Thapsigargin hingegen signifikant hochreguliert.

Die vorwiegende Verminderung der Expression von Aminosäuretransportern könnte mit der Hemmung der Proteinsynthese verbunden sein, die durch den PERK/eIF2 α -Signalweg bedingt ist. Eine Hemmung der Proteinsynthese ist eine der Möglichkeiten das Proteinaufkommen im ER zu mindern und so dem Ungleichgewicht zwischen Proteinaufkommen und Proteinfaltungskapazität im ER entgegenzuwirken (4). Die Tatsache, dass weniger Aminosäuren für die Proteinsynthese benötigt werden, könnte zur Folge haben, dass der Aminosäuretransport insgesamt herunterreguliert wird, was die Mehrzahl der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erklären würde. Der Anstieg eines Anteils des basolateralen Transporters 4F2hc/LAT2 unter Einfluss von Thapsigargin deutet daraufhin, dass noch weitere Faktoren als die Proteinsynthese einen Einfluss auf die Expression der Aminosäuretransporter haben. Um die Ergebnisse diesbezüglich zu vervollständigen wäre es nötig, die Expression der schweren Kette SLC3A2 ebenfalls zu untersuchen. Ähnlich wie bei dem Glukosetransport wäre es außerdem sinnvoll, den Aminosäuretransport anhand von proximalen Tubuluszellen zu untersuchen, da dieser vorwiegend dort stattfindet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit einen Hinweis darauf geben, dass ER-Stress einen Einfluss auf renale Transporter hat. Dies müsste dennoch im Einzelnen näher untersucht werden, gegebenenfalls mit einem Fokus auf Transportmechanismen in proximalen Abschnitten des Nephrons.

4.2.4 Wirkung von ER-Stress-Induktoren auf Gene und Metaboliten des Vitamin-D-Stoffwechsels in MDBK-Zellen

Die Synthese und die Bioaktivierung des Vitamin D₃ gehören zu einem mehrstufigen Prozess, der vorwiegend in Haut, Leber und Niere stattfindet. Unter Einwirkung von UV-Strahlung entsteht in der Haut aus 7,8-Dehydrocholesterol die inaktive Form des Vitamin D₃ (Cholecalciferol). Dieses wird zur Leber transportiert, wo es von der 25-Hydroxylase (CYP2R1) zum 25-Hydroxyvitamin D₃ umgewandelt wird, das wiederum

in der Niere durch die 1α -Hydroxylase (CYP27B1) zum 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ transformiert wird. Letzteres, auch bekannt als Calcitriol, ist ein Steroidhormon, das die bioaktive Form des Vitamin D₃ darstellt. Aufgrund seiner lipophilen Eigenschaft benötigt Calcitriol einen intrazellulären Rezeptor, den Vitamin-D-Rezeptor (VDR), um seine Wirkung in den Zielgeweben entfalten zu können (104). Die Enzyme, die Vitamin D₃ aktivieren (CYP2R1, CYP27B1) gehören, so wie die 24-Hydroxylase (CYP24A1), die Calcitriol abbaut, zur Familie der Cytochrom P450 Enzyme (106).

Ursprünglich wurde gedacht, dass die proximalen Nierentubuli Hauptsyntheseort von 1,25(OH)₂D₃ seien (165). Diese Aussage erwies sich als obsolet, nachdem CYP27B1 geklont wurde (166) und die mRNA- und Proteinexpression von CYP27B1 in verschiedenen Abschnitten des Nephrons, einschließlich des distalen Tubulus nachgewiesen wurden (167). Passend zu diesen Ergebnissen konnte mit der vorliegenden Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass CYP27B1 in MDBK-Zellen, die aus distalen Tubuluszellen stammen, exprimiert wird.

Der renale Vitamin-D-Stoffwechsel wurde in der vorliegenden Arbeit mittels quantitativer PCR und ELISA untersucht. Nach unseren Kenntnissen wurde mit dieser Arbeit der Einfluss von ER-Stress auf Vitamin-D-Metaboliten ebenfalls erstmals untersucht.

Auf Genebene konnte gezeigt werden, dass unabhängig von der auslösenden Substanz die Behandlung einen signifikanten Anstieg der 1α -Hydroxylase und einen signifikanten Abfall der 24-Hydroxylase bewirkte. Ein Anstieg der Genexpression von VDR war ebenfalls zu beobachten. Die Konzentration von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃, die mittels ELISA im Überstand der MDBK-Zellen gemessen wurde, stieg ebenfalls in beiden Versuchen signifikant um 15% an.

Die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass ER-Stress zu einer vermehrten Aktivierung und einem verminderten Abbau von Vitamin D₃ führt. Die erhöhte Konzentration an Calcitriol, die im Zellüberstand gemessen wurde, könnte einer der Wege sein, mit dem die Zelle eine Minderung von ER-Stress herbeiführt.

In der Literatur ist beschrieben, dass 1,25(OH)₂D₃ die mRNA-Konzentration von CALB1 stimuliert (122). Dies fand in der vorliegenden Arbeit nicht statt, wie in Kapitel 4.2.3 beschrieben. Es wird vermutet, dass der schwache Anstieg von 1,25(OH)₂D₃ (+ 15%) keinen Effekt auf die CALB1-mRNA hatte, vor allem da TM und TG

entgegengesetzte Wirkungen auf die CALB1-Expression hatten. Diese, wie im vorherigen Kapitel beschrieben, beruhten wahrscheinlich auf die unterschiedliche Wirkung von TM und TG auf den intrazellulären Kalziumstoffwechsel.

Aus der Literatur ist außerdem bekannt, dass Vitamin D ER-Stress mindern kann (113; 112; 114) und Vitamin-D-Mangel zu einem Anstieg von ER-Stress führen kann (115). In einer neueren Studie, die sich speziell mit Nierenzellen beschäftigte, wurde gezeigt, dass 1,25(OH)₂D₃ den LPS-induzierten Signalweg von NF-κB in renalen Tubuluszellen hemmt. Diese Tatsache könnte eine Erklärung für eine 1,25(OH)₂D₃ medierte antiinflammatorische Aktivität während einer LPS-induzierten akuten Nierenerkrankung sein (168). In der vorliegenden Arbeit stieg unter Einfluss von beiden verwendeten ER-Stressoren VDR signifikant an. Es wird vermutet, dass dieser Anstieg dazu führen könnte, dass MDBK-Zellen sensibler auf eine antiinflammatorische und somit zytoprotektiven Wirkung von 1,25(OH)₂D₃ reagieren könnten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse hinweisend auf eine vermehrte Calcitriolbildung bei ER-Stress sind und diese gegebenenfalls antiinflammatorisch in MDBK-Zellen wirken könnte. Die Messung der intrazellulären Konzentration von Calcitriol wäre in einem Folgeversuch notwendig, um für weitere Aufklärung in diesem bisher noch wenig erforschten Gebiet zu sorgen.

