Aus der Abteilung Nephrologie und Rheumatologie (Prof. Dr. med. G.-A. Müller) im Zentrum Innere Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Prävention des Nierenversagens und der Nierenfibrose bei hereditären Erkrankungen der glomerulären Basalmembran (Alport-Syndrom) bei COL4A3-Knockout-Mäusen mit dem Reninantagonisten Aliskiren

> INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Doktorgrades der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität zu Göttingen

> > vorgelegt von Stephanie Theisen aus Siegburg

Göttingen 2011

## Dekan:

### Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. O. Gross
II. Berichterstatter/in:	PrivDoz. Dr. rer. nat. Krick
III. Berichterstatter/in:	Prof. Dr. rer. nat. Virsik-Köpp
Tag der mündlichen Prüfung:	04.Juni 2012

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	8
1.1 Das Alport-Syndrom	8
1.1.1 Definition, Ätiologie und Epidemiologie	
1.1.2 Geschichte	
1.1.3 Glomeruläre Grundstrukturen: Das Kollagen und die Basalmembran	9
1.1.4 Klinik	15
1.1.5 Diagnostik	17
1.1.6 Therapeutische Möglichkeiten	
1.2 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System mit Ergänzung des aktuelle	n
Wissensstands	
1.2.1 Einblick in das klassische RAAS	
1.2.2 Der aktuelle Wissensstand	21
1.3 Die RAAS-Blockade – Mögliche Ansatzpunkte	
1.3.1 ACE-Hemmer und AT <sub>1</sub> -Rezeptorantagonisten	
1.3.2 Die Kombinationstherapie als Alternative zur Monotherapie	
1.3.3 Der Renin-Inhibitor Aliskiren	
1.4 Fragestellung und Zielsetzung	
2 Versuchstiere, Material und Methoden	
2.1 Versuchstiere	
2.1.1 Die COL4A3-Knockout-Maus	
2.1.2 Zucht	
2.1.3 Haltung	
2.2 Material	
2.2.1 Chemikalien	
2.2.2 Materialien	
2.2.3 Geräte	
2.2.4 Software	
2.3 Studienbeschreibung	
2.4 Methoden	
2.4.1 PCR	
2.4.2 Implantation einer osmotischen Pumpe	
2.4.3 Urinabnahme	
2.4.4 Tötung sowie Blut-, Urin- und Organentnahme	
2.4.5 Silanisierung	
2.4.6 Färbungen	
2.4. / Urinelektrophorese	
2.4.8 Bestimmung des Aliskiren-Serumspiegels	

2.4.9 Western Blot	42
2.4.10 Statistische Analyse	42
2 Freehninge	4.4
3 Ergebnisse	44
3.1 Analyse der Überlebensdaten	44
3.1.1 Vergleich der Überlebenszeit der Gruppen A und B	44
3.1.2 Vergleich der Überlebenszeit der Gruppen A	48
3.2 Analyse der histologischen Präparate	49
3.2.1 Bildliche Darstellung der histologischen Präparate	49
3.2.2 Score der histologischen Präparate	52
3.2.3 Zusammenfassung von allen 3 Readern	57
3.3 Analyse der SDS-Page-Uringele	58
3.4 Aliskiren-Serumspiegel	62
4 Diskussion	63
4.1 Kritische Betrachtung der Studie an sich	63
4.1.1 Das Tiermodell COL4A3-Knockout-Maus	63
4.1.2 Der Stichprobenumfang	64
4.1.3 Negative Kontrolle statt Placebo	65
4.1.4 Selektion der Mäuse	65
4.1.5 Verzicht auf eine Blutdruckmessung	65
4.1.6 Verzicht auf die Bestimmung der Plasma-Renin-Aktivität	66
4.1.7 Punktescore - ein semiquantitatives Verfahren	66
4.1.8 Gilt die Effektivität von Aliskiren auch beim Renin des Mausmodells?	67
4.2 Ergebnisdiskussion	67
4.2.1 Überleben	67
4.2.2 Histologie	70
4.2.3 Proteinurie	73
4.2.4 TGF β, CTGF	75
4.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisdiskussion	75
4.3 Verbesserungspotential der vorliegenden Arbeit	76
4.4 Aliskiren und weitere Möglichkeiten der RAAS-Blockade	76
4.4.1 Konventionelle RAAS-Blockade bei allen chronischen Nierenerkrankungen? .	76
4.4.2 Inwiefern stellt sich Aliskiren als vorteilhafte RAAS-Blockade dar?	78
4.4.3 Weitere Möglichkeiten der RAAS-Blockade	81
4.4.4 Welche Art von RAAS-Blockade ist für das AS am sinnvollsten?	81
5 Zusammenfassung	83
6 Literaturverzeichnis	85
7 Anhang	94
7.1 Protokoll: PCR	94

7.2. Protokoll: Immunhistologische Färbung	. 95
7.3 Protokoll: HE-Färbung	. 96
7.4 Protokoll Urinelektrophorese:	. 97
7.5 Vergleich aller Drei Reader mit dem Bland-Altman-Plot:	. 98
7.6 Urinauswertung:	100
7.7 Aliskiren-Serumspiegel	100
7.8 Wachstumsfaktoren: TGF β, CTGF	101

# Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme	
	(=Angiotensin-Konvertierendes-Enzym)	
ADH	antidiuretisches Hormon	
AE	A Elution (= Auswaschen)	
AL	A Lysis (= Auflösen)	
ALTITUDE	Aliskiren Trail in Type 2 Diabetic Nephropathy	
Ang	Angiotensin	
APA	Aminopeptidase A	
AS	Alport-Syndrom	
ATL	A Tissue Lysis	
AVOID	Aliskiren in the Evaluation of Proteinuria in Diabetes	
AW	A Wash (= Waschen)	
BENEDICT	The Bergamo Nephrologic Diabetes Complication Trial	
BM	Basalmembran	
BSA	Bovine Serum Albumin	
COOPERATE	Combination treatment of angiotensin-converting-enzyme	
	inhibitor in non-diabetic renal disease	
CRR	Chemokin-Rezeptoren	
CTGF	Connective tissue growth factor (ein Wachstumsfaktor)	
DDR	Discoidin Domaine Rezeptor (ein Kollagenrezeptor)	
DETAIL	Diabetics Exposed to Telmisartan and Enalapril	
DANN	Deoxyribonucleic acid (= Desoxyribonukleinsäure)	
ECM	Extracellular matrix (= extrazelulläre Matrix)	
EM	Elektronen Mikroskopie	
FBH	Familiäre benigne Hämaturie	
GBM	Glomeruläre Basalmembran	
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate	
HCl	Salzsäure	
HE	Hämatoxylin-Eosin	
$IC_{50}$	Mittlere inhibitorische Konzentration	

IVC	Individually ventilated cages (= individuell ventilierte		
	Käfige)		
MCP	Monocyte chemoattractant protein (= Monozyten )		
MMP	Metalloproteinase		
mRNA	Messenger RNA (= Boten RNA)		
NC1	Carboxyl-Ende		
NF-ĸB	Nukleärer Faktor-ĸB		
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor		
PCR	Polymerase chain reaction (= Polymerase-Ketten-Reaktion)		
PRA	Plasma-Renin-Aktivität		
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System		
RANTES	Regulated upon Activation, normal T-cell expressed and		
	secreted (=)		
RAS	Renin-Angiotensin-System		
REIN	Ramipril Efficancy in Nephropathy		
RENAAL	Reduction of Endpoints in NIDDM with the Angiotensin II		
	Antagonist Losartan		
78	Amino-Ende		
s.o.	siehe Oben		
TAE	TRIS-Acetat-EDTA		
TBS	TRIS Buffered Saline		
TGF β	Transforming growth factor $\beta$ (= ein Wachstumsfaktor)		
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan		
z.B.	zum Beispiel		

## 1 Einleitung

#### 1.1 Das Alport-Syndrom

#### 1.1.1 Definition, Ätiologie und Epidemiologie

Bei der Nierenerkrankung Alport-Syndrom (AS) handelt es sich um eine progressive Glomerulonephritis mit erblicher Genese, welche aber auch spontan auftreten kann (Heidet und Gubler 2009). Begleitet wird diese Nephritis von einer Hämaturie und Proteinurie. Als weitere Symptome kommen eine Innenohrschwerhörigkeit und Augenveränderungen hinzu (Gross und Weber 2005). Im weit fortgeschrittenen Stadium entwickelt sich schließlich ein terminales Nierenversagen (Gross und Weber 2005), welches in der Regel die Todesursache darstellt. Ursache der Erkrankung sind Mutationen in den Genen des Kollagens Typ IV. Hierbei sind sowohl autosomale als auch gonosomale Chromosomen betroffen. Die Xchromosomale Vererbung ist mit ca. 85 % der häufigste Vererbungsmodus und liegt mit einer Häufigkeit von 1:5000 vor. Mit 10-15 % der Fälle beobachtet man den autosomalen Erbgang seltener, die Häufigkeit liegt hier bei 1:50000 (Gross und Weber 2005).

#### 1.1.2 Geschichte

Das AS wurde 1927 erstmals von Arthur Cecil Alport beschrieben. Alport bemerkte, dass in drei Generationen einer Familie fast alle Kinder unter Schwerhörigkeit, Hämaturie und Nephritis litten. Zusätzlich stellte geschlechtsspezifische Unterschiede er im Krankheitsverlauf fest. Dabei waren Männer in der Regel schwerer betroffen als Frauen (Alport 1927). Nach Alports Veröffentlichungen folgten viele Nachforschungen an ähnlich betroffenen Familien. Augenveränderungen wie ein anteriorer Lentikonus und Macula-Flecken, die auch schon in Alports Publikation Erwähnung fanden, ordnete man 1954 ebenfalls der Klinik des AS zu (Flinter 1997). 1961 wurde die Erkrankung nach ihrem Erstbeschreiber Alport benannt (Flinter 1997). Da man eine sehr stark variierende Klinik bei betroffenen Familien beobachtet hatte, war man sich über den Erbgang lange Zeit nicht im Klaren. Dies führte zu unzähligen Theorien, was schon früh eine Vorstellung der Heterogenität dieser Erkrankung ermöglichte. Im Jahr 1973 war Mayo einer der ersten, der einsah, dass man die Familien differenzierter betrachten musste. Er vermutete, dass nicht nur ein Vererbungsmodus vorlag, sondern X-chromosomale sowie autosomale Vererbung nebeneinander existierten (Flinter et al. 1988). Auch Hassstedt et al. beschäftigten sich mit der Genetik dieser Erkrankung und entwickelten 1978 ein System, welches die Einteilung des AS in sechs Untergruppen ermöglichte (Crawfurd 1988). Durch Fortschritte in der Wissenschaft gelang es nun auch, auf der molekularen Ebene an Erkenntnisse zu gelangen. 1971 isolierte man das Kollagen Typ IV und konnte es in seiner Funktion als Hauptkomponente der Basalmembran (BM) einordnen (Flinter 1997). Um 1990 identifizierte man die α5(IV)-Kette des Typ-IV-Kollagens (Flinter 1997), und es folgte die Identifizierung der weiteren  $\alpha$ -Ketten. Die Isolierung von Mutationen in den Kollagen-Typ-IV-Genen bei betroffenen Patienten brachte weitere Klarheit bezüglich des Vererbungsmodus. Unterstützt wurden die genetischen Nachforschungen durch Untersuchungen mittels Elektronenmikroskopie sowie Immunhistochemie. Erstere zeigte erkrankungsspezifische Veränderungen der glomerulären Basalmembran (GBM) (Crawfurd 1988), was die Vermutung eines Kollagendefektes als ursächlicher Genese unterstützte. Für die immunhistochemischen Untersuchungen verwendete man unter anderem Antikörper von Patienten mit Goodpasture-Syndrom. Bei dieser Erkrankung richten sich so genannte Anti-GBM-Antikörper gegen die NC1-Domäne der a3(IV)-Kette des Kollagens Typ IV in Niere und Lunge. Die Folgen sind eine Glomerulonephritis sowie pulmonale Hämorrhagien (Hudson et al. 2003). Im Fall des AS kam es zu einem Bindungsverlust der Antikörper an die GBM der Alport-Patienten (Crawfurd 1988). Eine Veränderung in dieser Domäne auf Grund einer Mutation im Kollagen-Typ-IV-Gen erschien dabei naheliegend. Heutzutage befasst sich die Forschung überwiegend mit der Entwicklung von Therapien, die das AS effizient bekämpfen sollen.

#### 1.1.3 Glomeruläre Grundstrukturen: Das Kollagen und die Basalmembran

Das Kollagen ist das häufigste Protein in Säugetieren (Gratzl und Wurzinger 2005). Seine Funktion ist sehr vielfältig. Neben dem Aspekt der Gewebsstabilität geht man von komplexen Interaktionen im Bereich der extrazellulären Matrix und dem Zellkompartiment aus (Heino 2007). In seiner Grundstruktur, dem so genannten Tropokollagen, bildet es eine Tripelhelix, die aus je drei Polypeptidhelices besteht, die auch als  $\alpha$ -Ketten bezeichnet werden. Das Tropokollagen ist ca. 300 nm lang und hat einen Durchmesser von ca. 1,5 nm. Die  $\alpha$ -Ketten bestehen jeweils aus ca. 1400 Aminosäuren (Gratzl und Wurzinger 2005). Bei den Aminosäuren handelt es sich hauptsächlich um Glycin, Prolin, Hydroxyprolin und Lysin. Ähnlich der bekannten  $\alpha$ -Helix ist jede dritte Aminosäure Glycin. Das hat zur Folge, dass in

einer Windung 3 statt 3,6 Aminosäuren vorkommen (Gratzl und Wurzinger 2005). Über die Peptidbindungen von Glycin werden Wasserstoffbrückenbindungen zu den anderen α-Ketten hergestellt, so dass die Tipelhelix entsteht. Im Tropokollagen sind die einzelnen Helices zusätzlich untereinander verdrillt (Gratzl und Wurzinger 2005). Nach dem Stand von 2007 sind mehr als 40 Gene bekannt, die für  $\alpha$ -Ketten kodieren. Daraus lassen sich insgesamt 28 verschiedene Kollagen-Typen formen, die jeweils einer von acht Klassen angehören (Heino 2007). Die bekannteste Klasse dieser kollagenen Superfamilie ist die Klasse der fibrilliären Kollagene mit dem Kollagen Typ I und II. Das ebenso bekannte Kollagen Typ IV bildet allein die Klasse der Basalmembran-Kollagene (Heino 2007). Es macht dabei einen Hauptbestandteil von BM in Säugetieren aus (Lüllmann-Rauch 2009). Als weitere Grundsubstanzen sind Laminin, Perlecan, Nidogen-1 und Nidogen-2 zu nennen (Kruegel und Miosge 2010). Elektronenmikroskopisch handelt es sich bei der BM um eine Basallamina und Lamina fibroreticularis. Die Basallamina teilt sich wiederum in eine Lamina rara (= lucida) und eine Lamina densa auf. Neben mechanischen Funktionen hat die BM ebenso Bedeutung für Interaktionen zwischen Zellen und extrazellulärer Matrix (ECM) (Lüllmann-Rauch 2009).

#### 1.1.3.1 Das Kollagen Typ IV – Vom Gen bis zum Netzwerk

Das Kollagen Typ IV bildet ein komplexes zweidimensionales Netzwerk in Basalmembranen (Welsch 2006). Zur Bildung des Tropokollagens stehen sechs  $\alpha$ -Ketten zur Verfügung (Gunwar et al. 1998), deren kodierenden Gene jeweils paarweise eng aneinander auf drei verschiedenen Chromosomen liegen. Die Gene COL4A1/A2 befinden sich auf Chromosom 13, COL4A3/A4 auf Chromosom 2 und COL4A5/A6 auf dem X-Chromosom (Gross et al. 2004 a). Die Gene sind sehr groß, sie bestehen aus ca. 100 Kilobasen mit 52 Introns und 51 Exons. Teilweise liegen sie so nah aneinander, dass sie sich wie COL4A1/A2 die gleiche Promotorregion teilen (Hudson BG et al. 1993).

Die Grundstruktur, das Tropokollagen, wurde oben bereits beschrieben. Im fertigen Kollagen Typ IV enthalten die  $\alpha$ -Ketten jedoch zusätzlich ein Amino-Ende (7S) mit ca. 15 Aminosäuren und ein Carboxyl-Ende (NC1) mit 230 Aminosäuren (Hudson et al. 1993). Der kollagene Abschnitt ist repetitiv durch nicht-kollagene Bereiche unterbrochen, wodurch vermutlich eine gewisse Flexibilität entsteht (Hudson et al. 1993). Es sind verschiedene Tropokollagen-Isoformen identifiziert worden, die auch als Protomere bezeichnet werden. Aus den sechs  $\alpha$ -Ketten formen sich insgesamt drei Protomere:  $\alpha 1.\alpha 1.\alpha 2(IV)$ ,  $\alpha 3.\alpha 4.\alpha 5(IV)$  und  $\alpha 5.\alpha 5.\alpha 6(IV)$  (Hudson et al. 2003) (siehe Abbildung 1).



Abb.1: Die sechs  $\alpha$ -Ketten  $\alpha 1(IV)$ - $\alpha 6(IV)$  des Kollagens Typ IV (links) verbinden sich zu drei verschiedenen Protomer-Isoformen:  $\alpha 1.\alpha 1.\alpha 2(IV)$ ,  $\alpha 3.\alpha 4.\alpha 5(IV)$  und  $\alpha 5.\alpha 5.\alpha 6(IV)$ . Jedes Protomer weist eine 7S-Domäne und eine NC1-Domäne auf. Graphik verwendet aus Hudson et al. 2003, S. 2544.