4.3 Wirkung von Frühlaktation und polyphenolhaltiger Fütterung auf den Vitamin-D-Stoffwechsel beim Rind

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass unter Einfluss von ER-Stressoren eine vermehrte Expression der 1α-Hydroxylase (CYP27B1) und eine verminderte Expression der 24-Hydroxylase (CYP24) in MDBK-Zellen stattfindet. Eine erhöhte Synthese des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ konnte ebenfalls gezeigt werden. Die Synthese und die Bioaktivierung des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ findet vorwiegend in Haut, Leber und Niere statt. Aufgrund der interessanten Ergebnisse bezüglich des renalen Vitamin-D-Stoffwechsels in-vitro, wurde die Hypothese aufgestellt, dass es bei einer Aktivierung der UPR in der Leber ebenfalls zu einem positiven Einfluss des

Vitamin-D-Stoffwechsels kommen würde und dadurch zu einer erhöhten Expression der 25-Hydroxylase (CYP2R1).

Gessner et al. haben gezeigt, dass in der Frühaktation eine vermehrte Expression von ER-Stress-Genen in der Leber laktierender Rinder stattfindet (51). Probenmaterial aus diesem Versuch konnte verwendet werden, um weitere Untersuchungen einzuleiten. Weitere Details zum Versuchsausbau sind im Kapitel 2.2.5 und in der entsprechenden Originalstudie (51) beschrieben.

Im Vergleich zur relativen mRNA-Konzentration 3 Wochen *ante partum*, die als Kontrolle gesetzt wurde, stieg die Konzentration der Vitamin-D-25-Hydroxylase eine Woche *post partum* signifikant an und fiel im Laufe der Zeit bis zur 14. Woche *post partum* wieder ab. Einen sehr ähnlichen Verlauf hatten auch einige ER-Stress-Gene gezeigt (51), was einen Zusammenhang zwischen den zwei Stoffwechselwegen vermuten lässt.

Es ist beschrieben, dass die Vitamin-D-25-Hydroxylase (CYP2R1) sowohl Vitamin D₃ als auch Vitamin D₂ hydroxyliert (104). Um die Untersuchungen bezüglich des Vitamin-D-Stoffwechsels während der Laktation weiter zu vertiefen, wurden mittels Massenspektrometrie die Konzentrationen von 25-Hydroxyvitamin D₂ und 25-Hydroxyvitamin D₃ in Plasmaproben gemessen. Plasmaproben und Leberbiopsien stammen aus dem selben Versuch (siehe Kapitel 2.2.5). Während 25-Hydroxyvitamin D₂ *ante partum* signifikant höher als im gesamten gemessenen Zeitraum *post partum* war, stieg die Konzentration von 25-Hydroxyvitamin D₃ ab der 5. Woche *post partum* signifikant an.

In der Literatur ist beschrieben, dass Vitamin D₂ ausschließlich über die Nahrung aufgenommen wird, während Vitamin D₃ aus der Nahrung gewonnen wird und aus dem in der Haut vorhandenen 7-Dehydrocholesterol synthetisiert werden kann (111). Dadurch, dass die Versuchstiere aus der vorliegenden Arbeit im Stall gehalten wurden, ist die Vitamin-D-Synthese in der Haut aufgrund unzureichender UV-Strahlung wahrscheinlich eher zu vernachlässigen. Der postpartale Anstieg von 25-OH-Vitamin D₃ ist demnach eher durch eine erhöhte Futteraufnahme und damit eine höhere Aufnahme von Vitamin D zu erklären. Im Vergleich zur Genexpression der 25-Vitamin D-Hydroxylase, die ihren Höhepunkt eine Woche *post partum* hat, wirkt der 25-OH-Vitamin D₃-Spiegel im Plasma verzögert, bei dem die maximale Konzentration 14

Wochen *post partum* zu verzeichnen ist. Dies hängt sehr wahrscheinlich von der langen Halbwertszeit dieses Vitamin-D-Metabolits ab, die bei Rindern zwischen 10 und 34 Tagen beträgt (169).

In der vorliegenden Arbeit wurde die hepatische Vit-D-25-Hydroxylase bei Rindern zusätzlich unter Einfluss polyphenolhaltiger Fütterung untersucht.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Polyphenole eine hemmende Wirkung auf ER-Stress haben (117; 118; 119). In Milchkuhversuchen wurde gezeigt, dass die Zufütterung von polyphenolhaltigem Futter zu einem leichten Abfall der Expression von ER-Stress- und Entzündungsgenen führt (120; 121). In den zitierten Milchkuhversuchen wurden die Tiere in zwei Gruppen aufgeteilt: die Kontrollgruppe, der eine art- und leistungsgerechte Totalmischration gefüttert wurde und eine Behandlungsgruppe, bei der im Zeitraum 3 Wochen a.p. bis 9 Wochen p.p. 1% der totalen Mischration aus polyphenolhaltigen Produkten bestand. In einem Versuch wurde Traubentrester (121) zugefüttert, im anderen ein Pflanzenpräparat bestehend zu 95% aus grünem Tee und zu 5% aus Curcumaextrakt (120).

Probenmaterial aus genannten Milchviehfütterungsversuchen konnte für die vorliegende Arbeit verwendet werden. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die hepatische Vitamin-D-25-Hydroxylase (CYP2R1) vermindert exprimiert sein würde. Die Genexpression der Vitamin-D-25-Hydroxylase wies unter Einfluss von polyphenolhaltigem Futter allerdings eine und drei Wochen *post partum* keine Veränderungen auf. Fehlende Signifikanzen können auch durch die relativ hohen Standardabweichungen bedingt sein.

Betrachtet man die Gesamtheit der Ergebnisse aus den genannten Tierversuchen scheint eine Korrelation zwischen ER-Stress-Genen und dem hepatischen Vitamin-D-Stoffwechsel während der Laktation plausibel, auch wenn eine Zufütterung von Polyphenolen keine Wirkung gezeigt hatte. Die Aktivität der 25-Hydroxylase bei laktierenden Rindern spiegelt sich in die Plasmakonzentrationen von 25-OH-Vitamin D₃ wieder. Da während der Laktation außerordentlich viel Kalzium mobilisiert werden muss und deswegen eine ausreichende Versorgung mit Vitamin D von großer Bedeutung ist, könnte die Steigerung des Vitamin-D-Stoffwechsels unabhängig vom ER-Stress stattfinden und allein durch die Stoffwechsellage, die im sensiblen Zeitraum zwischen Geburt und Laktation vorliegt, bedingt sein

Mit dieser Arbeit konnten anhand von *in-vitro* und *in-vivo*-Versuchen Zusammenhänge zwischen ER-Stress, Vitamin-D-Stoffwechsel und Laktation dargestellt werden. Dies könnte eine Grundlage für weitere Untersuchungen darstellen. In einer Folgearbeit könnte die Serumkonzentration von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃, der biologisch aktiven Form des Vitamin D gemessen werden, um zu überprüfen, ob die Ergebnisse der Genexpression und der Massenspektrometrie sich dort bestätigen lassen. Weiterhin wäre es von Interesse, die Expression des Vitamin-D-Rezeptors im Darm laktierender Rinder zu messen, da 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ die intestinale Ca²⁺-Absorption über VDR-medierte Genexpression beeinflusst (170).