Um ein zweidimensionales Netzwerk zu bilden, interagieren die Protomere untereinander. Hierbei werden über vier Amino-Enden Tetramere gebildet. Des Weiteren bilden sich Hexamere über die Carboxyl-Enden von zwei Protomeren (Hudson et al. 2003). Man geht davon aus, dass nicht alle Protomere miteinander interagieren. Es formen sich daher folgende Netzwerke (siehe Abbildung 2):  $\alpha 1.\alpha 1.\alpha 2(IV)-\alpha 1.\alpha 1.\alpha 2(IV)$ ;  $\alpha 3.\alpha 4.\alpha 5(IV)-\alpha 3.\alpha 4.\alpha 5(IV)$ ;  $\alpha 1.\alpha 1.\alpha 2(IV)-\alpha 5.\alpha 5.\alpha 6(IV)$ .

Abb. 2: Bildung des zweidimensionalen Netzwerks: Tetramerbildung über die 7S-Domäne und Hexamerbildung über die NC1-Domäne. Die Graphik zeigt ein Beispiel für das  $\alpha 3.\alpha 4.\alpha 5$ (IV)-Netzwerk. Graphik verwendet aus Hudson et al. 2003, S. 2545.



Anders als die ubiquitär vorhandenen  $\alpha 1(IV)$ - und  $\alpha 2(IV)$ -Ketten kommen die Ketten  $\alpha 3(IV)$ bis  $\alpha 6(IV)$  nicht in jedem Gewebe vor (Gunwar et al. 1998). Gemäß der  $\alpha$ -Ketten verteilen sich auch die Kollagen-Typ-IV-Netzwerke gewebsspezifisch. Dementsprechend ist das  $\alpha 1.\alpha 1.\alpha 2(IV)$ -Netzwerk erwartungsgemäß ubiquitär vorhanden. In der Niere liegt das  $\alpha 3.\alpha 4.\alpha 5(IV)$ -Netzwerk in der GBM sowie in der tubulären BM vor. Des Weiteren ist es in Lunge, Hoden, Cochlea und Auge zu finden. Das  $\alpha 1.\alpha 1.\alpha 2(IV)-\alpha 5.\alpha 5.\alpha 6(IV)$ -Netzwerk ist in Haut, glatter Muskulatur und Ösophagus lokalisiert. In der Niere ist es in der Bowman-Kapsel vorhanden (Hudson et al. 2003).

#### 1.1.3.2 Aufbau und Funktion der glomerulären Basalmembran

Die GBM ist durch ihre Filterfunktion für die Niere von entscheidender Bedeutung. Sie wird auch als so genannte Blut-Harn-Schranke bezeichnet (Lüllmann-Rauch 2009). Pathologische Veränderungen der GBM verursachen eine renale Dysfunktion, die schließlich zu einem terminalen Nierenversagen führt. Die GBM ist ein Teil der renalen Glomerula. Sie befindet sich zwischen dem Kapillarendothel und dem Podozytenepithel (Lüllmann-Rauch 2009). Ihre Basallamina besteht aus einer Lamina densa von ca. 300 nm Dicke, welche auf jeder Seite von einer Lamina rara flankiert ist. Zum Endothel hin befindet sich die Lamina rara interna und in Richtung Podozyten die Lamina rara externa (Lüllmann-Rauch 2009). Histologisch gesehen handelt es sich hierbei um zwei Basallaminae, die im Bereich der Lamina densa miteinander verschmolzen sind (Welsch 2006). Die GBM wird in erster Linie von den Podozyten produziert und weniger vom Endothel (Lüllmann-Rauch 2009). Auf der Kapillar-Seite befindet sich ein fenestriertes Endothel ohne Diaphragma, dessen Fenster einen Durchmesser von 50-100 nm aufweisen. Zusätzlich besitzt die lumenwärtige Plasmamembran der Endothelzellen eine ca. 400-500 nm dicke negativ geladene Glykokalix, mit der auch die Endothelfenster bedeckt werden (Lüllmann-Rauch 2009). Auf der Harnseite liegen die Podozyten der BM an. Ihr Zellleib gibt dicke Primärfortsätze ab, die sich zu dünnen Sekundärfortsätzen verjüngen. Letztere interagieren mit der BM. Durch ihre ineinander verzahnte Anordnung decken sie die BM wie ein dichtes Netz ab. Zwischen den einzelnen Sekundärfortsätzen befindet sich ein Schlitzdiaphragma, dessen wichtigste Grundsubstanz Nephrin darstellt. Das Diaphragma ist mit Filtrationsporen ausgestattet. Wie das Endothel besitzen auch die Podozyten eine Glykokalix auf ihrer Plasmamembran (Lüllmann-Rauch 2009) (siehe Abbildung 3).

Abb. 3: Graphische Darstellung der GBM: PZ= Podozyten; EZ= Endothelzellen; LD= Lamina densa; LRI= Lamina rara interna; LRE= Lamina rara externa; SD= Schlitzdiaphragma; GK= Glykokalix; F= Endothelfenster.



Die Funktion der GBM besteht darin, Wasser und kleine Moleküle durchzulassen, Plasmaproteine wie Albumin (Molekülradius 3,6 nm) und Blutzellen jedoch zurückzuhalten (Welsch 2006). Eine Selektion nach Größe wird durch die Lamina densa mit ihrem molekularen Netzwerk sowie durch die Poren im Schlitzdiaphragma ermöglicht. Hierbei werden Moleküle mit einem Radius von <1,8 nm gut und >4,4 nm schlecht bis gar nicht durchgelassen (Lüllmann-Rauch 2009). Daneben gibt es noch eine ladungsspezifische Selektion. Hier hat die anionisch geladene Glykokalix eine Hauptaufgabe und lässt negativ geladene Moleküle wie Albumin schlechter hindurch (Lüllmann-Rauch 2009). Anionische Ladungen findet man aber auch in der Basallamina. Hier lässt sich das negativ geladene Heparansulfat nennen (Welsch 2006).

Hauptursache für das Entstehen des AS ist ein defektes Kollagen Typ IV. Dieser Defekt wird durch Mutationen in seinen Genen verursacht. Es liegt sowohl ein autosomaler Erbgang mit Mutationen in den Genen COL4A3/A4 als auch ein X-chromosomaler Erbgang mit Mutationen in dem Gen COL4A5 vor. In den Genen COL4A1/A2 sind keine Mutationen bekannt und man geht davon aus, dass betroffene Individuen nicht lebensfähig sind (Gross et al. 2004 a). Bei einer Mutation im Gen COL4A6 ist in der Regel das benachbarte Gen COL4A5 mit betroffen. Diese genübergreifenden Mutationen führen im Phänotyp zu einem AS mit Leiomyomatose (Kashtan und Segal 2011). Ausgehend von glatten Muskelzellen des Ösophagus, der Trachea und des Genitaltraktes bilden sich bei der Leiomyomatose benigne tumoröse Prozesse aus. In seltenen Fällen liegt eine kongenitale Kataract als zusätzliches Symptom vor (Heidet und Gubler 2009). Wie im autosomal-rezessiven AS konnten bei der familiären benignen Hämaturie (FBH) ebenfalls Mutationen im COL4A4-Gen gefunden werden (Gross et al. 2004 a). Die betroffenen Personen leiden dabei hauptsächlich unter einer Hämaturie. Andere Symptome wie Innenohrschwerhörigkeit und Augenveränderungen kommen recht selten vor. Es wird vermutet, dass die FBH eine Variante des autosomalrezessiven AS ist (Gross et al. 2004 a).

Nach Stand 2004 sind ca. 300 Mutationen im Gen COL4A5 bekannt, die über das gesamte Gen verteilt sind. Es handelt sich sowohl um große Mutationen, die zur Neuordnung von Genabschnitten führen, als auch um einzelne Basenmutationen (Gross et al. 2004 a). Hierbei sind Glycinsubstitutionen am häufigsten vorzufinden (Gross et al. 2002). Als Folge der Mutationen in den Genen COL4A3-A5 kommt es zu Strukturdefekten im Kollagen Typ IV. Glycinmutationen führen zum Abknicken der Tripelhelix. Mutationen, die einen Abbruch des Genprodukts bewirken (verfrühter Einbau von Stopp-Codons, größere Deletionen, "Nonsense"-Mutationen), sind ebenso für einen defekten Kollagenaufbau verantwortlich (Gross und Weber 2005). Schließlich kommt es zu einem Verlust der  $\alpha 3(IV)$ - $\alpha 5(IV)$ -Ketten. Zum Zeitpunkt der Geburt besteht die GBM ausschließlich aus einem  $\alpha 1.\alpha 1.\alpha 2(IV)$ -Netzwerk, ungefähr ab dem vierten postnatalen Tag kommt es zu einem "Switch" und einer aktiven Bildung der  $\alpha 3(IV)$ - $\alpha 5(IV)$ -Ketten (Sayers et al. 1999). Dies führt dazu, dass in der adulten GBM von gesunden Individuen zu großen Teilen das  $\alpha 3.\alpha 4.\alpha 5$ (IV)-Netzwerk vorliegt und das  $\alpha 1.\alpha 1.\alpha 2$ (IV)-Netzwerk auf den subentothelialen Bereich verdrängt wird (Sayers et al. 1999). Bei einem Verlust der  $\alpha 3(IV)$ - $\alpha 5(IV)$ -Ketten kann dieser "Switch" nicht stattfinden und es werden weiterhin die  $\alpha 1(IV)$ - und  $\alpha 2(IV)$ -Ketten in die gesamte BM eingebaut (Sayers et al. 1999). Interessant ist, dass Mutationen im Gen COL4A5 nicht nur zum Fehlen der  $\alpha$ 5(IV)-Kette führen, sondern auch einen akzessorischen Verlust der  $\alpha$ 3(IV)- und  $\alpha$ 4(IV)-Ketten mit sich bringen. Dieses Phänomen konnte genauso bei COL4A3-Knockout-Mäusen beobachtet werden. Auch im Fall der FBH mit einem COL4A4-Gendefekt kam es zum Verlust aller drei  $\alpha$ -Ketten (Gunwar et al. 1998). Cosgrove et al. (1996) konnten bei Untersuchungen COL4A3-Knockout-Mausmodell eine weitere am bemerkenswerte Entdeckung machen. Die mRNAs der nicht veränderten Gene (COL4A4 und COL4A5) waren trotz des akzessorischen Kettenverlustes zu detektieren. Dies lässt vermuten, dass die Ursache für den akzessorischen Kettenverlust erst nach der Transkription entsteht und nicht schon bei der Bildung der mRNA (Cosgrove et al. 1996).

In Studien konnte gezeigt werden, dass das  $\alpha 1.\alpha 1.\alpha 2(IV)$ -Netzwerk über eine geringere Stabilität im Vergleich zum fehlenden  $\alpha 3.\alpha 4.\alpha 5(IV)$ -Netzwerk verfügt. So weist das  $\alpha 3.\alpha 4.\alpha 5(IV)$ -Netzwerk Disulfid-Brückenbindungen auf, die es stabiler machen und besser vor Proteolyse schützen. Solche Bindungen fehlen dem  $\alpha 1.\alpha 1.\alpha 2(IV)$ -Netzwerk (Gunwar et al. 1998).

Schließlich kommt es zu typischen Veränderungen der GBM, die mit Hilfe der Elektronenmikroskopie gut darstellbar sind. Die erste Veränderung ist meist eine Verdünnung der GBM. Als nächstes beginnt die GBM an verschiedenen Stellen dicker zu werden und auch aufzusplittern (Flinter 1997). Im fortgeschrittenen Stadium liegt dann eine diffuse Verdickung vor (Gross et al. 2004 a). Es können aber auch weniger typische Verläufe vorkommen. So zeigen 10-20 % der Alport-Patienten lediglich eine abnorme Verdünnung der GBM (Heidet und Gubler 2009). Neben der Veränderung der GBM kommt es zusätzlich zu

einer Hypertrophie und Rarifizierung der Podozytenfortsätze (Cosgrove et al. 1996). Die Verzahnung der Podozyten untereinander wird dabei aufgehoben, was einen Integritätsverlust der Schlitzmembran mit sich bringt (Hudson et al. 2003, Kashtan und Segal 2011).

Die pathogenetischen Prozesse, die über eine Glomerulosklerose genauen und tubulointerstitiellen Fibrose bis zum terminalen Nierenversagen führen, sind noch nicht abschließend verstanden. Über Kollagenrezeptoren wird vermutlich der Verlust der  $\alpha 3(IV)$ - $\alpha$ 5(IV)-Ketten erkannt (Girgert et al. 2010). Daraufhin scheint der Wachstumsfaktor TGF  $\beta$ (engl. transforming growth factor  $\beta$ ) Podozyten zu einer vermehrten Matrixproduktion anzuregen. Konsekutiv kommt es darüber zu einer Verdickung der GBM (Sayers et al. 1999 und Girgert et al. 2010). Auch bei Metalloproteinasen (MMP) und Chemokin-Rezeptoren (CRR) sieht man einen möglichen Zusammenhang mit der Pathogenese des AS (Heidet und Gubler 2009). Ergebnisse aus experimentellen Studien konnten zeigen, dass eine Blockierung des TGF-β-Signalwegs sowie eine Inhibition der MMP-12 und Antagonisierung des CCR-2 eine geringere Verdickung der GBM bewirkten. Durch eine simultane Blockierung der MMP-2, -3 und -9 kann das Fortschreiten des AS verzögert werden (Heidet und Gubler 2009). Eine Studie mit einem CCR-1-Rezeptorantagonist zeigte ein verlängertes Leben von COL4A3-Knockout-Mäusen (Ninichuk et al. 2005). Bei einer Doppel-Knockout-Maus für COL4A3 und  $\alpha 1\beta$ 1-Integrin konnte sowohl die ECM-Produktion als auch der Podozytenverlust verringert werden (Cosgrove et al. 2000). Weiterhin führte ein Verlust des DDR 1 (engl. Discoidin Domaine Rezeptor) zu einer Verzögerung der Nierenfibrose (Gross et al. 2010).

#### 1.1.4 Klinik

Für das klassische AS werden vier klinische Kriterien gefordert. Hierbei müssen drei von vier zutreffen: (1) positive Familiengeschichte mit makro- oder mirkroskopischer Hämaturie, chronischem Nierenversagen oder beidem, (2) elektronenmikroskopischer Beweis für das Vorliegen des AS aus Nierenbiopsien, (3) charakteristische Augenveränderungen wie der anteriore Lentikonus oder Macula-Flecken oder beides, (4) Innenohrschwerhörigkeit (Flinter 1997). Im Laufe der Zeit wurden die Kriterien für die Leiomyomatose und FBH noch erweitert (Gross et al. 2004 a) (siehe Tabelle 1 und 2). Die Klinik des AS ist heterogen und nicht immer treten alle typischen Symptome des klassischen AS auf. So tritt die Innenohrschwerhörigkeit mit einer Häufigkeit von 75 % auf. Augenveränderungen kommen nur in 20 - 45 % der Fälle vor (Gross et al. 2004 a). Man kann eine juvenile Form mit frühem

Beginn des Nierenversagens noch vor einem Alter von 30 Jahren von einer adulten Form unterscheiden, bei der das Nierenversagen in der Regel erst nach 30 Jahren eintritt (Gross et al. 2004 a). Beim häufigen X-chromosomalen Erbgang sind vor allem Männer betroffen, da sie das defekte X-Chromosom der Mutter erhalten. Frauen sind dementsprechend Konduktorinnen. Sie haben selten einen schweren Krankheitsverlauf, da bei ihnen das defekte X-Chromosom meist inaktiviert vorliegt (Lyonisierung). Bei ihnen kann dennoch eine Mikrohämaturie auftreten (Netzer und Weber 1999). Im autosomalen Erbgang gibt es keine geschlechtsspezifischen Unterschiede. Es kommt dabei besonders häufig zu einer ausgeprägten Klinik mit frühem Beginn des Nierenversagens und extrarenalen Symptomen (Heidet und Gubler 2009). Ein typischer Krankheitsverlauf, wie er meist beim klassischen Xchromosomalen AS bei Männern beobachtet werden kann, soll im Folgenden dargestellt werden. Das erste Symptom ist in der Regel eine Makrohämaturie, die frühestens im Alter von ca. dreieinhalb Jahren auftritt. Im Verlauf kommt eine Proteinurie hinzu. Schon ab dem Alter von zehn Jahren kann sich eine Innenohrschwerhörigkeit entwickeln. Typische Augenveränderungen wie der anteriore Lentikonus oder weiße Macula-Flecken können ab dem 13. Lebensjahr entstehen, in der Regel aber erst im Erwachsenenalter. Während der Adoleszenz entwickelt sich eine renale Hypertonie. Mit ungefähr 21 Jahren kommt es schließlich zum chronischen Nierenversagen (Flinter 1997).

Diagnosekriterien Alport-Syndrom	Häufigkeit der Symptome	
-Positive Familienanamnese (Hämaturie)	Familienanamnese:	85 %
mit/ohne Progression zu terminalem Nierenversagen	Hämaturie:	100 %
-Progrediente Innenohrschwerhörigkeit		75 %
-Augenveränderungen (Lentikonus; Fundus albipunctatus) 20		20-45 %
-Charakteristische ultrastrukturelle Veränderungen der glomerulären 1		100 %
Basalmembran Aufsplitterung/ Lamellierung, Verdickung, Verdünnung		
-Neue Kriterien: diffuse Leiomyomatose des Ösophagus		1-2%
COL4A5, COL4A3/4 Mutationen	nachweisbar in	40 %- 70 %

Tabelle 1: Diagnosekriterien; Tabelle verwendet aus Gross et al. 2004 a, S. 350.

Diagnosekriterien familiäre benigne Hämaturie	Häufigkeit der Symptome	
-Positive Familienanamnese (Hämaturie)	> 90 %	
mit Progression zu terminalen Nierenversagen	5 - 15 %	
-Innenohrschwerhörigkeit	5 - 15 %	
-Augenveränderungen (Lentikonus; Fundus albipunctatus)	< 5 %	
-Charakteristische ultrastrukturelle Veränderungen der glomerulären		
Basalmembran Aufsplitterung/ Verdünnung 100 %		
-Neue Kriterien: COL4A3, COL4A4 Mutationen bzw. Linkage	> 50 %	

Tabelle 2: Diagnosekriterien; Tabelle verwendet aus Gross et al. 2004 a, S. 350.

#### 1.1.5 Diagnostik

Für die Diagnostik des AS ist es wichtig, die klinischen Symptome zu überprüfen und auch eine genaue Familienanamnese durchzuführen (Alves und de A Quintanilha Ribeiro 2005). Eine Hämaturie liegt häufig vor und kann neben einer Proteinurie mittels Urinanalyse einfach ermittelt werden (Gross et al. 2004 a; Heidet und Gubler 2009). Durch eine gründliche körperliche Untersuchung sowie Anamnese können zusätzliche Symptome wie Augenveränderungen und Schwerhörigkeit diagnostiziert werden (Heidet und Gubler 2009). In der Familienanamnese sollten eine Hämaturie, Nierenversagen oder weitere Alporttypische Symptome erfragt werden (Flinter 1997). Bei erhärtetem Verdacht wird eine differenziertere Diagnostik notwendig. In Deutschland besteht die Möglichkeit einer molekulargenetischen Routinediagnostik (Gross et al. 2004 a). Diese erweist sich besonders dann von Vorteil, wenn die Erkrankung in der Familie bereits bekannt ist und durch die frühe Diagnostik schon im Kindesalter mit einer Therapie begonnen werden kann (Gross et al. 2004 a). Eine weitere Möglichkeit stellt die Untersuchung der epidermalen BM dar. Dabei wird die Expression der  $\alpha 3(IV) - \alpha 5(IV)$ -Ketten in einer immunhistochemischen Aufarbeitung dargestellt (Gross et al. 2004 a). Schließlich gibt es noch die Nierenbiopsie. Mittels elektronenmikroskopischer Analyse lassen sich Alport-spezifische Veränderungen der GBM detektieren (Flinter 1997). Nach abgeschlossener Diagnostik ist es sinnvoll, noch einmal zu überprüfen, ob tatsächlich drei von vier Einschlusskriterien vorliegen (s.o.).

#### 1.1.6 Therapeutische Möglichkeiten

Die bisherigen Therapieversuche beim AS gehören alle der Kategorie "Off-label use" an. So konnte man bisher noch keine Therapie etablieren, die beim Menschen einen nachweisbar präventiven Einfluss auf die Entwicklung eines terminalen Nierenversagens nimmt (Gross und Kashtan 2009). Ohne Therapie entwickeln viele Patienten schon im Alter von ca. 20 Jahren ein chronisches Nierenversagen und müssen dialysiert werden. Die derzeit einzige kurative Behandlungsmöglichkeit besteht in der Nierentransplantation (Gross und Kashtan 2009). Im Vergleich zur Population aller Dialysepatienten ist das Gesamtüberleben als auch die Transplantatannahme überwiegend gut. Dies hängt vermutlich mit dem jungen Alter und der nicht vorliegenden Multimorbidität zusammen (Gross et al. 2004 a). Als Komplikation wird innerhalb des ersten Jahres in weniger als 3 % eine Anti-GBM-Nephritis beobachtet, die meist frühzeitig zur Abstoßung des Transplantats führt (Gross et al. 2004 a). Mit Hilfe von Tiermodellen ist es möglich geworden, die Wirksamkeit von innovativen Therapien zu untersuchen. Ein solches Tiermodell stellt das nicht-hypertensive sowie nicht-entzündliche COL4A3-Knockout-Mausmodell von Cosgrove et al. dar (Gross et al. 2003). Wie bei Menschen kommt es auch in diesem Mausmodell zu einem Verlust der  $\alpha 3(IV)$ - $\alpha 5(IV)$ -Ketten und stattdessen zu einem Einbau der  $\alpha 1(IV)$ -,  $\alpha 2(IV)$ -Ketten (Cosgrove et al. 1996). Auch der Verlauf bis hin zum terminalen Nierenversagen ist bei diesem Modell vergleichbar mit dem Krankheitsverlauf beim Menschen. Mit vier Wochen entwickelt sich eine Hämaturie. Ab der sechsten Woche kommt eine Proteinurie hinzu, die mit acht Wochen in ein terminales Nierenversagen mit Todesfolge mündet (Gross und Weber 2003). Das Mausmodell zeigt die gleichen Alport-typischen Strukturveränderungen der GBM, welche mit Hilfe von Elektronenmikroskopie sowie immunhistochemischen Methoden dargestellt werden können (Cosgrove et al. 1996). Durch die kurze Generationszeit sowie durch den raschen Krankheitsverlauf von ca. zehn Wochen (Gross et al. 2003) bietet das Knockout-Mausmodell daher ideale Bedingungen für therapeutische Studien. Es gibt mittlerweile verschiedene Therapieansätze, die im Mausmodell positive therapeutische Effekte zeigten (Gross und Kashtan 2009). Zu diesen pharmakologischen Ansätzen zählen Therapien mit ACE-Hemmern, AT<sub>1</sub>-Antagonisten, Aldosteronantagonisten, Cyclosporin, Anti-TGF-β<sub>1</sub>-Antikörpern, aber auch die Inhibiton verschiedener "Targets" wie der HMG-CoA-Reduktase, Vasopeptidase und MMP. Des Weiteren kommen Endothelinrezeptoren, CCR und auch Kollagenrezeptoren als mögliche Ansatzpunkte hinzu. Daneben gibt es auch Studien, die sich mit Gen-Therapie, mesenchymaler Stammzelltherapie und Therapie mit Zellen des Knochenmarks befassen (Gross und Kashtan 2009). In der vorliegenden Arbeit gilt das Interesse dem Renin-Inhibitor Aliskiren. Ähnlich wie ACE-Hemmer und AT<sub>1</sub>-Antagonisten greift er in das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) ein.

# 1.2 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System mit Ergänzung des aktuellen Wissensstands

Beim RAAS handelt es sich um ein System basierend auf enzymatischen und endokrinen Eigenschaften (Paul et al. 2006). Eine wesentliche Aufgabe des RAAS bzw. dessen Haupteffektors Angiotensin II (Ang II) ist die Kontrolle des Extrazellulärvolumens, des Elektrolythaushalts und des Blutdrucks (Lang und Kurtz 2007). Im Laufe der Zeit konnte man weitere Eigenschaften dieses Systems entdecken. Man vermutet, dass neben dem klassischen RAAS ein lokales Renin-Angiotensin-System (RAS) in verschiedenen Organen und Zellen existiert. Nach Paul et al. (2006) sind viele Gewebe in der Lage, ihr eigenes Ang II herzustellen. Auch in der Niere hat man alle Voraussetzungen für ein lokales intrarenales RAS gefunden (Kobori et al. 2007). Des Weiteren wurden Fortschritte in der Entdeckung alternativer Enzymsysteme in der Generierung von Ang II gemacht, die von der klassischen RAAS-Kaskade abweichen (Paul et al. 2006). Für die Pathogenese von kardiovaskulären und renalen Erkrankungen scheint das RAAS eine wichtige Rolle zu spielen (Siragy und Carey 2010). Die Funktionen von Ang II sind vielfältig. So konnte es z.B. als Zytokin im Rahmen von Entzündungsprozessen charakterisiert werden (Mezzano et al. 2001).

#### 1.2.1 Einblick in das klassische RAAS

Das klassische RAAS beginnt mit seinem Substrat Angiotensinogen. Es handelt sich dabei um ein α-Glykoprotein, welches von der Leber gebildet wird. Im Kreislauf wird Angiotensinogen durch das Enzym Renin zu dem Dekapeptid Angiotensin I (Ang I) gespalten. Bildungsort von Renin ist der juxtaglomeruläre Apparat der Niere. Nun folgt eine Aktivierung von Ang I zu dem Oktapeptid Angiotensin II (Ang II) durch das Enzym ACE (*engl. Angiotensin-Converting-Enzyme*). ACE ist eine membrangebundene Metalloproteinase, die vor allem auf der Oberfläche von Endothelzellen des Lungenkreislaufs exprimiert wird. Die Kaskade des klassischen RAAS ist in Abbildung 4 grafisch dargestellt.



Ang II stellt den Haupteffektor des RAAS dar (Paul et al. 2006). Eine wichtige Wirkung des Peptidhormons innerhalb des klassischen RAAS ist die Erhöhung des Blutdrucks. Dies erreicht es direkt über eine Vasokonstriktion und indirekt über eine Aldosteron-induzierte Natriumrückresorption Kalium-Wasserstoffionenausscheidung sowie und in den Sammelrohren. Im proximalen Tubulus und in den Sammelrohren bewirkt Ang II sogar direkt aldosteronunabhängig eine Natriumrückresorption (Pöschel und Wolf 2006). Des Weiteren steuert Ang II über einen zentral gesteigerten Salzappetit mit Durstgefühl die vermehrte Salzund Wasseraufnahme. Zusätzlich ist ACE für eine ADH (antidiuretisches Hormon) -Sekretion Hypophysenhinterlappen verantwortlich, welche ihrerseits aus dem eine erhöhte Wasserresorption in den Sammelrohren bewirkt (Lang und Kurtz 2007). Renin steht am Anfang dieser Kaskade. Von der Ausschüttung der Protease hängt entsprechend die Neubildung von Ang II ab. Die Reninausschüttung wird über verschiedene Wege geregelt. So nehmen Barorezeptoren einen erniedrigten aortalen Blutdruck wahr. Daraufhin wird über medulläre Kreislaufzentren der Sympathikus aktiviert, welcher mittels β-Rezeptoren eine Reninfreisetzung induziert (Giebisch und Windhager 2009). Auch eine erniedrigte Perfusion der Nieren, die unter anderem durch eine Sympathikus-aktivierte Vasokonstriktion via α-Rezeptoren entsteht, induziert eine Reninausschüttung (Busse 2007). Des Weiteren führt ein erniedrigter Blutdruck zu einer reduzierten GFR (glomeruläre Filtrationsrate). Dies verringert die luminale Natriumkonzentration, was von den Macula-densa-Zellen des juxtaglomerulären Apparates wahrgenommen wird und daraufhin eine Reninfreisetzung triggern (Giebisch und Windhager 2009). Weitere Impulse zu Gunsten einer Reninfreisetzung gehen unter anderem von Prostaglandin E2, I2 und Endothelin aus (Giebisch und Windhager 2009). Der Reninfreisetzung entgegengesetzte Impulse gehen von einem hyperosmolaren Zustand und einem erhöhten Blutdruck aus (Lang und Kurtz 2007). Eine organismuseigene Hemmung der Reninfreisetzung erfolgt über Ang II sowie ADH, Tromboxan-A2, Stickstoffmonoxid und hohe Kaliumkonzentrationen (Giebisch und Windhager 2009).

#### 1.2.2 Der aktuelle Wissensstand

Wie bereits erwähnt, hat man neben dem klassischen RAAS auch ein lokales RAS entdeckt. Es wird vermutet, dass beide Systeme unabhängig voneinander vorliegen, aber genauso auch miteinander interagieren können (Siragy und Carey 2010). Da sich die vorliegende Arbeit hauptsachlich mit der Pathologie der Niere befasst, soll in diesem Abschnitt vor allem auf das intrarenale RAS eingegangen werden. In der proximalen Tubuluszelle der Niere sind alle Komponenten vorhanden, die für ein lokales RAS notwendig sind (Pöschel und Wolf 2006; Kobori et al. 2007). In tierexperimentellen Studien an Ratten konnte eine sehr hohe Sekretion von Ang II aus Tubuluszellen nachgewiesen werden. Diese lokalen Konzentrationen überstiegen die Serumkonzentration von Ang II dabei deutlich (Pöschel und Wolf 2006). Man weiß auch, dass Zellen in der Lage sind, Renin über Oberflächenbindung in die Zelle zu internalisieren. Es wird vermutet, dass die nachfolgenden Schritte zur Ang-II-Bildung von der Zelle selbst übernommen werden. Genauso scheint Ang II, gebunden an AT<sub>1</sub>-Rezeptoren, per Endozytose in Zellen aufgenommen zu werden (Pöschel und Wolf 2006; Kobori et al. 2007). Innerhalb der Zellen beeinflusst Ang II zusätzlich die Gentranskription (Pöschel und Wolf 2006). Die Ang-II-Sekretion wird über verschiedene Wege ausgelöst. Mechanischer Stress des Glomerulums, bedingt durch eine kompensatorische Hyperperfusion, leitetet eine vermehrte Ausschüttung von glomerulärem Ang II ein (Pöschel und Wolf 2006). Des Weiteren wurde herausgefunden, dass die Aktivierung des lokalen RAS unabhängig vom Blutdruck erfolgen kann (Ruiz-Ortega et al. 2001). So wird das lokale RAS auch durch Hyperglykämie und Proteinurie aktiviert (Pöschel und Wolf 2006).

Weitere Neuerungen sind ebenso für die Funktion von Ang II hinzugekommen. Neben seinem bereits erwähnten Einfluss auf Blutdruck, Wasser- und Elektrolythaushalt räumt man Ang II auf Grund von proinflammatorischen und fibrotischen Eigenschaften eine ursächliche Rolle im Rahmen der chronischen Niereninsuffizienz ein (Pöschel und Wolf 2006). Das Peptidhormon verhält sich wie ein chemotaktischer Faktor, welcher zum Influx inflammatorischer Zellen in die Niere führt. Die Pathogenese ähnelt dabei der einer klassischen Entzündungsreaktion mit Adhäsion von Entzündungszellen, Steigerung der Gefäßpermeabilität und Produktion von Zytokinen (Ruiz-Ortega et al. 2001). Dabei kommt es auch zu einer Hochregulierung von Chemokinen wie RANTES (*engl. regulated upon Activation, normal T-cell expressed and secreted*) in Endothelzellen und MCP-1 (*engl. monocyte chemoattractant protein-1*) im Mesangium. Den Wachstumsfaktor TGF  $\beta$  nutzt Ang II als weiteren proinflammatorischen Mediator und fördert seine Hochregulierung (Ruiz-Ortega

et al. 2001 und Mezzano et al. 2001). Indem Ang II Tubuluszellen zur Transdifferenzierung in Myofibroblasten anregt, trägt es einen wesentlichen Teil zur Fibroseinduktion bei. Die Myofibroblasten produzieren daraufhin im gesteigerten Maß ECM (Pöschel und Wolf 2006). Auch Fibroblasten differenzieren sich auf Grund von Ang II zu Myofibroblasten. Durch eine solche Myofibroblastenaktivität resultiert schließlich eine tubulointerstitielle Fibrose (Mezzano et al. 2001). In einer weiteren Funktion als auto- und parakriner Wachstumsfaktor regt Ang II das Wachstum der tubulären als auch der glomerulären Zellen an (Pöschel und Wolf 2006). Die TGF-β-vermittelte Proliferation des Mesangiums führt ebenfalls zu einer Mehrproduktion von ECM und endet schließlich in der Entwicklung einer Glomerulosklerose (Mezzano et al. 2001). Des Weiteren supprimiert Ang II in Podozyten die Nephrinexpression. Nephrin ist ein Bestandteil der Schlitzmembran und wichtig für die Größenselektivität des glomerulären Filters. Eine Minderexpression hat daher eine Proteinurie zur Folge (Pöschel und Wolf 2006). Dabei entsteht ein regelrechter Teufelskreis, da die Proteinurie wiederum eine RAS-Aktivierung induziert (s.o.).