5 Zusammenfassung

Das Endoplasmatische Retikulum (ER) ist ein Zellorganell eukaryotischer Zellen, in dem u.a. die Proteinfaltung stattfindet. Übersteigt das Proteinaufkommen im ER dessen Faltungskapazität, liegt ER-Stress vor.

In der Literatur ist beschrieben, dass in der Leber frühlaktierender Rinder ER-Stress-Gene verstärkt exprimiert werden. Bisher ist wenig über die Folgen von ER-Stress im bovinen Organismus bekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Kenntnisse über die sensible Stoffwechsellage der Frühlaktation beim Rind zu erweitern, indem die Folgen von ER-Stress in der kommerziell erhältlichen Zelllinie der bovinen distalen Tubuluszellen *Madin-Darby bovine kidney* (MDBK) untersucht wurden.

Die Induktion von ER-Stress in MDBK-Zellen mit Tunicamycin (TM) und Thapsigargin (TG) wurde mittels *real time detection polymerase chain reaction* (RTD-PCR), DNA-Gelelektrophorese und Western Blot nachgewiesen. Es wurden die Einflüsse der Behandlungen auf die mRNA-Konzentration und Expression von Genen des Lipidstoffwechsels, von inflammatorischen und antioxidativen Genen erforscht. Weiterhin wurde die Expression von Genen, die für renale Transporter kodieren sowie von solchen, die für Enzyme und Metaboliten des Vitamin-D-Stoffwechsels kodieren analysiert. Die Untersuchung des Lipidstoffwechsels fokussierte sich auf die Lipidsynthese: es wurden *sterol regulatory element binding protein* (SREBP)-1-Zielgene sowie Gene, die für SREBP-Regulatorproteine kodieren untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass beide verwendeten ER-Stressoren zu einer signifikanten Expressionsminderung von SREBP1-Zielgenen führten, gleichzeitig aber die inhomogene Expression der Regulatorgene nicht im Einklang mit einer verminderten SREBP1-Aktivierung stand. Überraschend waren ebenfalls die Auswirkungen auf den inflammatorischen Signalweg des Nuklearfaktors (NF)- κ B und seiner Zielgene, die vorwiegend eine Herunterregulation der Entzündungsgene und -proteine zeigten. So waren auch die der antioxidativen Abwehr dienenden *nuclear factor E2-related factor 2* (Nrf2)-Zielgene teilweise herunterreguliert. Verschiedene Gene, die für zelluläre renale Transporter kodieren, wurden ebenfalls untersucht. Allerdings war es nicht möglich, einen eindeutigen Zusammenhang zwischen ER-Stress und der mRNA-

Expression renaler Transporter darzustellen, da die Ergebnisse vom ER-Stressor und den verschiedenen Transportern abhängig waren.

Nach diesen allgemeinen Recherchen zu den Auswirkungen von ER-Stressoren auf verschiedene zelluläre Signalwege wurde der bovine Vitamin-D-Stoffwechsel im Zusammenhang mit ER-Stress und Laktation tiefgründiger erforscht. Durch RTD-PCR und *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) wurde gezeigt, dass die Synthese der biologisch aktiven Form des Vitamin D₃ in MDBK-Zellen durch Aktivierung der UPR hochreguliert worden war.

Aufgrund der interessanten Ergebnisse bezüglich des Vitamin-D-Stoffwechsels in MDBK-Zellen, wurden weitere Untersuchungen von Probenmaterial aus verschiedenen *in-vivo* Studien mit Milchkühen in der Frühaktation durchgeführt. Eine Aktivierung von ER-Stress-Genen in der Leber sowie eine leicht hemmende Wirkung von Polyphenolen auf ER-Stress war in den Studien, die das Probenmaterial für die geplanten Analysen lieferten, nachgewiesen worden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der 25-Hydroxylase in Leberproben untersucht: dieses hepatische Enzym, das der Aktivierung von Vitamin D dient, stieg eine Woche *post partum* (p.p.) an und fiel in den darauffolgenden Wochen wieder ab. Außerdem wurde im Plasma mittels Massenspektrometrie die Konzentration von Vitamin-D-Metaboliten ermittelt: während die Konzentration von 25-Hydroxyvitamin D₂ *ante partum* (a.p.) signifikant höher war als im untersuchten postpartalen Zeitraum, stieg die Konzentration von 25-Hydroxyvitamin D₃ zwischen der 3. Woche a.p. und der 14. Woche p.p. stetig an. Die Anreicherung der Futtermittel frühlaktierender Rinder mit polyphenolhaltigen Produkten hatte keine Auswirkungen auf den untersuchten Vitamin-D-Stoffwechsel.

Insgesamt ist es mit dieser Arbeit gelungen, allgemeine Kenntnisse zu den Auswirkungen von ER-Stressoren auf verschiedene Signalwege in einer bovinen Zelllinie zu gewinnen. Es konnte ein detailliertes Bild des bovinen Vitamin-D-Stoffwechsels im Zusammenhang mit ER-Stress und Laktation dargestellt werden. Dies ist ein wichtiger Schritt für ein besseres Verständnis der bovinen Stoffwechsellage während der Laktation und könnte zu einer gesteigerten Tiergesundheit während dieses sensiblen Zeitraums beitragen. In Folgestudien wäre es von Interesse, das Wissen zu den Auswirkungen von ER-Stress auf die untersuchten Stoffwechselwege beim Rind zu vertiefen und auf den Metabolismus *in-vivo* zu übertragen, um konkrete Ansätze für eine Verbesserung der Tiergesundheit während der Laktation zu finden.

6 Summary

Endoplasmic reticulum (ER) is an organelle in eukaryotic cells. This organelle has different functions, of which protein folding and transport are of primary importance. An imbalance between the load of unfolded proteins and the folding capacity of the ER is called ER-stress.

An increased ER-stress genes expression in the liver of dairy cows during early lactation is reported in literature. However, few studies are available investigating ER-stress in the bovine organism. Goal of the present study was to enlarge knowledge about the sensitive metabolic status of early lactation in cattle by investigating effects of ER-stress in the commercially available bovine kidney cell-line of distal tubular Madin-Darby bovine kidney (MDBK)- cells.

The induction of ER-stress in MDBK-cells with Tunicamycin (TM) and Thapsigargin (TG) was detected by real time detection polymerase chain reaction (RTD-PCR), DNA gel electrophoresis and western blot. Consequences of the treatment on lipid metabolism, inflammation, antioxidative processes, renal transporters and vitamin D metabolism were investigated. The studies of genes of lipid metabolism focused on lipid synthesis: sterol regulatory element binding protein (SREBP)-1 target genes and SREBP regulatory genes. Results showed a downregulation of SREBP1 target genes after treatment with tunicamycin or thapsigargin. However, at the same time, the inhomogeneous results of SREBP1 regulatory genes were not in line with a downregulation of SREBP1. Effects on the inflammation pathway of nuclear factor (NF)- κ B and its target genes surprisingly showed a downregulation of inflammatory genes and proteins. Also nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) target genes, which are involved in antioxidative processes, were partly downregulated. Different genes which code for renal cellular transport proteins were also investigated. However, it was not possible to show a clear correlation between ER-stress and kidney transport mechanisms, as results depended on the ER-stress inducer and the different transporter genes.

After this generic study about effects of ER-stress on different cellular pathways, the bovine vitamin D metabolism was explored more deeply in correlation with ER-stress, inflammation and lactation. Through RTD-PCR, western blot and enzyme linked

immunosorbent assay (ELISA) it was shown that the synthesis of the biological active form of vitamin D₃ was upregulated in MDBK-cells during ER-stress.

Further analyses were conducted on the basis of samples of in-vivo studies on dairy cows. Vitamin D enzymes and metabolites were investigated in liver and plasma samples from dairy cows during early lactation. Gene expression of hepatic 25-hydroxylase, which partly activates vitamin D, increased one week *post partum* (p.p.) and decreased during the following weeks. The concentration of vitamin D metabolites in bovine plasma was detected via mass spectrometry analyses. While the concentration of 25-hydroxyvitamin D₂ was significantly higher *ante partum* (a.p.) than in the postpartum period, the concentration of 25-hydroxyvitamin D₃ continually rose from 3 weeks a.p. to 14 weeks p.p.. Feed supplementation with polyphenols on diet of dairy cows did not have any effect on the analyzed vitamin D metabolism.

Overall, through the present study it was achieved to get a generic knowledge about effects of ER-stress on different pathways in a bovine cell line. A detailed picture of the bovine vitamin D metabolism in correlation with ER-stress, inflammation and lactation could also be obtained. This is a big step for a better understanding of bovine metabolic status during lactation and could help to improve cattle health during such a sensitive period. In further studies it could be interesting to deepen knowledge about the effects of ER-stress on those pathways, that the present study has just analyzed in a generic way.

7 Literaturverzeichnis

1. **von Engelhardt, W und Breves, G.** *Physiologie der Haustiere*. 3. Auflage. s.l. : Enke Verlag, 2010. S. 292-320. ISBN: 978-3-8304-1078-2.
2. **Kaufman, R J.** Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev.* 1999, Bd. 13, 10, S. 1211-33.
3. **Munk, K.** *Taschenlehrbuch Biologie - Biochemie Zellbiologie*. Stuttgart : Georg Thieme Verlag KG, 2008. S. 399-408. ISBN 978-3-13-144831-6.
4. **Schröder, M und Kaufman, R J.** The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem.* 2005, Bd. 74, S. 739–89.
5. **Campbell, N A, et al.** *Campbell Biologie*. 10. Heidelberg : Pearson, 2015. ISBN 3-86894-259-9.
6. **Ellgaard, L und Helenius, A.** Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003, Bd. 4, 3, S. 181-91.
7. **Bravo, R, et al.** Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration. *Rev Cell Mol Biol.* 2013, Bd. 301, S. 215-90.
8. **Cnop, M, Foufelle, F und Velloso, L A.** Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends Mol Med.* 2011, Bd. 18, 1, S. 59-68.
9. **Hetz, C.** The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012, Bd. 13, 2, S. 89-102.
10. **Ron, D und Walter, P.** Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007, Bd. 8, 7, S. 519-29.
11. **Breckenridge, D G, et al.** Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene.* 2003, Bd. 22, 53, S. 8608–18.
12. **Rao, R V, Ellerby, H M und Bredesen, D E.** Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ.* 2004, Bd. 11, 4, S. 372–80.

13. **Cox, J S, Shamu, C E und Walter, P.** Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell*. 1993, Bd. 73, 6, S. 1197-1206.
14. **Mori, K, et al.** A transmembrane protein with a cdc2+/CDC28-related kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus. *Cell*. 1993, Bd. 74, 4, S. 743-56.
15. **Harding, H P, Zhang, Y und Ron, D.** Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*. 1999, Bd. 397, 6716, S. 271-74.
16. **Tirasophon, W, Welihinda, A A und Kaufman, R J.** A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes Dev*. 1998, Bd. 12, 12, S. 1812-24.
17. **Wang, X Z, et al.** Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *EMBO J*. 1998, Bd. 17, 19, S. 5708-17.
18. **Yoshida, H, et al.** Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J Biol Chem*. 1998, Bd. 273, 50, S. 33741-9.
19. **Bertolotti, A, et al.** Dynamic Interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol*. 2000, Bd. 2, 6, S. 326-32.
20. **Shen, J, et al.** ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev Cell*. 2002, Bd. 3, 1, S. 99-111.
21. **Gardner, B M und Walter, P.** Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. *Science*. 2011, Bd. 333, 6051, S. 1891-4.
22. **Shen, X, Zhang, K und Kaufman, R J.** The unfolded protein response--a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum. *J Chem Neuroanat*. 2004, Bd. 23, 1-2, S. 79-92.

23. **Todd, D J, Lee, A H und Glimcher, L H.** The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* 2008, Bd. 8, 9, S. 663-74.
24. **Yoshida, H, et al.** Endoplasmic reticulum stress-induced formation of transcription factor complex ERSF including NF-Y (CBF) and activating transcription factors 6alpha and 6beta that activates the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol.* 2001b, Bd. 21, 4, S. 1239-48.
25. **Haze, K, et al.** Identification of the G13 (cAMP-response-element-binding protein-related protein) gene product related to activating transcription factor 6 as a transcriptional activator of the mammalian unfolded protein response. *Biochem J.* 2001, Bd. 355, Pt. 1, S. 19-28.
26. **Thuerauf, D J, Morrison, L und Glembotski, C C.** Opposing roles for ATF6alpha and ATF6beta in endoplasmic reticulum stress response gene induction. *J Biol Chem.* 2004, Bd. 279, 20, S. 21078–84.
27. **Ye, J, et al.** ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell.* 2000, Bd. 6, 6, S. 1355-64.
28. **Yoshida, H, et al.** ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol.* 2000, Bd. 20, 18, S. 6755-67.
29. **Brown, M S, et al.** Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell.* 2000, Bd. 100, 4, S. 391-8.
30. **Kokame, K, Kato, H und Miyata, T.** Identification of ERSE-II, a new cis-acting element responsible for the ATF6-dependent mammalian unfolded protein response. *J Biol Chem.* 2001, Bd. 276, 12, S. 9199-205.
31. **van Huizen, R, et al.** P58IPK, a novel endoplasmic reticulum stress-inducible protein and potential negative regulator of eIF2alpha signaling. *J Biol Chem.* 2003, Bd. 278, 18, S. 15558-64.
32. **Schröder, M.** Endoplasmic reticulum stress responses. *Cell Mol Life Sci.* 2008, Bd. 65, 6, S. 862-94.