Unter den Ang-II-Rezeptoren ist der AT<sub>1</sub>-Rezeptor am besten erforscht. Er ist für die meisten Wirkungen des klassischen RAAS verantwortlich (Siragy und Carey 2010). Neben diesem Rezeptor wurde zusätzlich der AT<sub>2</sub>-Rezeptor entdeckt, welcher noch weiterer Erforschung bedarf und vermutlich gegenteilige Signalwege auslöst (Siragy und Carey 2010). Auch ein AT<sub>4</sub>-Rezeptor wurde beschrieben (Mezzano et al. 2001; Pöschel und Wolf 2006). Die beiden erstgenannten Rezeptoren zeigen eine heterogene renale Verteilung und bestehen aus sieben Transmembran-Domänen (Wolf 2005). Sie aktivieren ein komplexes System an Signaltransduktionswegen (Paul et al. 2006). Neben vielen rezeptorspezifischen Signalwegen teilen sich beide Rezeptoren sogar einen gemeinsamen Signaltransduktionsweg. Dieser läuft über eine Aktivierung des nukleären Faktors KB (NF- KB) (Mezzano et al. 2001). Der AT<sub>1</sub>-Rezeptor ist G-Protein-gekoppelt (Pöschel und Wolf 2006). Durch ihn werden die hämodynamischen Abläufe wie Wasser-, Elektrolythaushalt und Blutdruck reguliert. Weiterhin laufen über ihn die Aldosteronsekretion und die negative Rückkopplung auf die Reninfreisetzung (Siragy und Carey 2010). Zusätzlich ist der AT<sub>1</sub>-Rezeptor für Vasokonstriktion sowie proinflammatorische und fibrotische Prozesse verantwortlich (Pöschel und Wolf 2006). Von dem AT<sub>2</sub>-Rezeptor scheinen vor allem gegenteilige Effekte auszugehen. So führt seine Aktivierung zur Vasodilatation, Induktion von Apoptose und Hemmung des Zellwachstums sowie der Zellproliferation (Pöschel und Wolf 2006). Interessant ist, dass dieser Rezeptor über den NF-kB-Signalweg trotzdem zu einer Hochregulation des Chemokins RANTES führt, welches auf Entzündungszellen chemotaktisch wirkt (Wolf et al. 1997 und Mezzano et al. 2001). Demnach scheint der AT<sub>2</sub>-Rezeptor über RANTES ebenso einen Beitrag zur inflammatorischen Genese beizusteuern. Erwähnenswert ist auch, dass die Expression des AT<sub>2</sub>-Rezeptors bei einer Entzündung oder Verletzung von Gewebe hochreguliert wird (Pöschel und Wolf 2006). Der Ligand des AT<sub>4</sub>-Rezeptors ist Angiotensin IV (Ang IV), ein Abbauprodukt von Ang II (Pöschel und Wolf 2006). In Folge der Bindung von Ang IV an diesen Rezeptor kommt es zur Hochregulierung des PAI-1 (Plasminogen-Aktivator-Inhibitors-1). Dieser inhibiert die Wirkung von Proteasen, welche für den Abbau von ECM verantwortlich sind (Pöschel und Wolf 2006). Durch den fehlenden Abbau folgt eine massive Akkumulation der ECM, was gleichzeitig die Endphase der renalen Fibroseprozesse einleitet (Mezzano et al. 2001).

Es wurde bereits erwähnt, dass alternative Enzymsysteme neben der klassischen RAAS-Kaskade vorliegen (Paul et al. 2006) (siehe Abbildung 5). So wird Ang I auch durch eine Serinprotease namens Chymase, welche sich insbesondere in den Tubuluszellen befindet, zu Ang II gespalten (Pöschel und Wolf 2006). Die Chymase kann zu einem so genannten "ACE-Escape" führen und so die Wirkung von ACE-Hemmern umgehen. Daher können bei einer Therapie mit ACE-Hemmern die Ang-II-Level von manchen Patienten nach einer initialen Senkung wieder auf die Höhe des Anfangswerts zurückkehren (Siragy und Carey 2010). Interessanterweise kam es im Rahmen von diabetischen Nephropathien zu einer Hochregulation der Chymase in renalen Tubuluszellen (Wolf 2005). Neben ACE hat man auch ein ACE 2 entdeckt, welches Ang I zu Ang 1-9 und Ang II zu Ang 1-7 spaltet (Siragy und Carey 2010). Ang 1-9 wird durch ACE weiter zu Ang 1-7 abgebaut (Pöschel und Wolf 2006). Ang 1-7 verhält sich mit einer vasodilatierenden und antiproliferativen Wirkung gegensinnig zu Ang II (Siragy und Carey 2010). Aus diesem Grund nimmt man an, dass es über den AT<sub>2</sub>-Rezeptor wirkt (Pöschel und Wolf 2006). Die weiteren Abbauprodukte des RAAS werden durch verschiedene Peptidasen gespalten. Ang II wird durch die Aminopeptidase A (APA), aber auch andere unspezifischen Proteasen, zu Ang III gespalten. Dieses Abbauprodukt ähnelt Ang II in seiner Regulation von kardiovaskulären und renalen Funktionen (Ruiz-Ortega et al. 2001). Als Spaltprodukt von Ang III entsteht schließlich Ang IV (Pöschel und Wolf 2006).



Das Konzept des klassischen RAAS betrachtet Renin lediglich als eine Protease, welche am Anfang der gesamten Kaskade steht (Kobori et al. 2007). Es wurde jedoch festgestellt, dass Renin neben der Eigenschaft als Protease auch Ang-II-unabhängig direkten Einfluss auf die Entwicklung einer Nierenfibrose nehmen kann (Pöschel und Wolf 2006). So hat man einen spezifischen Renin-Rezeptor im Mesangium und Subendothel der Nierenarterie gefunden, welcher die Synthese von TGF  $\beta$  induzieren kann (Pöschel und Wolf 2006). Genau genommen muss man von einem Pro-Renin-Rezeptor sprechen. Auch Prorenin, welches früher als inaktive Vorstufe von Renin betrachtet wurde (Siragy und Carey 2010), bindet an diesen Rezeptor. Prorenin weist dabei sogar eine höhere Affinität als Renin auf (Siragy und Carey 2010). Neben TGF  $\beta$  induziert der Pro-Renin-Rezeptor einen Anstieg von weiteren Substanzen mit profibrotischer Wirkung. Hierbei ist der PAI-1 zu nennen, aber auch weitere Komponenten der ECM wie Fibronektin und Kollagen I (Siragy und Carey 2010). Auch in Podoyzten wurde dieser Rezeptor identifiziert. Eine Aktivierung konnte allerdings keine Hochregulierung von profibrotischen Substanzen erzeugen, dagegen kam es jedoch zu einer Stimulation der intrazellulären Ang-II-Synthese (Siragy und Carey 2010).

Beim klassischen RAAS steuert Aldosteron seine Wirkung in den Tubuluszellen über Genexpression (Wolf 2005). Inzwischen weiß man, dass Aldosteron sowohl über genomische als auch nicht-genomische Effekte für die Fibroseentwicklung in der Niere mitverantwortlich ist (Fogo 2007). Dies scheint es insbesondere über PAI-1 zu erreichen (Fogo 2007). Bei einer Langzeittherapie mit ACE-Hemmern und AT<sub>1</sub>-Antagonisten kann es zu einem Aldosteron-Escape-Phänomen kommen (Schjoedt et al. 2004 und Wolf 2005). Es wurde beobachtet, dass die Plasma-Aldosteron-Level bei der RAAS-Blockade nach einem kurzen Abfall wieder auf das Anfangsniveau steigen. Der genaue Mechanismus ist jedoch noch nicht genau geklärt (Schjoedt et al. 2004).

#### 1.3 Die RAAS-Blockade – Mögliche Ansatzpunkte

Dadurch, dass das RAAS offenbar in die Pathogenese von kardiovaskulären und renalen Erkrankungen involviert ist, wird der Einsatz von RAAS-Blockern wie ACE-Hemmer und  $AT_1$ -Antagonisten als sinnvoller Therapieansatz gewertet. Man nimmt an, dass dies ebenso für das AS gilt

#### 1.3.1 ACE-Hemmer und AT<sub>1</sub>-Antagonisten

In Form eines "falschen" Substrates interagieren ACE-Hemmer mit dem Enzym ACE. Dabei kommt es zu einer reversiblen Bindung des Inhibitors an das Enzym, was dessen Dysfunktion zur Folge hat (Lüllmann et al. 2006). Ursprünglich wurden ACE-Hemmer als "neue Antihypertensiva" zur Blutdruckkontrolle entwickelt (Wenzel und Wolf 2005). Ihre blutdrucksenkende Wirkung konnte jedoch keine klinischen Vorteile gegenüber den gängigen Antihypertensiva wie  $\beta$ -Blocker oder Diuretika erreichen (Wenzel und Wolf 2005). Mittlerweile sind protektive blutdruckunabhängige Wirkungen der ACE-Hemmer bei diabetischen und nicht-diabetischen chronischen Nierenerkrankungen beschrieben worden (Siragy und Carey 2010). Aus diesem Grund haben Leitlinien ACE-Hemmer als "First-Line-Therapie" bei chronischen Nierenerkrankungen empfohlen (Wenzel und Wolf 2005; Siragy und Carey 2010). Entsprechende Studien sind z.B. die DETAIL (Diabetics Exposed to Telmisartan and Enalapril)- und BENEDICT (The Bergamo Nephrologic Diabetes Complications Trial) -Studie (Pöschel und Wolf 2006; Remuzzi et al. 2006; Bichu et al. 2009). Genauso konnte mit Hilfe der REIN (Ramipril Efficacy in Nephropathy) -Studie bei nicht-diabetischen Nephropathien ein Vorteil für die Therapie mit ACE-Hemmern erkannt werden (Ruggenenti et al. 2001; Pöschel und Wolf 2006). Beim AS wurde die Wirksamkeit von ACE-Hemmern bisher vor allem in tierexperimentellen Studien am COL4A3-Kockout-Mausmodell gezeigt (Gross et al. 2003 und Gross et al. 2004 b). Die Datenlage beim Menschen ist noch gering. In zwei Studien wurde die Gabe von Enalapril bei Kindern beobachtet und in beiden konnte eine Reduktion der Proteinurie festgehalten werden 2000; Proesmans und Van Dyck 2004). Innerhalb (Proesmans et al. unserer Forschungsgruppe hat man daher mit einer Registrierung der Daten von Alport-Patienten aus verschiedenen Ländern Europas begonnen. Ziel dieses europäischen Alport-Registers ist es, die Wirkung von ACE-Hemmern bei Alport-Patienten zu analysieren und schließlich deren Zulassung schon im Kindesalter zu erreichen (Gross und Kashtan 2009). Auch wenn die Ergebnisse sehr vielversprechend sind, können ACE-Hemmer das Fortschreiten der Niereninsuffizienz nicht vollkommen aufhalten. Dies liegt vermutlich daran, dass nicht alle Wege des RAAS durch den ACE-Hemmer geblockt werden können (Pöschel und Wolf 2006). Hierbei ist das ACE-Escape-Phänomen durch die Chymase zu nennen (Siragy und Carey 2010). Des Weiteren verhindern ACE-Hemmer die negative Rückkopplung von Ang II auf die Reninfreisetzung, was eine erhöhte Plasma-Renin-Aktivität (PRA) zur Folge hat (Siragy und Carey 2010). Die PRA gibt die Frequenz der Umwandlung von Angiotensinogen in Ang I durch Renin wider (Cagnoni et al. 2010). Durch seine Ang-II-unabhängigen Effekte kann Renin dabei weiterhin die Entwicklung eines chronischen Nierenversagens unterstützen (Pöschel und Wolf 2006), worauf ACE-Hemmer keinen Einfluss nehmen können.

Die AT<sub>1</sub>-Antagonisten stellen eine weitere Möglichkeit dar, in das RAAS einzugreifen. Sie binden antagonistisch an den AT<sub>1</sub>-Rezeptor und blockieren so die Bindung von Ang II (Cagnoni et al. 2010). Eine Aktivierung der Signalwege des AT<sub>1</sub>-Rezeptors, welche wesentlich zur Entwicklung eines chronischen Nierenversagens beitragen, wird so unterbunden (Pöschel und Wolf 2006). Dabei bleibt der AT<sub>2</sub>-Rezeptor unberührt. Vermutlich führt dies zu einer verstärkten Ang-II-Bindung an den AT<sub>2</sub>-Rezeptor, dessen Wirkungen sich zum Teil gegensätzlich zu denen des AT<sub>1</sub>-Rezeptors verhalten (Fogo 2007). Hierbei sollte aber auch bedacht werden, dass der AT<sub>2</sub>-Rezeptor über RANTES eine immunmodulatorische Funktion wahrnimmt (Wolf et al. 1997 und Mezzano et al. 2001). Neben blutdrucksenkenden Eigenschaften haben auch die AT<sub>1</sub>-Antagonisten in vielen Studien blutdruckunabhängige Wirkungen gezeigt (Pöschel und Wolf 2006). Deshalb stellen sie neben ACE-Hemmern nach aktuellen Leitlinien ebenfalls eine "First-Line-Therapie" für die Behandlung von diabetischen und nicht-diabetischen chronischen Nierenerkrankungen dar (Siragy und Carey 2010). Klinische Studien im Rahmen der diabetischen Nephropatie sind z.B. die RENAAL (Reduction of Endpoints in NIDDM with the Angiotensin II Antagonist Losartan) - und die DETAIL-Studie (Remuzzi et al. 2004; Pöschel und Wolf 2006). Es gibt nur wenige Studien, welche die Wirkung von AT<sub>1</sub>-Antagonisten bei nicht-diabetischen Nephropatien untersucht haben. Unter anderem ist hier die COOPERATE (Combination treatment of angiotensin-II receptor blocker and angiotensin-converting-enzyme inhibitor in non-diabetic renal disease) -Studie zu nennen, bei der viele Patienten eine IgA-Nephropathie aufwiesen (Pöschel und Wolf 2006). Beim AS wurden AT<sub>1</sub>-Antagonisten bisher nur im Tiermodell untersucht (Gross et al. 2004 b). Es konnte ein nephroprotektiver Effekt gezeigt werden, wenn auch die Therapie mit ACE-Hemmern einen größeren Erfolg verzeichnete (Gross et al. 2004 b). Auch bei den AT<sub>1</sub>-Antagonisten kommt es zu einem Anstieg der PRA (Cagnoni et al. 2010). Im

Gegensatz zu den ACE-Hemmern folgt zusätzlich ein Anstieg des Ang II im Plasma (Kobori et al. 2007). Interessanterweise kam es in verschiedenen experimentellen Modellen zu keinem Anstieg des intrarenalen Ang II, was vermutlich mit der Blockade der  $AT_1$ -Rezeptor vermittelten Ang-II-Aufnahme in der Niere zusammenhängt (Kobori et al. 2007).

#### 1.3.2 Die Kombinationstherapie als Alternative zur Monotherapie

Eine Kombinationstherapie der beiden Medikamentenklassen könnte sich möglicherweise als bessere Alternative darstellen, da sich beide Medikamente bezüglich der RAAS-Blockade gegenseitig ergänzen (van der Meer et al. 2010). In einigen kleinen Studien zeigte sich ein Vorteil der Kombinationstherapie gegenüber der Monotherapie, zusätzlich scheint sie auch vor dem Aldosteron-Escape-Phänomen zu schützen (Pöschel und Wolf 2006). Andere Studien konnten wiederum keinen Vorteil belegen, was aber zum Teil auf die Arbeit mit sehr unterschiedlichen Patientenpopulationen und der noch nicht ganz ausgereiften Studienplanung zurückgeführt wird (Cagnoni et al. 2010). Es wurde zudem beobachtet, dass die Frequenz an Nebenwirkungen in der Kombinationstherapie zunimmt. Insbesondere die Hyperkaliämie ist eine gefürchtete und häufige Nebenwirkung (Düsing und Sellers 2009).

Die Kombination eines Aldosteronantagonisten mit ACE-Hemmern oder AT<sub>1</sub>-Antagonisten wäre eine weitere Alternative, um dem Aldosteron-Escape zu entgehen. Studien konnten eine Reduktion der Proteinurie in der Kombination mit ACE-Hemmern zeigen (Pöschel und Wolf 2006; Lattanzio und Weir 2010). Allerdings ist auch hier die Gefahr einer Hyperkaliämie groß (Pöschel und Wolf 2006). Genauso wurde diese Kombination bei fünf Patienten mit AS untersucht. Hierbei ergab sich ebenfalls ein Rückgang der Proteinurie (Kaito et al. 2006). Eine Hyperkaliämie wurde in dieser Studie nicht beobachtet. Man geht davon aus, dass eine Kombination mit Aldosteron auch für das AS eine mögliche Therapieoption darstellt (Kaito et al. 2006).

#### 1.3.3 Der Renin-Inhibitor Aliskiren



Abbildung 6: Grafische Darstellung der Aliskirenbindung an das Enzym Renin; Grafik verwendet aus Derer et al. 2006, S. 152.

Bei Aliskiren handelt es sich um einen kompetitiven Renin-Inhibitor, der mit Renin eine feste Bindung eingeht (Pöschel und Wolf 2006) (siehe Abbildung 6). Aliskiren weist eine besonders hohe Bindungsaffinität zu humanem Renin auf und ist der erste oral verfügbare Renin-Inhibitor, welcher in der klinischen Praxis eingesetzt wurde (Buczko und Hermanowicz 2008). In experimentellen Studien konnte Aliskiren auch die Aktivität von Pro-Renin inhibieren (Siragy und Carey 2010). Bezogen auf seine vermutlich nephroprotektive Wirkung beim AS wurde Aliskiren auch in der vorliegenden Arbeit untersucht. Durch Aliskiren erhofft man sich eine effizientere RAAS-Blockade, da das Medikament direkt am Anfang der Kaskade eingreift (Siragy und Carey 2010). Bei gesunden Probanden konnte eine erfolgreiche Reduktion der PRA, Ang-I- und Ang-II-Leveln in den Dosen 40 mg bis 640 mg erreicht werden, was einen Vorteil gegenüber ACE-Hemmern und AT<sub>1</sub>-Antagonisten darstellt (Cagnoni et al. 2010). Bei hypertensiven Patienten wurde bei einer Dosis von 300 mg die PRA zu 50-80 % reduziert. Dabei blieben die Level der PRA als auch von Ang I und Ang II bis zu 48 h erniedrigt. Die Halbwertszeit von Aliskiren ist sehr lang und liegt zwischen 23 und 70 Stunden (Cagnoni et al. 2010). Zusätzlich konnten im Urin enthaltene Aldosteron-Level ab einer Dosis von 80 mg reduziert werden (Cagnoni et al. 2010). Es scheint, als ob Aliskiren wichtige Voraussetzungen besitzt, um die therapeutischen Lücken von ACE-Hemmern und AT<sub>1</sub>-Antagonisten zu schließen. Aliskiren bewies in Hypertonie-Studien eine vergleichbar gute blutdrucksenkende Eigenschaft wie ACE-Hemmer und AT<sub>1</sub>-Antagonisten (Uresin et al. 2007; Oparil et al. 2007; Andersen et al. 2008; Stanton et al. 2003). Klinische Studien, die Aliskiren bei chronischen Nierenerkrankungen untersuchen, sind zurzeit noch zahlenmäßig begrenzt, und es gibt Kritik an der mangelnden Studienlage bezüglich harter Endpunkte (Peixoto und Orias 2009). Es kommt hinzu, dass neben der diabetischen Nephropathie keine Ergebnisse zu Nephropathien mit anderer Genese vorliegen. In zwei kleinen placebo-kontrollierten Studien bei Patienten mit Diabetes Mellitus Typ 2 führte

Aliskiren zu einer signifikanten Reduktion der Proteinurie (Siragy und Carey 2010). Umfangreicher ist die AVOID (Aliskiren in the evaluation of proteinuria in diabetes)-Studie. Auch hier kam es zu einer signifikanten Proteinuriereduktion unter Aliskiren, allerdings in Kombination mit Losartan (Parving et al. 2008). Daten zur nicht-diabetischen Nephropathie gibt es lediglich aus einigen tierexperimentellen Studien. Ähnlich wie beim Menschen erreichte Aliskiren in diesen Studien eine signifikante Reduktion der Proteinurie (Pilz et al. 2005; Vanourková et al. 2010; Yamamoto et al. 2009, Dechend et al. 2007). Durch weitere Untersuchungen wurde versucht die nephroprotektive Wirkung noch stärker zu untermauern. So konnte unter Aliskiren eine geringere Fibrosierung der Niere und auch eine Verringerung des renalen Influx von Entzündungszellen beobachtet werden (Yamamoto et al. 2009, Dechend et al. 2007). Bisher gibt es noch keine Studien, in denen die Anwendung von Aliskiren bei Patienten mit Alport-Syndrom beschrieben wurde. Vermutlich ist die vorliegende Arbeit die erste, die die Anwendung von Aliskiren in einem Alport-Mausmodell untersucht.

Zurzeit scheint sich Aliskiren nicht als "First-Line-Therapie" in der Behandlung von chronischen Nierenerkrankungen durchzusetzen. Es verringert zwar verlässlich nephroprotektive Marker wie die Proteinurie und PRA, trotzdem müssen noch weitere Studien folgen, die seine Wirkung auch mit harten Endpunkten wie Dialysepflichtigkeit und Progression zum terminalen Nierenversagen belegen. Solche Studien sind z.B. die gerade laufende ALTITUDE (Aliskiren Trial in Type 2 Diabetic Nephropathy)-Studie, die eine Aliskirenwirkung sowohl in kardialen als auch renalen Endpunkten untersucht (Parving et al. 2009). Ähnlich der AVOID-Studie kombiniert die ALTITUDE-Studie Aliskiren mit konventionellen RAAS-Blockern. Die Tendenz hin zur Kombinationstherapie, wie schon bei den ACE-Hemmern, AT<sub>1</sub>-Antagonisten und Aldosteronantagonisten, kann man auch bei Aliskiren erkennen. Dabei konnten bereits vorteilhafte Effekte im Vergleich zur Monotherapie erzielt werden (Cagnoni et al. 2010; Düsing und Sellers 2009). Die Kombinationstherapie wurde in der Regel gut vertragen, und es kam darüber hinaus zu keinem Anstieg der Nebenwirkungen wie z.B. einer Hyperkaliämie (Düsing und Sellers 2009).

## 1.4 Fragestellung und Zielsetzung

In dieser Dissertation soll der Renin-Inhibitor Aliskiren in einem Alport-Mausmodell (COL4A3-Knockout-Maus) auf sein nephroprotektives Potential hin untersucht werden. Es stellt sich die Frage, ob das Medikament sowohl der Entwicklung einer Nierenfibrose als auch dem daraus resultierenden Nierenversagen entgegenwirken kann. Mit Hilfe der Daten aus Überlebenszeit, Proteinurie und Histologie soll die Effektivität von Aliskiren mit unbehandelten Kontrollen bzw. Placebo-Mäusen verglichen werden. Die Hypothese der vorliegenden Arbeit ist, dass der Renin-Inhibitor in einer effizienten Weise der Komplexität des RAAS entgegenwirkt und so die Entwicklung einer Nierenfibrose sowie des Nierenversagens inhibiert. Bezüglich der Ergebnisdaten erhofft man sich daher ein signifikant längeres Überleben und eine Proteinuriereduktion bei den behandelten COL4A3-Knockout-Mäusen. Weiterhin erwartet man eine Reduzierung der renalen tubulointerstitiellen Fibrose und glomerulären Sklerose.

## 2 Versuchstiere, Material und Methoden

#### 2.1 Versuchstiere

#### 2.1.1 Die COL4A3-Knockout-Maus

Bei den Versuchstieren handelt es sich um COL4A3-Knockout-Mäuse in einem 129/SvJ Hintergrund. Sie wurden freundlicherweise vom Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA zur Verfügung gestellt. 1996 wurde dieses Knockout-Mausmodell von D. Cosgrove et al. entwickelt. Wie bei Menschen kommt es auch bei der COL4A3-Knockout-Maus zu einem Verlust der  $\alpha 3(IV)$ - $\alpha 5(IV)$ -Ketten. Stattdessen persistieren die  $\alpha 1(IV)$ - und  $\alpha 2(IV)$ -Ketten. Diese sind im Rahmen des AS (Alport-Syndrom) nicht nur im Mesangium und der Region der GBM (glomeruläre Basalmembran), ihre primären subendothelialen Lokalisationen im erwachsenen gesunden Organismus, sondern in der gesamten Breite der GBM zu finden (Cosgrove et al. 1996). Das Mausmodell durchläuft innerhalb von zehn Wochen den typischen Krankheitsverlauf des AS (Gross und Weber 2003). Ab der vierten Lebenswoche entwickeln die Mäuse eine Hämaturie gefolgt von einer Proteinurie ab der sechsten Lebenswoche. Schließlich beginnt nach der achten Lebenswoche die Entwicklung eines progredienten Nierenversagens, welches in der zehnten Lebenswoche in der Regel zum Tod führt. Dieser Krankheitsverlauf verhält sich, abgesehen von der kurzen Zeitspanne, identisch zum menschlichen AS. Genauso werden ultrastrukturelle Veränderungen der GBM beim Alport-Mausmodell beobachtet (Cosgrove et al. 1996). Vorteile dieses Tiermodells und optimale Forschungsbedingungen sind eine hohe Generationszahl, eine kurze Lebenszeit, ein einheitlicher Phänotyp durch gleiche Umweltbedingungen sowie die Möglichkeit zur frühzeitigen Genotypisierung vor dem Krankheitsausbruch (Gross und Weber 2003). Bei den gesunden Kontrollen handelt es sich um Wildtyp-Nachkommen aus derselben Zucht. Diese Mäuse erkranken nicht am AS. In verschiedenen tierexperimentellen Studien wurde das Alport-Mausmodell bereits erfolgreich etabliert (Gross et al. 2003; Gross et al. 2004 b).

#### 2.1.2 Zucht

Das Kreuzen von heterozygoten Elternpaaren erbrachte in der Nachkommenschaft einen Prozentanteil von 20-25 % homozygoter COL4A3-Knockout-Mäuse. Um den Genotyp der

Mäuse zu bestimmen, wurde genetisches Material mittels Standard-PCR (*engl. Polymerase Chain Reaction*) analysiert und die Tiere daraufhin nach dem Genotyp in Wildtyp (+/+), heterozygot (+/-) oder homozygot (-/-) in Gruppen eingeteilt.

#### 2.1.3 Haltung

Alle Mäuse dieser Doktorarbeit lebten unter gleichen kontrollierten Bedingungen. Die Tiere wurden in einem "Typ 2 Long Käfig" in IVC (*engl. individually ventilated cages*) Rackhaltung mit einer Einstreu namens "LIGNOCEL Hygienic Animal Bedding, FS-14" (J. Rettenmaier& Söhne, Rosenberg, D) gehalten. Ein Umsetzen der Mäuse in frische Käfige erfolgte zweimal pro Woche. Im Tierstall herrschte eine Luftfeuchtigkeit von 55 % bei 21°C und einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus (Beleuchtungszeit: 06:00-18:00 Uhr). Jede Maus erhielt freien Zugang zu Leitungswasser und 3-7 g Nahrung "ssniff®" (Spezialdiäten GmbH, Soest, D) pro Tag. Als Nahrung wurde in der Zucht "ssniff® M-Z" und später bei der Haltung der Mäuse "ssniff® R/M-H" gefüttert.

#### 2.2 Material

#### 2.2.1 Chemikalien

Folgende Chemikalien sind dem DNeasy® Blood & Tissue Kit (250) Qiagen, Hilden, D entnommen: ATL-Puffer/Proteinase K/ AL-Puffer/ AW1-Puffer/ AW2-Puffer/ AE-Puffer. Alle weiteren Chemikalien sind in Tabelle 3,4 und 5 aufgeführt.

Name	Bezugsquelle
Aceton	Merck, Darmstadt, D
Agarose	Invitrogen, Carlsbad, USA
Aliskiren	Novartis International AG,Basel, CH
Aqua dest.	Ampuwa, Fresenius Kabi, Bad Homburg, D
Aqua bidest. (zweifach destilliertes Wasser)	Klinikum Göttingen, D
BSA (Bovine Serum Albumin)	PAA Laboratories, Pasching, Austria
Chloroform	Sigma, Steinheim, D
Coomassie® Brilliant Blue	Biorad, Hercules, CA

Desinfektionsmittel	Braunoderm, Braun, Melsungen, D
dNTP	Invitrogen, Carlsbad, USA
Entellan Schnelleindeckmittel	Merck, Darmstadt, D
Eosin G	Roth, Karlsruhe, D
Ethanol	Merck, Darmstadt, D
99 % Ethanol (Ethylalkohol)	Gereso, Einbeck, D
Ethidiumbromid (0,02 %)	Merck, Darmstadt, D
Fluoreszent Mounting Medium	Dako, Carpinteria, USA
Hämalaun nach Mayer	Merck, Darmstadt, D
HCl (Salzsäure)	Merck, Darmstadt, D
Isofluran	Abbott, Wiesbaden, D
Ketamin (10%)	WDT, Garbsen, D
Kontrolle (Urinelektrophorese) SeeBlue® Plus2 Prestained	Invitrogen, Carlsbad, USA
Methanol	Sigma, Steinheim, D
Primer A,B,C (dATP, dTTP, dGTP) COL4A3exon 5-rev	Invitrogen, Carlsbad, USA
Proteinase K	Qiagen, Hilden, D
RNA-Later	Qiagen, Hilden, D
Silane (3-Aminopropyl)	Sigma, Steinheim, D
Taq-Polymerase	Peqlab, Erlangen, D
Xylol	Merck, Darmstadt, D
Xylazin	Riemser, Greifswald, D
Ziegenserum GIBCO	Invitrogen, Carlsbad, USA

Tabelle 3: verwendete Chemikalien

Puffer:	
ATL-Puffer (engl. Tissue Lysis)	Qiagen, Hilden, D
AL-Puffer (engl. Lysis)	Qiagen, Hilden, D
AW1-Puffer (engl. Wash 1)	Qiagen, Hilden, D
AW2-Puffer (engl. Wash 2)	Qiagen, Hilden, D
AE-Puffer (engl. Elution)	Qiagen, Hilden, D
Blauer Laufpuffer PCR	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Laufpuffer Urinelektrophorese	Invitrogen, Carlsbad, USA
MOPS SDS Running Buffer	

Reactionbuffer S	Peqlab, Erlangen, D	
Sample-Puffer LDS Sample Buffer	Invitrogen, Carlsbad, USA	
TRIS (Trishydroxymethylaminomethan) - Puffer	Roth, Karlsruhe, D	
TAE (TRIS-Acetat-EDTA) -Puffer:		
TRIS-Puffer	Roth, Karlsruhe, D	
Essigsäure	Merck, Darmstadt, D	
EDTA	Merck, Darmstadt, D	
TBS (TRIS-Buffered-Saline) -Puffer:		
Aqua bidest.	Klinikum Göttingen, D	
NaCl 0,9 %	Merck, Darmstadt, D	
Salzsäure	Merck, Darmstadt, D	
TRIS-Puffer	Roth, Karlsruhe, D	
Lösungen: 4 % Formalin-Lösung		
37 % Formalin	Merck, Darmstadt, D	
$Na_2HPO_4x2H_2O$	Merck, Darmstadt, D	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> xH <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt, D	

Tabelle 4: verwendete Chemikalien zur Herstellung von Puffern und Lösungen

Antikörper		
Primärantikörper		Bezugsquelle
Laminin-Antikörper, IgG	Polyclonal, Rabbit	Abcam, Cambridge,USA
Sekundärantikörper		Bezugsquelle
Goat-anti-Rabbit-AK,IgG, CY3 gekoppelt,	Polyclonal, Goat	Dianova, Hamburg, D

Tabelle 5: verwendete Antikörper

#### 2.2.2 Materialien

Folgende Materialien sind dem DNeasy® Blood & Tissue Kit (250) Qiagen, Hilden, D entnommen: DNeasy Membran, Auffanggefäße. Alle weiteren Materialien sind in der folgenden Liste angegeben.

#### - Alzet 2004er subcutan Pumpe: Alzet Osmotic Pumps, Cupertino, CA

- Auffanggefäße: Collection Tubes (2 ml)
- Deckgläser: Menzel-Gläser, Glasbearbeitungswerk, Braunschweig, D
- DNeasy Membran: DNeasy Mini Spin Column
- Gel-Urinelektrophorese: 4-12 % Bis-Tris Gel, Invitrogen, Carlsbad, USA
- Injektions-Kanüle: BD Mikrolance 27G, Discardit, Franklin Lakes, NJ USA
- Punktionskanüle: BD Mikrolance 19 G, Discardit, Franklin Lakes, NJ USA
- kleine PCR-Reaktionsgefäße: Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
- Nahtmaterial: 2/0 PH-Seide nicht resorbierbar, Johnson&Johnson, Ethicon, Norderstedt, D
- Objektträger: Waldemar Knittel, Glasbearbeitungswerk, Braunschweig, D
- Paraffin-Gitter: Einbettkassette-universal, Universitätsmedizin Göttingen, Göttingen, D
- PCR-Reaktionsgefäße 1,5 ml: Biozym Biotech Trading GmbH, Wien, D
- Reaktionsgefäße: Microtubes 1,5 ml, Sarstedt, Nümbrecht, D
- 5 ml Röhrchen: Sarstedt, Nümbrecht, D
- Schere: Eigentum der Universitätsmedizin Göttingen, Göttingen, D
- Skalpell: Technocut Scalpel, HMD Healthcare, Hereford, UK
- 5 er Spritze: BD Discardit, Franklin Lakes, NJ USA
- Steriles OP-Tuch: Eigentum der Universitätsmedizin Göttingen, Göttingen, D
- Sterile Handschuhe: Gammex, Ansell Healthcare Europe, Brussels, Belgium
- Tupfer: Pagasling No 3, Paul Hartmann AG, Heidenheim, D

#### 2.2.3 Geräte

- Fluoreszenzlampe: XBO 75W HB0 100W
- Kamera: F-View, Olympus, Hamburg, D
- Kühlschrank: Sanyo, Medical Freezer, Netherlands
- Laufkammer-Urinelektrophorese: Electrophoresis Cell, XCELL Surelock, Invitrogen, Carlsbad, USA
- PCR-Laufkammer: Horizon 58 Life Technologies, Invitrogen, Carlsbad, USA
- Pipetten: Eppendorf Research, Hamburg, D
- Mikroskop: Axiovert S100 TV, Zeiss, Oberkochen, D
- Mikrotom: Reichert-Jung, Enno Vieth, Wiesmoor, D

- Mirkotom-Wasserbecken: Enno Vieth, Wiesmoor, D
- Oven: Convection Oven, Sanyo, Japan
- Rondelleinbetter, Paraffin-Gerät: TP1020, Leika, Wetzlar, D
- PCR-Gerät: Biometra TProfessional Thermocycler, Göttingen, D
- PCR-GEL-Kamera: Flur-S<sup>TM</sup>Multilmager, Biorad, Hercules, CA
- ROTAMAX 120: W. Krannich, Göttingen, D
- Stromgerät: PS 304, Gibco BRL Electrophoresis Power Supply, LifeTechnologies
- Thermomixer (Wasserbad): Comfort eppendorf 1,5 ml, Hamburg, D
- Vortexgerät: W. Krannich, Göttingen, D
- Zentrifuge: Hermle Z233M, W. Krannich, Göttingen, D

#### 2.2.4 Software

- Computerprogramm für PCR: Multianalyst, Biorad, Hercules, CA
- Computerprogramm für Histologie: Analysis, Soft Imaging System GmbH
- Textverarbeitungsprogramm: Microsoft® Word 2002, Microsoft Corporation

#### - Literaturrecherche:

- PubMed, National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, USA
- Georg-August-Universität Göttingen, Niedersächsische Staats- und Universitätsbibliothek Göttingen, D

#### - Statistik Software:

- Microsoft<sup>®</sup> Excel 2000, Microsoft Corporation,
- Statistika, StatSoft (Europe) GmbH, Hamburg, D
- SAS Version 9.1, SAS Intstitute Inc., Cary, USA
- SPSS, IBM Deutschland GmbH, München, D
- Cohen's Unweighted Kappa, VassarStats: Website for Statistical Computation, Vassar College, Poughkeepsie, USA
# 2.3 Studienbeschreibung

Für die tierexperimentelle Studie wurden die Mäuse den unten aufgelisteten Gruppen zugeordnet. Zuvor ermittelte man über ein Standard-PCR-Verfahren den Genotyp einer jeweiligen Maus.