33. **Vattem, K M und Wek, R C.** Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004, Bd. 101, 31, S. 11269-74.
34. **Harding, H P, et al.** Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell.* 2000, Bd. 6, 5, S. 1099-108.
35. **Jiang, H Y, et al.** Activating transcription factor 3 is integral to the eukaryotic initiation factor 2 kinase stress response. *Mol Cell Biol.* 2004, Bd. 24, 3, S. 1365-77.
36. **Ma, Y und Hendershot, L M.** Herp is dually regulated by both the endoplasmic reticulum stress-specific branch of the unfolded protein response and a branch that is shared with other cellular stress pathways. *J Biol Chem.* 2004, Bd. 279, 14, S. 13792-9.
37. —. Delineation of a negative feedback regulatory loop that controls protein translation during endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem.* 2003, Bd. 278, 37, S. 34864-73.
38. **Bertolotti, A, et al.** Increased sensitivity to dextran sodium sulfate colitis in IRE1beta-deficient mice. *J Clin Invest.* 2001, Bd. 107, 5, S. 585-93.
39. **Cox, J S und Walter, P.** A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell.* 1996, Bd. 87, 3, S. 391-404.
40. **Calton, M, et al.** IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature.* 2002, Bd. 415, 6867, S. 92-6.
41. **Yoshida, H, et al.** XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell.* 2001a, Bd. 107, 7, S. 881-91.
42. **Patil, C und Walter, P.** Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr Opin Cell Biol.* 2001, Bd. 13, 3, S. 349-55.
43. **Yamamoto, K, et al.** Differential contributions of ATF6 and XBP1 to the activation of endoplasmic reticulum stress-responsive cis-acting elements ERSE, UPRE and ERSE-II. *J Biochem.* 2004, Bd. 136, 3, S. 343-50.

44. **Lee, A H, Iwakoshi, N N und Glimcher, L H.** XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol.* 2003, Bd. 23, 21, S. 7448–59.
45. **Cox, J S, Chapman, R E und Walter, P.** The unfolded protein response coordinates the production of endoplasmic reticulum protein and endoplasmic reticulum membrane. *Mol Biol Cell.* 1997, Bd. 8, 9, S. 1805-14.
46. **Yoshida, H, et al.** pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response. *J Cell Biol.* 2006, Bd. 172, 4, S. 565-75.
47. **Szegezdi, E, et al.** Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep.* 2006, Bd. 7, 9, S. 880-5.
48. **Tabas, I und Ron, D.** Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol.* 2011, Bd. 13, 3, S. 184-90.
49. **Woehlbier, U und Hetz, C.** Modulating stress responses by the UPRosome: a matter of life and death. *Trends Biochem Sci.* 2011, Bd. 36, 6, S. 329-37.
50. **Jordan, R, et al.** Replication of a cytopathic strain of bovine viral diarrhea virus activates PERK and induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of MDBK cells. *J Virol.* 2002, Bd. 76, 19, S. 9588-99.
51. **Gessner, D K, et al.** Up-regulation of endoplasmic reticulum stress induced genes of the unfolded protein response in the liver of periparturient dairy cows. *BMC Vet Res.* 2014, Bd. 10, 46.
52. **Horton, J D, Goldstein, J L und Brown, M S.** SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest.* 2002, Bd. 109, 9, S. 1125-31.
53. **Osborne, T F und Espenshade, P J.** Evolutionary conservation and adaptation in the mechanism that regulates SREBP action: what a long, strange tRIP it's been. *Genes Dev.* 2009, Bd. 23, 22, S. 2578-91.

54. **Brown, M S und Goldstein, J L.** A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999, Bd. 96, 20, S. 11041–8.
55. **Espenshade, P J.** SREBPs: sterol-regulated transcription factors. *J Cell Sci.* 2006, Bd. 119, Pt 6, S. 973-6.
56. **Colgan, Stephen M, Al-Hashimi, Ali A und Austin, Richard C.** Endoplasmic reticulum stress and lipid dysregulation. *Expert Rev Mol Med.*,. 2011, Bd. 13, e4.
57. **Malhi, Harmeet und Kaufman, Randal J.** Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *J Hepatol.* 2011, Bd. 54, 4, S. 795-809.
58. **Basseri, S und Austin, R C.** Endoplasmic Reticulum Stress and Lipid Metabolism: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Biochem Res Int.* 2012.
59. **Back, S H und Kaufman, R J.** Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes. *Annu Rev Biochem.* 2012, Bd. 81, S. 767-93.
60. **Fu, S, Watkins, S M und Hotamisligil, G S.** The role of endoplasmic reticulum in hepatic lipid homeostasis and stress signaling. *Cell Metabol.* 2012, Bd. 15, 5, S. 623-34.
61. **Sen, R und Baltimore, D.** Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell.* 1986, Bd. 47, 6, S. 921-8.
62. **Baeuerle, P A.** Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 1994, Bd. 12, S. 141-79.
63. **Epstein, F H, Barnes, P J und Karin , M.** Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med.* 1997, Bd. 336, 15, S. 1066-71.
64. **Zingarelli, B.** Nuclear factor-kappaB. *Crit Care Med.* 2005, Bd. 33, 12 Suppl, S. S414-6.
65. **Barnes, P J.** Nuclear factor-kappa B. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997, Bd. 29, 6, S. 867-70.