- Therapie-Gruppe A: Behandlung von neun homozygoten Tieren mit dem Reninantagonisten Aliskiren zur Ermittlung der Überlebenszeit.
- Therapie-Gruppe B: Behandlung von fünf homozygoten Tieren mit dem Medikament Aliskiren zur Blut-, Urin- und Organentnahme; die Tötung erfolgte mit ca. neuneinhalb Wochen.
- Kontroll-Gruppe A: Unbehandelte und mit Placebo behandelte homozygote Mäuse, insgesamt 22 Tiere, zur Ermittlung der Überlebenszeit.
- Kontroll-Gruppe B: Vier unbehandelte homozygote Mäuse und drei unbehandelte Wildtyp-Mäuse zur Blut-, Urin- und Organentnahme; die Tötung erfolgte mit ca. neuneinhalb Wochen.

Die Tiere der Therapie-Gruppe wurden im Alter von sechs Wochen einer Operation unterzogen. Während einer Kurznarkose implantierte man mit Aliskiren gefüllte osmotische Pumpen im subkutanen Bindegewebe sagittal der Wirbelsäule. Die gleiche Operation wurde bei den mit Placebo behandelten Tieren der Kontroll-Gruppe A durchgeführt. Allerdings verwendete man anstatt Aliskiren NaCl 0,9 %.

In den Gruppen A, in welchen die Überlebenszeit festgehalten wurde, beobachtete man die Tiere bis zu ihrem Tod. Es wurde überprüft, dass weder Infektionen noch andere Zwischenfälle außer dem Tod durch Nierenversagen eine Todesursache darstellten.

In den Gruppen B wurden die Mäuse mit ca. neuneinhalb Wochen getötet. Es folgte die Bestimmung des Harnstoffs im Blut sowie des Proteinanteils im Urin. Aus der Niere fertigte man histologische Präparate an, die anschließend mit einer HE (Hämatoxylin-Eosin)-Färbung sowie immunhistochemisch aufgearbeitet wurden. Zur visuellen Darstellung fotografierte man die bearbeiteten histologischen Präparate und hielt sie digital als Computerdatei fest. Das Studiendesign ist in Abbildung 1 graphisch dargestellt.



Abb. 7: Experimenteller Ablauf der Studie;  $\bigcirc$  = Urinabnahme mit 6, 7½, 9½ Wochen;  $\blacksquare$  = Zeitpunkt von Operation, Nierenversagen oder Tötung;  $\rightarrow$  = Art der Untersuchung.

# 2.4 Methoden

# 2.4.1 PCR

Die Standard-PCR wurde zur Bestimmung des Genotyps durchgeführt. Für den Verdau gab man Gewebsmaterial von einer Ohrbiopsie der jeweiligen Maus in ein 5 ml Röhrchen mit ATL-Puffer sowie Proteinase K. Nach Durchmischen mit dem Vortex-Apparat wurde die Probe bei 55 °C im Wasserbad inkubiert. Es folgte die DNA (*engl. deoxyribonucleic acid*)-Extraktion. Nach einem ersten Durchlauf in der Zentrifuge wurde nur der Überstand mit der DNA verwendet, der Rest wurde verworfen. Diesen Überstand zentrifugierte man mehrmals unter Zugabe von ALE-Puffer, AW1-Puffer, AW2-Puffer und AE-Puffer. Wesentlich für dieses Verfahren sind spezielle Auffanggefäße mit einer "DN-Easy-Membran", welche die DNA während des Zentrifugendurchlaufs zurückhalten. Die abzentrifungierten Reste wurden nach jedem Durchlauf verworfen. Nun mischte man jede Probe mit dem Mastermix, bestehend aus H<sub>2</sub>O, "Reactionbuffer S", den drei "Primern" A B und C, der Tag-Polymerase sowie den Nukleotiden dNTP, und gab die Proben danach in das PCR-Gerät. Während dem PCR-Durchlauf wurde das Gel für die Laufkammer vorbereitet. Hierzu verwendete man ein Gemisch aus Agarose und TAE-Puffer. Zusätzlich wurde Ethidiumbromid (0,02 %) nach kurzem Aufkochen dem Gel-Gemisch beigefügt und das fertige Gel konnte in die Laufkammer gegeben werden. Nach einer Abkühlzeit von ca. 10 Minuten befüllte man die Laufkammer mit TAE-Puffer. Im Anschluss wurden die fertigen Proben aus dem PCR-Gerät genommen und jeweils mit blauem Laufpuffer versehen. Man beschickte je eine Tasche des Gels mit 15 µl der Probe und stellte das Stromgerät auf 90 mA, 120 mV ein. Nach einer Zeit von 40 Minuten wurde das fertige Gel mit einer Kamera für PCR-Gele fotografiert und im Computerprogramm Multianalyst bearbeitet (siehe Anhang, 9.1 Protokoll).

#### 2.4.2 Implantation einer osmotischen Pumpe

# Vorbereitung

Vor der Implantation wurde eine Alzet 2004er Subkutan-Pumpe mit 16,7 mg Aliskiren und 200  $\mu$ l NaCl 0,9 % beschickt. Anschließend musste man die fertige Pumpe für 40 Stunden in NaCl 0,9 % belassen. Für die Placebo-Gruppe wurden die Pumpen lediglich mit NaCl 0,9 % beschickt. Die Tagesdosis entspricht dabei 25 mg/kg/Tag bei einer 20 g schweren Maus und einer Infusionsrate von 0,25  $\mu$ l/h über 28 Tage.

# Pumpenimplantation

# -Kurznarkose:

Zunächst musste die Maus zur Dosisermittlung der Kurznarkose gewogen werden. Die Narkotika Ketamin und Xylasin wurden der Maus intraperitoneal injeziert. Nach Bestätigung des Wirkungseintritts mittels Reflexüberprüfung konnte die Pumpenimplantation beginnen.

# -Implantation:

Zuallererst rasierte man das Fell seitlich der Wirbelsäule sowie direkt auf dieser. Nach der Rasur legte man die Maus auf den Operationstisch, welcher zuvor mit einem sterilen Tuch abgedeckt wurde. Es folgten die Desinfektion des Rasurbereichs und danach der Hautschnitt. Dieser wurde lateral der Wirbelsäule gesetzt. Vom Hautschnitt aus löste man die Haut von der Muskelfaszie, indem man stumpf nach kranial präparierte. Man platzierte die Pumpe in den nun subkutan entstandenen Raum seitlich der Wirbelsäule. Danach erfolgte die Hautnaht mit Einzelknopfnähten. Hierbei musste darauf geachtet werden, dass die Pumpe locker unter der Haut zu liegen kam, um dem Risiko der Nahtinsuffizienz vorzubeugen.

Die Maus wurde anschließend in seitlicher Rückenlage wieder in ihren Käfig gelegt und das Aufwachen beobachtet.

# 2.4.3 Urinabnahme

In der Therapie-Gruppe B und Kontroll-Gruppe B wurden im Alter von sechs und siebeneinhalb Wochen Urinproben abgenommen. Diese Urinproben gewann man durch einen Griff in den Nacken der Maus. Dieser kurzzeitige Schreckensmoment führte naturgemäß zum Wasserlassen des Tieres. Der Urin wurde mit einem Reaktionsgefäß aufgefangen und eingefroren.

## 2.4.4 Tötung sowie Blut-, Urin- und Organentnahme

Im Alter von ca. neuneinhalb Wochen wurden die Mäuse der Therapie-Gruppe B und Kontroll-Gruppe B getötet. Zuvor betäubte man die Tiere durch eine Isofluran-Narkose, dann folgte die zervikale Dislokation. Über eine kardiale Punktion gewann man Blut. Den Urin, welcher während des Todesprozesses ausgeschieden wurde, nahm man mit einer Pipette auf. Sowohl das Blut als auch der Urin wurden in Reaktionsgefäßen eingefroren. Als Nächstes entnahm man die Nieren und teilte sie jeweils in zwei Hälften. Dabei gab man in zwei Paraffingitter jeweils eine von zwei Nierenhälften und bewahrte diese vorerst in einer 4 %-Formalin-Lösung auf. Von den anderen beiden Hälften wurde eine in ein Reaktionsgefäß mit "RNA-Later" gegeben, die andere Hälfte gab man in ein weiteres leeres Reaktionsgefäß. Beides wurde eingefroren.

#### 2.4.5 Silanisierung

Für die Silanisierung wurde eine Lösung aus 10 ml Silane und 500 ml Aceton angefertigt, in welche die Objektträger für zwei Minuten hineingelegt wurden. Danach wusch man sie mit Aqua bidest. und trocknete sie bei 60 °C für 15 Minuten.

# 2.4.6 Färbungen

Zunächst wurden die in 4 % Formalin-Lösung eingelegten Nierenhälften in Paraffin eingebettet. Hierzu verwendete man einen Rondelleinbetter. Von den fertigen Paraffinblöcken fertigte man am Mirkrotom 3-5  $\mu$ m dicke Schnitte an. Diese gab man daraufhin auf silanisierte Objektträger und ließ sie trocknen.

#### 2.4.6.1 Immunhistochemische Färbung

In einem ersten Schritt wurden die mit histologischen Schnitten beschickten Objektträger auf 80 °C für 30 Minuten erwärmt und anschließend in eine absteigende Alkoholreihe gegeben. Danach badete man sie in Leitungswasser und Aqua bidest. Es folgte die Andauung der Proben mit 50 mM Tris-HCl-Puffer und Proteinase K sowie drei Waschschritten in TBS-Puffer. Nach der Behandlung mit einer Blocklösung aus TBS und BSA wurde jeder Objektträger mit dem Primär-Antikörper (Rabbit IgG, polyclonal) beschickt. Es schlossen sich wieder drei Waschschritte mit TBS-Puffer und die Behandlung mit einer weiteren Blocklösung aus TBS, BSA und Ziegenserum an. Als Nächstes wurde der Sekundär-Antikörper hinzugefügt (Goat-anti-Rabbit-AK, IgG, polyclonal) und zum Schluss folgten noch drei Waschschritte mit TBS-Puffer. Nun konnte die Einbettung in "DAKO Fluorescent Mounting Medium" vorgenommen werden. Die fertigen Objektträger wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop angeschaut und über eine angeschlossene Kamera als Computerdatei festgehalten. Zur Optimierung der Bildqualität bearbeitete man die Dateien mit dem Computerprogramm "Analyses" (siehe Anhang, 9.2 Protokoll).

#### 2.4.6.2 HE-Färbung

Für die HE-Färbung wurden die beschickten Objektträger wie bei der immunhistochemischen Färbung zuerst erwärmt und anschließend mit einer absteigenden Alkoholreihe behandelt. Danach badete man sie in Aqua bidest. und es folgte die erste Färbung mit Hämalaun nach Mayer. Im Anschluss wurden die Objektträger kurz mit Leitungswasser abgespült und unter fließendem Wasser für ca. 15 Minuten gebläut. Dann führte man die zweite Färbung mit 0,5 % Eosin durch. Nach kurzem Auswaschen mit Aqua bidest. gab man sie in eine aufsteigende Alkoholreihe. Hiernach wurden die gefärbten Schnitte mit Entellan Schnelleindeckmittel fixiert und mit kleinen Deckgläschen zugedeckt. Die fertigen Objektträger wurden unter dem gleichen Mikroskop wie für die immunhistochemische Färbung betrachtet. Mit einer zugeschalteten Kamera konnten digitale Aufnahmen angefertigt werden, welche man daraufhin mit dem Computerprogramm "Analyses" bearbeitete (siehe Anhang, 9.3 Protokoll).

#### 2.4.7 Urinelektrophorese

Bei der Proteinuriebestimmung mittels Urinelektrophorese begann man zuerst mit einer Chloroform-Methanol-Fällung und extrahierte so das in der Probe enthaltene Protein. Es folgte die Konzentrierung der Probe. Bei mehreren Durchläufen in der Zentrifuge wurde nach jedem Durchlauf die obere Phase verworfen. Der Proteinanteil der Probe wurde so zurückbehalten, da er sich in der unteren Phase der Probe befand. Anschließend wurden alle Proben für eine Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Am nächsten Tag versah man sie mit einem Sample-Puffer sowie Aqua bidest. und erwärmte sie daraufhin. Danach wurden die Proben auf Eis gestellt. Im nächsten Schritt bereitete man das Elektrophoresegerät vor und befüllte jede Geltasche des vorgefertigten Gels mit je 15 µl Probe. Der Strom wurde zuerst auf 80 V eingestellt und später auf 100 V erhöht. Anschließend färbte man das Gel mit dem Farbstoff "Coomassie Blue". Es folgten schließlich noch drei Waschschritte auf einem Rotationsgerät, bevor man das Gel in den Computer einscannen und als Computerdatei abspeichern konnte (siehe Anhang, 9.4 Protokoll).

# 2.4.8 Bestimmung des Aliskiren-Serumspiegels

Die Bestimmung des Serumspiegels von Aliskiren übernahm freundlicherweise Dr. David Feldman von Novartis.

# 2.4.9 Western Blot

Die Bestimmung der Wachstumsfaktoren TGF  $\beta$  (*engl. transforming growth factor*  $\beta$ ) und CTGF (*engl. connective tissue growth factor*) aus dem Nierengewebe mittels "Western Blott" wurde freundlicherweise von PD Dr. rer. nat. Rainer Girgert durchgeführt und zur Verfügung gestellt.

# 2.4.10 Statistische Analyse

Zur statistischen Ausarbeitung wurden verschiedene Methoden angewendet. Sie sind im Folgenden kurz beschrieben.

# 2.4.10.1 Statistische Analyse der Überlebensdaten

Zum Vergleich der Überlebensdaten aller aufgeführten Maus-Gruppen wurde eine Kaplan-Meier-Kurve erstellt. Als Ereignis definierte man den Tod durch Nierenversagen. Alle anderen Todesursachen gingen als zensierte Daten in die Statistik mit ein und wurden entsprechend vermerkt. Zur Überprüfung des Signifikanzniveaus verwendete man einen Log-Rang-Test, welcher als Standardverfahren bei der Überlebenszeitanalyse in Gruppenvergleichen gilt. In einem weiteren Schritt wurden nur die Gruppen A, die ausschließlich für die Überlebenszeitbestimmung vorgesehen sind, in einer Box-Plot-Graphik verglichen. In diesem Fall überprüfte man die Signifikanz mit einem t-Test.

# 2.4.10.2 Statistische Analyse der histologischen Präparate

Hierfür wurden die histologischen Präparate der Gruppen B verwendet. Diese konnten als Computerdateien mit Hilfe eines Punktescores durch drei unabhängige Reader (auf Deutsch Beurteiler) blind beurteilt werden. Der Score wurde in einer Skala von 1-3 festgelegt, wobei man 1 gleich gesund und 3 gleich krank definierte. Um die Übereinstimmung der Reader zu testen, wurde Cohens-Kappa als statistisches Maß verwendet. Zum weiteren Vergleich der Reader nutzte man den Bland-Altman-Plot.

# 3 Ergebnisse

Aliskiren erzielt bei behandelten COL4A3-Knockout-Mäusen im Vergleich zu nicht behandelten Kontrollen einen signifikanten Überlebensvorteil.

# 3.1 Analyse der Überlebensdaten

# 3.1.1 Vergleich der Überlebenszeit der Gruppen A und B

Um die Effizienz des Reninantagonisten Aliskiren beurteilen zu können, wurde die Überlebenszeit von 39 Mäusen homozygoten COL4A3-Knockout-Mäusen mit und ohne Aliskiren-Therapie verglichen. Die Tiere wurden für die Studie in die folgenden vier Gruppen eingeteilt.

- Therapie-Gruppe A: In dieser Gruppe wurden insgesamt neun Mäuse mit dem Medikament Aliskiren ab der sechsten Woche behandelt. Eine Maus dieser Gruppe starb perioperativ.
- Kontroll-Gruppe A: Die 22 Mäuse dieser Gruppe erhielten keine Therapie oder wurden ab der sechsten Woche mit Placebo behandelt.
- Therapie-Gruppe B: Alle Mäuse dieser Gruppe behandelte man wie die Therapie-Gruppe A ab der sechsten Woche mit Aliskiren. Es wurden drei von fünf Mäusen mit neuneinhalb Wochen getötet. Eine Maus starb schon vor der Tötung. Bei einer Weiteren wurden die Überlebensdaten nicht festgehalten, sie wird daher in diesem Abschnitt nicht aufgelistet.
- Kontroll-Gruppe B: In dieser Gruppe erhielten alle vier Mäuse keine Therapie. Auch hier starb eine Maus vor der geplanten Tötung. Die Wildtyp-Mäuse dieser Gruppe, welche im Kapitel 2 Erwähnung fanden, wurden für diese Statistik nicht verwendet.

Aliskiren wurde den Mäusen im Alter von sechs Wochen über eine subkutan implantierte osmolare Pumpe verabreicht. Pro Maus hat man eine Dosis von 16,7 mg Aliskiren über eine Therapiedauer von vier Wochen gegeben, was einer Tagesdosis von 25 mg/kg/Tag entspricht. Der Zeitraum, in dem die Überlebenszeit festgehalten wurde, beträgt 93 Tage. In Tabelle 6 sind die Überlebenszeiten aller vier Gruppen in Tagen aufgelistet.

Maus	Therapie-Gruppe A	Kontroll-Gruppe A	Therapie-Gruppe B	Kontroll-Gruppe B
1	43	76	67	70
2	79	66	67	70
3	68	69	67	60
4	93	79	67	67
5	79	65		
6	77	65		
7	82	66		
8	83	70		
9	68	70		
10		68		
11		63		
12		63		
13		57		
14		61		
15		63		
16		63		
17		62		
18		66		
19		72		
20		67		
21		68		
22		67		

Tabelle 6: Alle vier Gruppen mit dazugehörigen Überlebenszeiten (in Tagen) der jeweiligen Mäuse

Eine Differenzierung bezüglich der Todesursache stellt Tabelle 7 dar. Es wird zwischen dem Tod durch Nierenversagen und Tod anderer Ursache unterschieden. Diese Daten sind Grundlage für den Kaplan-Meier-Schätzer, der als Ereignis den Tod durch Nierenversagen definiert. Todesursachen, die vom Tod durch Nierenversagen abweichen, gelten als zensierte Daten und gehen in die Statistik mit ein. Die Untergruppen A und B der Therapie- und Kontroll-Gruppen wurden für die Kaplan-Meier-Kurve zusammengelegt (siehe Tabelle 8). Demnach befinden sich in der Therapie-Gruppe 13 Mäuse und in der Kontroll-Gruppe 26 Mäuse.

Maus (mit Überlebenszeit in Tagen)	Nierenversagen (Ja=1/Nein= <b>0</b> )	Andere Todesursache (Ja=1/Nein=0) <b>zensierte Daten</b>
	Therapie-Gruppe A	
43	0	1
79	1	0
68	1	0
93	1	0
79	1	0
77	1	0
82	1	0
83	1	0
68	1	0
	Kontroll-Gruppe A	
76	1	0
66	1	0
69	1	0
79	1	0
65	1	0
65	1	0
66	1	0
70	1	0
70	1	0
68	1	0
63	1	0
63	1	0
57	1	0
63	1	0
63	1	0
62	1	0
66	1	0
72	1	0
67	1	0
68	1	0
67	1	0
	Therapie-Gruppe B	
67	1	0
67	0	1
67	0	1
67	0	1
	Kontroll-Gruppe B	
70	0	1
70	0	1
60	1	0
67	0	1

Tabelle 7: Darstellung der Todesursachen. Tod durch Nierenversagen =1, Tod anderer Ursache =0 und =zensiert; zensierte Daten sind fett gedruckt.

Course	Commente	Anarki dan Engination	Zensiert		
Gruppe	Gesamtzani	Anzani der Ereignisse	Ν	Prozent	
Therapie	13	9	4	30,8%	
Kontrolle	26	23	3	11,5%	
Gesamt	39	32	7	17,9%	

Tabelle 8: Zusammenfassung der Fallverarbeitung

In Abbildung 8 wird die Kaplan-Meier-Kurve dargestellt. Auf der X-Achse sind die Überlebenszeiten in Tagen, auf der Y-Achse das kumulative Überleben eingetragen. Bei Ermittlung des Log-Rang-Tests ergibt sich ein p-Wert unter 0,01 und ein somit signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen (siehe Tabelle 9). Sowohl Median (77,7 Tage) als auch Mittelwert (79 Tage) der Therapie-Gruppe weisen ein längeres Überleben im Vergleich zur Kontroll-Gruppe auf (siehe Tabelle 10). Es lässt sich demzufolge ein Überlebensvorteil für die mit Aliskiren behandelten Mäuse festhalten.



Abb. 8: Kaplan-Meier-Kurve zum Vergleich der Überlebenszeiten in Tagen zwischen Therapie-Gruppe und Kontroll-Gruppe.

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	11,387	1	,001

Tabelle 9: Log-Rank-Test vergleicht die Überlebensverteilungen für beide Gruppen

Gruppe	Mittelwert <sup>a</sup>					Median		
			95%-Konfidenzintervall				95%-Konfiden	zintervall
	Schätze r	Standardf ehler	Untere Grenze	Obere Grenze	Schätze r	Standardf ehler	Untere Grenze	Obere Grenze
Therapie	77,656	2,802	72,165	83,147	79,000	1,394	76,268	81,732
Kontrolle	67,526	1,088	65,394	69,657	66,000	,850	64,334	67,666
Gesamt	70,801	1,403	68,052	73,551	68,000	1,048	65,946	70,054

Tabelle 10: Angabe der Mittelwerte und Mediane für die Überlebenszeit von beiden Gruppen

# 3.1.2 Vergleich der Überlebenszeit der Gruppen A

Die COL4A3-Knockout-Mäuse aus den Gruppen A sind im Gegensatz zu den Mäusen der Gruppen B ausschließlich zur Bestimmung der Überlebenszeit vorgesehen. Aus diesem Grund wurden die Überlebensdaten dieser Gruppen ohne zensierte Daten in einer weiteren Grafik miteinander verglichen (Abbildung 9). Die Therapie-Gruppe umfasst acht und die Kontroll-Gruppe 22 Mäuse.



Abb. 9: Separater Vergleich der Überlebenszeiten in Tagen von den Gruppen A ohne zensierte Daten

Auf der X-Achse sind die Gruppen und auf der Y-Achse die Überlebenszeit in Tagen aufgetragen. Wie auch bei der Kaplan-Maier Kurve liegt ein Überlebensvorteil für die Therapie-Gruppe mit einer medianen Überlebenszeit von 78,6 Tagen vor. Die mediane Überlebenszeit der Kontroll-Gruppe liegt dagegen bei 66,6 Tagen (Tabelle 11). Ebenso zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen mit einem p-Wert von unter 0,01 (Tabelle 11). Demnach kann weiterhin eine positive Auswirkung von Aliskiren auf die Überlebenszeit festgehalten werden.

	Median 1 Therapie	Median 2 Kontrolle	df	t-value	p-Wert
T-Test	78,62500	66,63636	28	4,926015	0,000034

Tabelle 11: Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen

Die Analyse der histologischen Präparate konnte keinen signifikanten Vorteil belegen. Tendenziell zeigt sich aber auch hier ein Therapievorteil für Aliskiren.

# 3.2 Analyse der histologischen Präparate

# 3.2.1 Bildliche Darstellung der histologischen Präparate

Neben den Überlebensdaten soll auch anhand des Nierengewebes die Wirkung des Reninantagonisten Aliskiren überprüft werden. Für die Darstellung des Nierengewebes und dessen Beurteilung wurden von neun Mäusen histologische Präparate angefertigt. Neben homozygoten COL4A3-Knockout-Mäusen dienten auch in der Zucht geborene Wildtyp-Mäuse der Untersuchung (siehe Kontroll-Gruppe B im Kapitel 2). Dabei nahm man Präparate von sechs Mäusen aus der Kontroll-Gruppe B und drei Mäusen aus der Therapie-Gruppe B. Schließlich erhielt man 3 Gruppen (siehe Tabelle 12). In der weiteren Aufarbeitung verwendete man neben einer HE-Färbung auch Antikörper zur immunhistochemischen Darstellung. Die jeweiligen Präparatabbildungen sind in den Abbildungen 10 und 11 zusammengestellt.

Kontroll-	Therapie-Gruppe B	
Wildtyp-Kontrolle (+/+)	Aliskiren-behandelt (-/-)	
3 3		3

Tabelle 12: Darstellung der untersuchten Gruppen. (+/+) steht für Wildtyp, (-/-) steht für homozygot.

Die Auswahl der Präparatabbildungen erfolgte selektiv. In den Abbildungen 3 und 4 ist jeweils eine Übersichtaufnahme mit der zugehörigen Nahaufnahme zu sehen. Die Präparate liegen von oben nach unten in folgender Reihenfolge vor: Wildtyp-Kontrolle, unbehandelte Kontrolle, mit Aliskiren behandelt.





Abb. 10: Präparatabbildung 1= Wildtyp-Kontrolle; 2=Unbehandelte Kontrolle; 3= mit Aliskiren behandelt. Der Buchstabe a markiert die zugehörige Nahaufnahme.



Immunhistochemische Aufarbeitung:

Abb. 11: Präparatabbildung 1= Wildtyp-Kontrolle; 2=Unbehandelte Kontrolle; 3= mit Aliskiren behandelt. Der Buchstabe a markiert die zugehörige Nahaufnahme.

# 3.2.2 Score der histologischen Präparate

Um einen Vergleich zwischen den einzelnen histologischen Präparaten ziehen zu können, beurteilte man die immunhistochemischen Präparate mit einem Score von 1-3. Der Score wurde für den Zustand des Tubulointerstitiums (tubulointerstitielle Fibrose) jeweils in 10er Vergrößerung als auch der Glomerula (Glomerulosklerose) in 10er sowie 40er Vergrößerung vergeben. Hierbei steht die 1 für gesundes und die 3 für krankes Nierengewebe. Man erhielt demnach für jede Maus drei Score-Beurteilungen. Diese wurden von drei verschiedenen Readern (deutsch "Beurteiler") blind und getrennt voneinander vorgenommen. In Tabelle 13 und 14 sind die Ergebnisse von den Readern 1 und 2 zusammengefasst. Die Tabelle 13 zeigt Mittelwertangaben und in Tabelle 14 sind die medianen Ergebnisdaten zu finden.

Wildtyp-Kontrolle (+/+)		Unbehandelte Kontrolle (-/-)		Aliskiren-be	ehandelt (-/-)
Reader 1	Reader 2	Reader 1	Reader 2	Reader 1	Reader 2
		Glomerulos	klerose x 40		
1,25	1,4	2,67	2,75	2,8	1,67
1	1,5	2,3	2,25	2,4	2,2
1	1	2,29	2,63	3	2,25
Zusammen:	Zusammen:	Zusammen:	Zusammen:	Zusammen:	Zusammen:
1,08	1,3	2,42	2,54	2,73	2,04
Glomerulosklerose x 10					
1,48	1,67	2,72	2,76	2,88	2,69
1,23	1,68	2,73	2,72	2,55	2,11
1,29	1,56	3	2,8	3	2,74
Zusammen:	Zusammen:	Zusammen:	Zusammen:	Zusammen:	Zusammen:
1,33	1,63	2,82	2,76	2,81	2,51
	-	Tubulointerstitie	elle Fibrose x 10		
1	1	2,81	2,88	2,6	2,63
1,1	1,25	2,76	2,75	2,47	2,71
1,24	1	3	2,63	3	3
Zusammen:	Zusammen:	Zusammen:	Zusammen:	Zusammen:	Zusammen:
1,11	1,08	2,86	2,75	2,69	2,78

Tabelle 13: Darstellung der Scorevergabe. Angaben liegen als Mittelwerte vor.

Wildtyp-Kontrolle (+/+)         Unbehandelte		Kontrolle (-/-)	Aliskiren-be	handelt (-/-)		
Reader 1	Reader 2	Reader 1	Reader 2	Reader 1	Reader 2	
		Glomerulos	klerose x 40			
1	1	3	3	3	2	
1	1,5	2	2,5	2	2	
1	1	2	3	3	2,5	
	Glomerulosklerose x 10					
1	2	3	3	3	3	
1	2	3	3	3	2	
1	2	3	3	3	3	
	Tubulointerstitielle Fibrose x 10					
1	1	3	3	3	3	
1	1	2,5	3	3	3	
1	1	3	3	3	3	

Tabelle 14: Darstellung der Scorevergabe. Werte liegen als Mediane vor.

Zur Untersuchung der Übereinstimmung von Reader 1 und 2 wurden die Ergebnisse sowohl mit Cohen's-Kappa als auch mit dem Bland-Altman-Plot analysiert. Die Cohen's-Kappa-Werte sind in der Tabelle 15 dargestellt. Hierbei wurden die Medianwerte des Scores verwendet. Definitionsgemäß liegt bei einem ungewichteten Kappa-Wert von über 0,80 eine starke Übereinstimmung beider Reader vor. Mit Ausnahme des Ergebnisses der Glomerulosklerose x 10, hier wurde annährend ein Wert von 0,80 erreicht, zeigen die Werte aus Tabelle 15 eine geringe Übereinstimmung.

Glomerulosklerose x 40	Glomerulosklerose x 10	Tubulointerstitielle Fibrose	
0,57	0,79	0,29	

Tabelle 15: Cohen's Kappa, Untersuchung der Übereinstimmung von Reader 1 und 2

Für den Bland-Altman-Plot (siehe Abbildungen 12-14) hat man die Scorebeurteilungen in Mittelwertangabe verwendet. Hier wird deutlich, dass trotz der geringen Cohen's-Kappa-Werte beide Reader mit zwei Ausnahmen nicht über einen Wert von 0,5 voneinander abweichen. Dennoch erfolgte die Analyse der Score-Daten für jeden Reader einzeln. Es lässt sich erkennen, dass beide Reader die Gruppe Wildtyp-Kontrolle zum größten Teil mit einem niedrigen Score von 1 beurteilen und diese sich damit deutlich von den beiden anderen Gruppen unterscheidet. Dagegen sind die Unterschiede zwischen den Gruppen "Unbehandelte Kontrolle" und "mit Aliskiren behandelt" weniger deutlich. Bei genauerer Betrachtung der Mittelwerte beider Gruppen beurteilt Reader 1 die Glomerulosklerose in der 40er Vergrößerung mit einem höheren Score für die mit Aliskiren behandelte Gruppe. In der 10er Vergrößerung kann man kaum von einem Unterschied sprechen und in der Beurteilung des Tubulointerstitiums erhält die Gruppe mit Aliskiren sogar einen niedrigeren Score im Vergleich zur "Unbehandelten Kontrolle". Die Scoreangaben von Reader 1 zeigen demnach weder einen Vorteil noch einen Nachteil der Aliskiren-Behandlung. Reader 2 tendiert eher zu einem Vorteil für die Gruppe mit Aliskiren. Sowohl in der 40er als auch in der 10er Vergrößerung der Glomerula vergibt er einen niedrigeren Score für die Nierenpräparate von mit Aliskiren behandelten Mäusen. Lediglich bei der Beurteilung des Tubulointerstitiums vergibt er hier einen gering höheren Score.



Abb. 12: Bland-Altman-Plot; Abweichung der Reader 1und 2 voneinander.



Abb. 13: Bland-Altman-Plot; Abweichung der Reader 1 und 2 voneinander.



Abb. 14: Bland-Altman-Plot; Abweichung der Reader 1 und 2 voneinander

Zur Veranschaulichung der Ergebnisse liegen diese in Abbildung 15-17 zusätzlich als Histogramme vor. Dabei wurden die Mittelwertangaben verwendet. In diesen Graphiken sind die Readerergebnisse für jede Gruppe paarweise angeordnet. Auf einen statistischen Test zur Signifikanzüberprüfung wurde aufgrund der geringen Fallzahl verzichtet.



Abb. 15: Score der Glomerula-Beurteilung in 40er Vergrößerung von Reader 1 und 2



Abb. 16: Score der Glomerula-Beurteilung in 10er Vergrößerung von Reader 1 und 2



- 56 -

# 3.2.3 Zusammenfassung von allen 3 Readern

Aufgrund einer abweichenden Scorevergabe-Technik von Reader 3 im Vergleich zu Reader 1 und 2 wurde dieser vorerst nicht in die Ergebnisdarstellung einbezogen. In diesem Abschnitt sollen nun auch die Ergebnisse von Reader 3 dargestellt werden. Sie sind als Mittelwerte in Tabelle 16 aufgeführt. Für den Vergleich von allen drei Readern wurden auch hier Bland-Altman-Plots erstellt (siehe Anhang, 9.5 Vergleich aller drei Reader). Dabei zeigte sich ohne Ausnahme eine Abweichung zwischen allen Readern noch unter einem Wert von 0,5.

Wildtyp-Kontrolle (+/+)	Unbehandelte Kontrolle (-/-)	Aliskiren-behandelt (-/-)
	Glomerulosklerose x 10	
1,29	2,84	2,42
	Tubulointerstitielle Fibrose x 10	
1,04	2,79	2,5

Tabelle 16: Scorevergabe von Reader 3 in Mittelwert-Angabe

In den folgenden Histogrammen von Abbildung 18 und 19 sind die Ergebnisse (in Mittelwerten) einer Gruppe jeweils von allen drei Readern nebeneinander dargestellt. Wegen der geringen Fallzahl wurde auch diesmal auf die Signifikanzüberprüfung verzichtet.