66. **Ghosh, S und Karin, M.** Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell*. 2002, Bd. 109, Suppl, S. S81-96.
67. **Siebenlist, U, Franzoso, G und Brown, K.** Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol*. 1994, Bd. 10, S. 405-55.
68. **Sun, Z und Andersson, R.** NF-kappaB activation and inhibition: a review. *Shock*. 2002, Bd. 18, 2, S. 99-106.
69. **Whiteside, S T und Israel, A.** I kappa B proteins: structure, function and regulation. *Semin Cancer Biol*. 1997, Bd. 8, 2, S. 75-82.
70. **Ghosh, S, May, M J und Kopp, E B.** NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 1998, Bd. 16, S. 225-60.
71. **Karin, M und Ben-Neriah, Y.** Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol*. 2000, Bd. 18, S. 621-63.
72. **Henkel, T, Zabel, U und van Zee, K.** Intramolecular masking of the nuclear location signal and dimerization domain in the precursor for the p50 NF-kappa B subunit. *Cell*. 1992, Bd. 68, 6, S. 1121-33.
73. **Caamaño, J und Hunter, C A.** NF-kappaB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. *Clin Microbiol Rev*. 2002, Bd. 15, 3.
74. **Israël, A.** The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010, Bd. 2, 3.
75. **Pahl, H L.** Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*. 1999, Bd. 18, 49, S. 6853-66.
76. **Ito, C Y, Kazantsev, A G und Baldwin Jr, A S.** Three NF-kappa B sites in the I kappa B-alpha promoter are required for induction of gene expression by TNF alpha. *Nucleic Acids Research*. 1994, Bd. 22, 18, S. 3787-92.
77. **Broz, P und Monack, D M.** Molecular mechanisms of inflammasome activation during microbial infections. *Immunol Rev*. 2011, Bd. 243, 1, S. 174-90.

78. **Ringseis, R, et al.** Metabolic signals and innate immune activation in obesity and exercise. *Exerc Immunol Rev.* 2015, Bd. 21, S. 58-68.
79. **Taniguchi, S und Sagara, J.** Regulatory molecules involved in inflammasome formation with special reference to a key mediator protein, ASC. *Semin Immunopathol.* 2007, Bd. 29, 3, S. 231-8.
80. **Jung, K A und Kwak, M K.** The Nrf2 system as a potential target for the development of indirect antioxidants. *Molecules.* 2010, Bd. 15, 10, S. 7266-91.
81. **Kaspar, J W, Niture, S K und Jaiswal, A K.** Nrf2:Keap1 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2009, Bd. 47, 9, S. 1304–9.
82. **Ma, Q.** Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2013, Bd. 53, S. 401-26.
83. **Mangge, H, et al.** Antioxidants, inflammation and cardiovascular disease. *World J Cardiol.* 2014, Bd. 6, 6, S. 462-77.
84. **Sautin, Y Y und Johnson, R J.** Uric Acid: The Oxidant–Antioxidant Paradox. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2008, Bd. 27, 6, S. 608–619.
85. **Espinosa-Diez, C, et al.** Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biol.* 2015, S. 183-97.
86. **Sakulsak, N.** Metallothionein: an overview on its metal homeostatic regulation in mammals. *Int J Morphol.* 2012, Bd. 30, 3, S. 1007-12.
87. **Baird, Liam und Dinkova-Kostova, Albena T.** The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Arch Toxicol.* 2011, Bd. 85, 4, S. 241-72.
88. **Li, W, et al.** Heterodimerization with small Maf proteins enhances nuclear retention of Nrf2 via masking the NESzip motif. *Biochim Biophys Acta.* 2008, Bd. 1783, 10, S. 1847–56.
89. **Kobayashi, A, et al.** Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol.* 2004, Bd. 24, 16, S. 7130–9.

90. **Dinkova-Kostova, A T, et al.** Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *PNAS*. 2002, Bd. 99, 18, S. 11908–13.
91. **Tkachev, V O, Menshchikova, E B und Zenkov, N K.** Mechanism of the Nrf2/Keap1/ARE signaling system. *Biochemistry (Mosc)*. 2011, Bd. 76, 4, S. 407-22.
92. **He, C H, et al.** Identification of activating transcription factor 4 (ATF4) as an Nrf2-interacting protein. Implication for heme oxygenase-1 gene regulation. *J Biol Chem*. 2001, Bd. 276, 24, S. 20858–65.
93. **Nguyen, T, Huang, H C und Pickett, C B.** Transcriptional regulation of the antioxidant response element. Activation by Nrf2 and repression by MafK. *J Biol Chem*. 2000, Bd. 275, 20, S. 15466–73.
94. **Venugopal, R und Jaiswal, A K.** Nrf2 and Nrf1 in association with Jun proteins regulate antioxidant response element-mediated expression and coordinated induction of genes encoding detoxifying enzymes. *Oncogene*. 1998, Bd. 17, 24, S. 3145-56.
95. **Itoh, K, et al.** An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997, Bd. 236, 2, S. 313-22.
96. **Kim, J, Cha, Y N und Surha, Y J.** A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. *Mutat Res*. 2010, Bd. 690, 1-2, S. 12-23.
97. **Zhang, K und Kaufman, R J.** From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature*. 2008, Bd. 454, 7203, S. 455-62.
98. **Chaudhari, N, et al.** A molecular web: endoplasmic reticulum stress, inflammation, and oxidative stress. *Front Cell Neurosci*. 2014, Bd. 8.
99. **Cullinan, S B, et al.** Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol Cell Biol*. 2003, Bd. 23, 20, S. 7198-209.
100. **Cullinan, S B und Diehl, J A.** Coordination of ER and oxidative stress signaling: the PERK/Nrf2 signaling pathway. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006, Bd. 38, 3, S. 317-32.

101. **Cláudio, Nuno, et al.** Mapping the crossroads of immune activation and cellular stress response pathways. *EMBO J.* 2013, Bd. 32, 9, S. 1214–1224.
102. **Kim, S, et al.** Endoplasmic reticulum stress is sufficient for the induction of IL-1 β production via activation of the NF- κ B and inflammasome pathways. *Innate Immun.* 2014, Bd. 20, 8, S. 799–815.
103. **Lerner, A G, et al.** IRE1 α induces thioredoxin-interacting protein to activate the NLRP3 inflammasome and promote programmed cell death under irremediable ER stress. *Cell Metab.* 2012, Bd. 16, 2, S. 250–64.
104. **Dusso, A S, Brown, A J und Slatopolsky, E.** Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005, Bd. 289, 1, S. F8-F28.
105. **Cooke, N E und Haddad, J G.** Vitamin D binding protein (Gc-globulin). *Endocr Rev.* 1989, Bd. 10, 3, S. 294-307.
106. **Jones, G, Prosser, D E und Kaufmann, M.** Cytochrome P450-mediated metabolism of vitamin D. *J Lipid Res.* 2014, Bd. 55, 1, S. 13-31.
107. **Cheng, J B, et al.** De-orphanization of cytochrome P450 2R1: a microsomal vitamin D 25-hydroxylase. *J Biol Chem.* 2003, Bd. 278, 39, S. 38084-93.
108. **Bai, XY, et al.** The autosomal dominant hypophosphatemic rickets R176Q mutation in fibroblast growth factor 23 resists proteolytic cleavage and enhances in vivo biological potency. *J Biol Chem.* 2003, Bd. 278, 11, S. 9843-9.
109. **Boullion, R.** Vitamin D: From Photosynthesis, metabolism, and action to clinical applications. *Endocrinology.* 2006, S. 1435-63.
110. **Brown, A J, Dusso, A und Slatopolsky, E.** Vitamin D. *Am J Physiol.* 1999, Bd. 277, 2 Pt 2, S. F157-75.
111. **Jones, G, Strugnell, S A und DeLuca, H F.** Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol Rev.* 1998, Bd. 78, 4, S. 1193-231.
112. **Riek, A E, et al.** 25(OH) vitamin D suppresses macrophage adhesion and migration by downregulation of ER stress and scavenger receptor A1 in type 2 diabetes. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014, Bd. 144 Pt. A, S. 172-9.

113. **Riek, A E, Oh, J und Bernal-Mizrachi, C.** 1,25(OH)₂ vitamin D suppresses macrophage migration and reverses atherogenic cholesterol metabolism in type 2 diabetic patients. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2013, Bd. 136, S. 309-12.
114. **Tian, X, et al.** Effects of Placental Ischemia Are Attenuated by 1,25-Dihydroxyvitamin D Treatment and Associated with Reduced Apoptosis and Increased Autophagy. *DNA Cell Biol.* 2016, Bd. 35, 2, S. 59-70.
115. **Weng, S, et al.** Vitamin D deficiency induces high blood pressure and accelerates atherosclerosis in mice. *PLoS One.* 2013, Bd. 8, 1.
116. **Xia, E Q, et al.** Biological activities of polyphenols from grapes. *Int J Mol Sci.* 2010, Bd. 11, 2, S. 622-46.
117. **Giordano, E, et al.** Hydroxytyrosol attenuates tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress in human hepatocarcinoma cells. *Mol Nutr Food Res.* 2014, Bd. 58, 5, S. 954-62.
118. **Li, Y, et al.** Curcumin attenuates glutamate neurotoxicity in the hippocampus by suppression of ER stress-associated TXNIP/NLRP3 inflammasome activation in a manner dependent on AMPK. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2015, Bd. 286, 1, S. 53-63.
119. **Rodriguez, J, et al.** Pomegranate and green tea extracts protect against ER stress induced by a high-fat diet in skeletal muscle of mice. *Eur J Nutr.* 2015, Bd. 54, 3, S. 377-89.
120. **Winkler, A, et al.** Effects of a plant product consisting of green tea and curcuma extract on milk production and the expression of hepatic genes involved in endoplasmic stress response and inflammation in dairy cows. *Arch Anim Nutr.* 2015, Bd. 69, 6, S. 425-41.
121. **Gessner, D K, et al.** The effect of grape seed and grape marc meal extract on milk performance and the expression of genes of endoplasmic reticulum stress and inflammation in the liver of dairy cows in early lactation. *J Dairy Sci.* 2015, Bd. 98, 12, S. 8856-68.
122. **Gagnon, A M, Simboli-Campbell, M und Welsh, J E.** Induction of calbindin D-28K in Madin-Darby bovine kidney cells by 1,25(OH)₂D₃. *Kidney Int.* 1994, Bd. 45, 1, S. 95-102.

123. **Madin, S H und Darby, N B.** Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1958, Bd. 98, 3, S. 574-6.
124. **Mosmann, T.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983, Bd. 65, 1-2, S. 55-63.
125. **Berridge, M V, et al.** The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. *Biochemica.* 1996, Bd. 4, S. 14-19.
126. **Schlegel, Gloria.** Untersuchungen zu Wirkungen von konjugierten Linolsäuren (CLA) auf Fleischqualitätsparameter und den hepatischen Lipidstoffwechsel beim Rind und zu Veränderungen im hepatischen Lipidstoffwechsel der Milchkuh beim Übergang von... (Dissertation, Dr. agr.). *Justus-Liebig-Universität Gießen.* 2013.
127. **Gessner, D, et al.** Supplementation of a grape seed and grape marc meal extract decreases activities of the oxidative stress-responsive transcription factors NF- κ B and Nrf2 in the duodenal mucosa of pigs. 2013a, Bd. 55, 18.
128. **Vandesompele, J, et al.** Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002, Bd. 3, 7.
129. **R Core Team.** A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Available:<http://www.R-project.org/>. 2014.
130. **Kuznetsova, A, Brockhoff, P B und Christensen, R H B.** lmerTest: Tests in Linear Mixed Effects Models. R package version 2.0-20. Available:<http://CRAN.R-project.org/package=lmerTest>. 2014.
131. **Lenth, R V und Hervé, M.** Least-squares means. R package version 2.13. Available:<http://CRAN.R-project.org/package=lsmmeans>. 2013.
132. **Sun, L, et al.** Role of sterol regulatory element-binding protein 1 in regulation of renal lipid metabolism and glomerulosclerosis in diabetes mellitus. *J Biol Chem.* 2002, Bd. 277, 21, S. 18919–27.

133. **Rutkowski, D T, et al.** UPR pathways combine to prevent hepatic steatosis caused by ER stress-mediated suppression of transcriptional master regulators. *Dev Cell*. 2008, Bd. 15, 6, S. 829–40.
134. **Engelking, L J, et al.** Overexpression of Insig-1 in the livers of transgenic mice inhibits SREBP processing and reduces insulin-stimulated lipogenesis. *J Clin Invest*. 2004, Bd. 113, 8, S. 1168-75.
135. **Song, Y F, et al.** Endoplasmic reticulum stress and disturbed calcium homeostasis are involved in copper-induced alteration in hepatic lipid metabolism in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Chemosphere*. 2016, Bd. 144, S. 2443-53.
136. **Agrawal, A, et al.** Overexpressed nuclear factor-kappaB can participate in endogenous C-reactive protein induction, and enhances the effects of C/EBPbeta and signal transducer and activator of transcription-3. *Immunology*. 2003, Bd. 108, 4, S. 539-47.
137. **Son, D S, Roby, K F und Terranova, P F.** Tumor necrosis factor-alpha induces serum amyloid A3 in mouse granulosa cells. *Endocrinology*. 2004, Bd. 145, 5, S. 2245-52.
138. **Deregowski, V, et al.** Identification of cytokine-induced nuclear factor-kappaB target genes in ovarian and breast cancer cells. *Biochem Pharmacol*. 2002, Bd. 64, 5-6, S. 873-81.
139. **Zemans, R und Downey, G P.** Role of caveolin-1 in regulation of inflammation: different strokes for different folks. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008, Bd. 294, 2, S. L175-7.
140. **Castell, J V, et al.** Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. *FEBS Lett*. 1989, Bd. 242, 2, S. 237-9.
141. **Bost, K L und Mason, M J.** Thapsigargin and cyclopiazonic acid initiate rapid and dramatic increases of IL-6 mRNA expression and IL-6 secretion in murine peritoneal macrophages. *J Immunol*. 1995, Bd. 155, 1, S. 285-96.
142. **Marriott, I, Bost, K L und Mason, M J.** Differential kinetics for induction of interleukin-6 mRNA expression in murine peritoneal macrophages: evidence for

calcium-dependent and independent-signalling pathways. *J Cell Physiol.* 1998, Bd. 177, 2, S. 232-40.

143. **Sattayaprasert, P, et al.** Platelet-activating factor enhancement of calcium influx and interleukin-6 expression, but not production, in human microglia. *J Neuroinflammation.* 2005, Bd. 2, 1.

144. **Hayakawa, K, et al.** Acquisition of anergy to proinflammatory cytokines in nonimmune cells through endoplasmic reticulum stress response: a mechanism for subsidence of inflammation. *J Immunol.* 2009, Bd. 182, 2, S. 1182-91.

145. **Inagi, Reiko, et al.** Preconditioning with Endoplasmic Reticulum Stress Ameliorates Mesangioproliferative Glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2008, Bd. 19, 5, S. 915–922.

146. **Hayakawa, K, et al.** ER stress depresses NF-kappaB activation in mesangial cells through preferential induction of C/EBP beta. *J Am Soc Nephrol.* 2010, Bd. 21, 1, S. 73–81.

147. **Yu, Yuan, et al.** Endoplasmic reticulum stress preconditioning antagonizes low-density lipoprotein-induced inflammation in human mesangial cells through upregulation of XBP1 and suppression of the IRE1 α /IKK/NF- κ B pathway. *Mol. Med. Rep.* 2015, Bd. 11, S. 2048–2054.

148. **Mittal, M, et al.** Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal.* 2014, Bd. 20, 7, S. 1126-67.

149. **Artells, E, et al.** Mammalian MT1 and MT2 metallothioneins differ in their metal binding abilities. *Metallomics.* 2013, Bd. 5, 10, S. 1397-410.

150. **Hoenderop, J G, Nilius, B und Bindels, R J.** Calcium absorption across epithelia. *Physiol Rev.* 2005, Bd. 85, 1, S. 373-422.

151. **Blaine, J, Chonchol, M und Levi, M.** Renal control of calcium, phosphate, and magnesium homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2015, Bd. 10, 7, S. 1257-72.

152. **Glendenning, P, et al.** Calcitriol upregulates expression and activity of the 1b isoform of the plasma membrane calcium pump in immortalized distal kidney tubular cells. *Arch Biochem Biophys.* 2000, Bd. 380, 1, S. 126-32.

153. **McConkey, D J und Orrenius, S.** The role of calcium in the regulation of apoptosis. *J Leukoc Biol.* 1996, Bd. 59, 6, S. 775-83.
154. **Rizzuto, R, et al.** Calcium and apoptosis: facts and hypotheses. *Oncogene.* 2003, Bd. 22, 53, S. 8619-27.
155. **Furuya, Y, et al.** The role of calcium, pH, and cell proliferation in the programmed (apoptotic) death of androgen-independent prostatic cancer cells induced by thapsigargin. *Cancer Res.* 1994, Bd. 54, 23, S. 6167-75.
156. **Linden, K C, et al.** Renal expression and localization of the facilitative glucose transporters GLUT1 and GLUT12 in animal models of hypertension and diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005, Bd. 290, 1, S. F205-13.
157. **Dominguez, J H, et al.** Molecular adaptations of GLUT1 and GLUT2 in renal proximal tubules of diabetic rats. *Am. J. Physiol.* 1994, Bd. 266, S. F283-F290.
158. **Kahn, S E, Hull, R L und Utzschneider, K M.** Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature.* 2006, Bd. 444, 7121, S. 840-6.
159. **Lindenmeyer, M T, et al.** Proteinuria and hyperglycemia induce endoplasmic reticulum stress. *J Am Soc Nephrol.* 2008, Bd. 19, 11, S. 2225-36.
160. **Schaffer, S W, Croft, C B und Solodushko, V.** Cardioprotective effect of chronic hyperglycemia: effect on hypoxia-induced apoptosis and necrosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000, Bd. 278, 6, S. H1948-54.
161. **Hall JL, J L, et al.** Upregulation of glucose metabolism during intimal lesion formation is coupled to the inhibition of vascular smooth muscle cell apoptosis. Role of GSK3beta. *Diabetes.* 2001, Bd. 50, 5, S. 1171-9.
162. **Yu LC, L C, et al.** SGLT-1-mediated glucose uptake protects intestinal epithelial cells against LPS-induced apoptosis and barrier defects: a novel cellular rescue mechanism? *FASEB J.* 2005, Bd. 19, 13, S. 1822-35.
163. **Lee, Y J, Suh, H N und Han, H J.** Effect of BSA-induced ER stress on SGLT protein expression levels and alpha-MG uptake in renal proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009, Bd. 296, 6, S. F1405-16.

164. **Bröer, S.** Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Physiol Rev.* 2008, Bd. 88, 1, S. 249-86.
165. **Kawashima, H, Torikai, S und Kurokawa, K.** Localization of 25-hydroxyvitamin D3 1 alpha-hydroxylase and 24-hydroxylase along the rat nephron. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981, Bd. 78, 2, S. 1199-203.
166. **Takeyama, K, et al.** 25-Hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase and vitamin D synthesis. *Science.* 1997, Bd. 277, 5333, S. 1827-30.
167. **Zehnder, D, et al.** Expression of 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase in the human kidney. *J Am Soc Nephrol.* 1999, Bd. 10, 12, S. 2465-73.
168. **Xu, S, et al.** Vitamin D3 pretreatment regulates renal inflammatory responses during lipopolysaccharide-induced acute kidney injury. *Sci Rep.* 2015, Bd. 5, S. 18687.
169. **Bittner, Wolfgang.** Feldstudie zum Einsatz eines Vitamin D-metabolithaltigen Extrakts von *Solanum glaucophyllum* zur Prophylaxe der Hypocalcämie bei kalbenden Kühen. Dissertation (Dr. med. vet.), Ludwig-Maximilians-Universität München. 2012.
170. **Liesegang, A, Riner, K und Boos, A.** Effects of gestation and lactation on vitamin D receptor amounts in goats and sheep. *Domest Anim Endocrinol.* 2007, Bd. 33, 2, S. 190-202.

Eidesstattliche Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Mein erster Dank richtet sich an Herrn Prof. Dr. Klaus Eder für die Vergabe des interessanten Themas und die Möglichkeit am Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen zu promovieren.

Ebenfalls möchte ich mich bei Dr. Denise Geßner für die geduldige Betreuung und die konstruktive Kritik bedanken.

Ein weiterer Dank gilt allen Mitarbeitern und Doktoranden am Institut für die gute Zusammenarbeit. Ein besonderer Dank hierbei richtet sich an Anja Marx und Frauke Frank.

Ein herzlicher Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden: an Unterstützung jeglicher Art hat es mir dank Euch nie gefehlt.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6761-8



9 17 8 3 8 3 5 19 6 7 6 1 8