Abb. 18: Score der Glomerula-Beurteilung in 10er Vergrößerung von allen Readern



Abb. 19: Score der Beurteilung des Tubulointerstitiums von allen Readern

Die Ergebnisse von Reader 3 sind im Vergleich zu den anderen Readerergebnissen deutlicher. Sie zeigen einen Vorteil für die mit Aliskiren behandelte Gruppe, welche Reader 3 mit einem niedrigeren Score als die "Unbehandelte Kontrolle" bewertet. Wie auch schon bei Reader 1 und 2 unterscheidet sich die Wildtyp-Kontrolle mit einem stark niedrigeren Score von den anderen beiden Gruppen. Es lässt sich festhalten, dass die Scorevergabe sowohl von Reader 2 als auch von Reader 3 tendenziell einen Vorteil für die Aliskiren-Therapie ergeben.

Bei der Beurteilung der Proteinurie lässt sich ein Vorteil für Aliskiren im Alter von siebeneinhalb Wochen erkennen, welcher mit neuneinhalb Wochen in das Gegenteil umschlägt. Des Weiteren konnte Aliskiren eine Reduzierung der Makroglobinurie bewirken.

# 3.3 Analyse der SDS-Page-Uringele

Die Auswirkungen des Reninantagonisten Aliskiren sollen nun auch im Zusammenhang mit der Proteinurie dargestellt werden. Zur Bestimmung der Proteinurie wurde Urin im Alter von sechs, siebeneinhalb und neuneinhalb Wochen bei jeweils drei Mäusen aus den Gruppen "Wildtyp-Kontrolle" und "Unbehandelte Kontrolle" abgenommen. In der mit Aliskiren behandelten Gruppe wurde die Urinabnahme mit siebeneinhalb Wochen bei fünf und mit neuneinhalb Wochen bei nur noch drei Tieren durchgeführt, nachdem zwei Tiere in der Zwischenzeit gestorben sind (siehe Tabelle 17). Von den Urinproben wurden zwei SDS-PageGele angefertigt, die in den Abbildungen 20 und 21 zu sehen sind. Zur Orientierung sind die Banden mit Zahlen von 1-13 bzw. 1-9 markiert. Für die mitgelaufene Kontrolle sind die zugehörigen Proteine sowie Gewichtsangaben links neben dem Gel aufgeführt.

Kontroll-	Therapie-Gruppe B	
Wildtyp-Kontrolle (+/+)	Aliskiren-behandelt (-/-)	
3	3	5

Tabelle 17: Darstellung der Gruppen, bei denen Urin abgenommen wurde.



Abb. 20: SDS-Page-Uringel. Urin von Wildtypen und unbehandelten Mäusen. 1= Kontrolle, 2-4=Wildtyp-Kontrolle (Urinabnahme mit 6 Wochen), 5-7= Unbehandelte Kontrolle (Urinabnahme mit 6, 7½, 9½ Wochen), 8-10= Unbehandelte Kontrolle (Urinabnahme mit 6, 7½, 9½ Wochen), 11-13= Unbehandelte Kontrolle (Urinabnahme mit 6, 7½, 9½ Wochen).

# Phosphorylsase 97 kDa BSA 64 kDa Glutamin DHG 51 kDa Alkohol DHG 39 kDa Carboanhydrase 28 kDa Myoglobin Red 19 kDa

5

6

4

7 8

9

1

2 3

Abb. 21: SDS-Page-Uringel. Urin von Aliskiren-behandelten Mäusen. 1= Kontrolle, 2-6= Urinabnahme mit 7½ Wochen, 7-9= Urinabnahme mit 9½ Wochen.

Um eine quantitative Bewertung der Gele zu ermöglichen, führt man eine densitometrische Auswertung aller Messpunkte der Gel-Banden durch (dies wurde freundlicherweise von PD Dr. rer. nat. R. Girgert übernommen). In der Tabelle 18 sind die Ergebnisdaten aufgeführt. Es handelt sich hierbei um relative Werte. Auf Grund der Vergleichbarkeit wurden lediglich die Proteinuriewerte mit siebeneinhalb und neuneinhalb Wochen für die Analyse verwendet. Die restlichen Daten sind im Anhang (9.6 Urinauswetung) aufgeführt. Zur visuellen Darstellung liegt das Balkendiagramm in Abbildung 22 vor.

Zeitpunkt der Urinabnahme	Therapie-Gruppe B	Kontroll-Gruppe B
7,5 Wochen	525	279
	578	766
	138	248
	385	
	358	
Mittelwert	397	431
9,5 Wochen	940	16,1
	228	430
	0	600
Mittelwert	389,3	348,7

Tabelle 18: Vergleich der Proteinurie mit 7,5 Wochen und 9,5 Wochen zwischen Therapie-Gruppe B und Kontroll-Gruppe B



Abb. 22: Darstellung der Proteinurie im Alter von 7,5 und 9,5 Wochen von den Gruppen "Unbehandelte Kontrolle" und "Aliskiren-behandelt"

Wie in Abschnitt 3.2 ist die Fallzahl für einen statistischen Test zu gering. Entsprechend wurde auch hier auf die Überprüfung nach Signifikanz verzichtet. Beim Vergleich der Proteinurie mit 7,5 Wochen liegt ein Therapievorteil zu Gunsten der Therapie-Gruppe um ca. 8% vor. In der 9,5. Woche schneidet die Therapie-Gruppe jedoch um ca. 12% schlechter ab als die Kontroll-Gruppe. In beiden Gruppen kommt es im Alter von neuneinhalb Wochen zu einem Abfall der Proteinurie.

Des Weiteren lassen sich die Uringele nach der Art des Nierenschadens unterscheiden. Bei einem glomerulären Schaden, wie er beim AS zu erwarten ist, liegt in der Regel eine vermehrte Ausscheidung von Makroglobulinen vor. Das Gel mit dem Urin der unbehandelten Kontrollen (Abbildung 20) zeigt einen solchen glomerulären Schaden bei allen Tieren dieser Gruppe und in jedem Lebensalter. Das Uringel der mit Aliskiren behandelten Mäuse (Abbildung 21) lässt dagegen kein typisches Bandenmuster für einen glomerulären Schaden erkennen. Hier wurden insgesamt weniger Makroglobuline ausgeschieden. Zusätzlich fällt bei allen Mäusen der Therapie-Gruppe eine vermehrte Ausscheidung von Mikroglobulinen auf, was auf einen tubulären Schaden hindeutet. Nach den Gelen zu urteilen, scheint Aliskiren der Entwicklung eines glomerulären Schadens entgegenzuwirken, aber einen tubulären Schaden zu verursachen.

Bei der Bestimmung des Serumspiegels in behandelten Mäusen konnte Aliskiren in ausreichender Menge nachgewiesen werden.

# 3.4 Aliskiren-Serumspiegel

Um sicherzustellen, dass Aliskiren tatsächlich über die osmolaren Pumpen in den Kreislauf der Versuchstiere eingeschwemmt wurde, führte man eine Bestimmung des Serumspiegels von Aliskiren durch. Dafür wurde das Blut der drei Mäuse aus der Therapie-Gruppe B untersucht. In jeder Maus konnte ein adäquater Spiegel von Aliskiren festgestellt werden (siehe Anhang, 9.7 Aliskiren-Serumspiegel). Vergleichsweise wurde das Blut von zwei Placebo-Kontrollen ohne Therapie untersucht. In beiden Kontrollen konnte kein Aliskirenspiegel nachgewiesen werden.

# **4** Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Wirkung des Renin-Inhibitors Aliskiren bei COL4A3-Knockout-Mäusen untersucht. Es soll geklärt werden, ob Aliskiren sowohl die beim Alport-Syndrom (AS) entstehende Nierenfibrose als auch das daraus resultierende Nierenversagen protektiv beeinflussen kann. Man erwartet, dass durch Einsatz dieses Medikaments das Überleben verlängert und die Proteinurie sowie pathologische Veränderungen im Nierengewebe verringert werden. Tatsächlich konnte in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ein Vorteil für die Behandlung mit dem Renin-Inhibitor Aliskiren beim Vergleich mit einer Kontroll-Gruppe verzeichnet werden. Insbesondere in der Betrachtung der Überlebenszeit ergab sich ein signifikant längeres Überleben in der Therapie-Gruppe.

# 4.1 Kritische Betrachtung der Studie an sich

# 4.1.1 Das Tiermodell COL4A3-Knockout-Maus

Es sind bereits einige Tiermodelle für das AS beschrieben worden. Besonders Hunde waren als natürlich vorkommende Tiermodelle interessant. Als Modell für das autosomal-dominante AS dienten Dalmatiner und Bull Terrier (Hood et al. 1995 und Hood et al. 2002). Ein geeignetes Tiermodell für das autosomal-rezessive AS stellten English Cocker Spaniel Dogs dar (Lees et al. 1998). Auch beim X-chromosomalen AS forschte man mit Hunden (Lees et al. 1999 und Zheng et al. 1994), hier ist vor allem das Samoyed dog Modell zu nennen (Heikkilä et al. 2000). Die Problematik des Hundemodells liegt in der relativ langen Lebensdauer, einer niedrigen Generationszahl sowie der geringen Anzahl an Nachkommen. Es kommt hinzu, dass das AS bei diesem Tiermodell erst durch das Auftreten von klinischen Symptomen diagnostiziert werden kann, da es sich um natürlich vorkommende und keine transgen generierten Modelle handelt.

Neben den Hunden sind auch Mausmodelle bekannt. Dabei handelt es sich in der Regel um Knockout-Modelle. Es gibt zwei Modelle für das autosomal-rezessive AS (Cosgrove et al. 1996; Miner und Sanes 1996). Beide haben Ähnlichkeiten in ihrem pathologischen Profil und kommen aus einem 129/SVJ Hintergrund (Cosgrove et al. 2007). Eines ist die COL4A3-

Knockout-Maus, welche kommerziell erworben werden kann und auch in der vorliegenden Arbeit als Tiermodell diente. Ebenso wurde ein Mausmodell für das X-chromosomale AS mit einem C57BL/6J Hintergrund beschrieben (Rheault et al. 2004). Tiere mit einem 129/SVJ Hintergrund haben den Vorteil, dass bei ihnen Läsionen der GBM (glomeruläre Basalmembran) häufiger auftreten und der Genotyp früher detektierbar ist, als es bei Tieren mit einem C57BL/6J Hintergrund der Fall ist (Zoja et al. 2004). Wie beim Menschen kommt es auch bei COL4A3-Knockout-Mäusen zu einem Verlust der  $\alpha$ 3(IV)-,  $\alpha$ 4(IV)- und  $\alpha$ 5(IV)-Ketten. Weiterhin sind ultrastrukturelle Veränderungen der GBM und die Klinik mit dem AS des Menschen vergleichbar (Cosgrove et al. 1996). Vorteile von Mausmodellen gegenüber Hundemodellen sind die kurze Lebenszeit mit entsprechend hoher Generationszahl, ein einheitlicher Phänotyp und die Möglichkeit, schon kurz nach der Geburt den Genotyp bestimmen zu können (Gross und Weber 2003). Die große Zahl an Nachkommen stellt einen weiteren Vorteil dar.

Als weitere Option sollte die Zellkultur bedacht werden. Auf Grund der Komplexität der Pathogenese des AS scheint diese aber keine gute Alternative für das Tiermodell in einer Medikamenten-Studie zu sein. Allein die GBM mit ihrem speziellen Grundgerüst fordert verschiedene Zellpopulationen. Es kommen die molekularen Interaktionen zwischen Podozyten, Endothel und der ECM (extrazelluläre Matrix) hinzu. Weiterhin lässt sich die Entwicklung von Glomerulosklerose sowie tubulointerstitieller Fibrose in einer Zellkultur kaum untersuchen. Ein weiterer Faktor ist die Klinik, welche sich nur in einem Lebewesen vergleichbar zum Menschen darstellt.

Das Mausmodell scheint sich am besten für die Untersuchung des AS zu eignen. Schon in früheren Therapiestudien konnten COL4A3-Knockout-Mäuse erfolgreich etabliert werden. So findet man dieses Tiermodell in Studien mit ACE-Hemmern als auch mit  $AT_1$ -Antagonisten (Gross et al. 2003 und Gross et al. 2004 b).

#### 4.1.2 Der Stichprobenumfang

In dieser Studie wurde bewusst mit einem geringen Stichprobenumfang (je Guppe: n=8) geplant. Zum einen schützt dies davor, unnötig viele Mäuse dem Stress einer tierexperimentellen Studie auszusetzen. Zum anderen liegen bereits Studien mit COL4A3-Knockout-Mäusen vor, in denen ein Stichprobenumfang von n= 8 eine statistische Signifikanz erreichte (Koepke et al. 2007; Gross et al. 2003; Gross et al. 2004 b). Noch in der

experimentellen Phase dieser Studie entschied man sich, die Überlebenszeit allein als harten Endpunkt festzulegen. Man traf diese Entscheidung, da die Ergebnisse einer Voranalyse bereits einen signifikanten Vorteil für den Reninantagonisten Aliskiren in der Überlebenszeit zeigten. Unter diesen Umständen akzeptierte man einen kleineren Stichprobenumfang als n=8 in weiteren Untersuchungspunkten wie Histologie und Proteinurie.

#### 4.1.3 Negative Kontrolle statt Placebo

Anders als bei der Therapie-Gruppe wurde den meisten Tieren der Kontroll-Gruppe keine osmotische Pumpe implantiert. Daher handelt es sich bei der Kontroll-Gruppe vielmehr um eine negative Kontrolle als um eine Placebo-Kontrolle. Dies stellt eine gewisse Ungleichheit zwischen beiden Gruppen dar. Auf Grund der Tatsache, dass das vorliegende Mausmodell einen stark einheitlichen Phänotyp vorweist (Gross und Weber 2003), nimmt man an, dass die Auswirkungen der Pumpenimplantation wie der perioperative Tod oder die Entzündung der Operationswunde von dem eigentlichen Krankheitsbild des AS gut differenziert werden können. Dennoch kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass die Mäuse durch die Operation in einen physisch schlechteren Zustand versetzt wurden als die Tiere der Kontroll-Gruppe.

# 4.1.4 Selektion der Mäuse

Eine mögliche Selektion in physiologisch schwächere oder stabilere Mäuse wurde durch die Genotypisierung umgangen. So wählte man die Mäuse über eine Liste rein nach Genotyp aus, ohne den zugehörigen Phänotyp zu kennen. Man sieht daher eine randomisierte Verteilung der Tiere in die Unter-Gruppen als gegeben an. Es kommt hinzu, dass die Tiere zum Zeitpunkt der Genotypisierung noch keine Krankheitssymptome entwickelt hatten, und dadurch nicht zwischen einem kranken oder gesunden Tier unterschieden werden konnte.

# 4.1.5 Verzicht auf eine Blutdruckmessung

Während des experimentellen Abschnitts wurde auf die Messung des Blutdrucks verzichtet. Einerseits stellte sich die Grösse der implantierten Pumpe als unkompatibel mit dem Blutdruckmessapparat heraus (Blutdruckmesssystem LE5001 von Panlab, Barcelona, Spanien). Andererseits nimmt man an, dass die gängige Methode der Blutdruckmessung zu einer stressbedingten Hypertonie der Mäuse führt. Diese falsch hohen Werte dürften auch mit einer Akklimatisierung an die Blutdruckmessung kaum auszuschalten sein. Da es sich bei den COL4A3-Knockout-Mäusen um ein nicht hypertensives Tiermodell handelt (Gross et al. 2003), ging man während der Versuchsplanung davon aus, dass die Blutdruckmessung von geringerer Bedeutung ist. Im Verlauf der Studie kam allerdings die Vermutung auf, dass Aliskiren durch seine blutdrucksenkende Eigenschaft zu einer Minderperfusion der Niere geführt hat (s.u.). Eine Blutdruckmessung zur Detektion einer Hypotonie wäre im Nachhinein durchaus von Interesse gewesen.

# 4.1.6 Verzicht auf die Bestimmung der Plasma-Renin-Aktivität

Mit der Bestimmung der PRA (Plasma-Renin-Aktivität) hätte man die Effektivität von Aliskiren in einem direkten Zusammenhang darstellen können. Schon ab einer Dosierung von 10 mg/kg/Tag kann eine effektive Reduzierung der PRA in Mäusen erreicht werden (Ino et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit hat man eine Dosierung von 25mg/kg/Tag gewählt. Nachdem zusätzlich die Aliskiren-Spiegelbestimmung positv ausgefallen ist (siehe Ergebnisteil), lässt sich vermuten, dass auch in dieser Studie eine adäquate Reduzierung der PRA erreicht wurde. Die Bestimmung der PRA scheint daher nicht unbedingt notwendig.

# 4.1.7 Punktescore - ein semiquantitatives Verfahren

Zur Auswertung der histologischen Präparate wurde ein Scoreverfahren mit einer Punktevergabe von 1-3 verwendet. Ein solches Analyseverfahren ist subjektiv und semiquantitativ, ebenso handelt es sich bei den Ergebnisdaten nicht um absolute Werte. Dennoch ist diese Auswertungsweise als sinnvoll anzusehen, da sie qualitative Schwankungen der histologischen Präparate recht zuverlässig ausgleicht. Als Beispiel ist hier die Färbungsintensität zu nennen, welche in ihrer Qualität von Präparat zu Präparat sehr unterschiedlich ausfallen kann (Brunotte 2010).

Dadurch, dass die histologischen Präparate von drei unabhängigen Readern beurteilt wurden, kann eine gewisse Varianz in den Ergebnisdaten nicht verhindert werden, zumal jeder Reader eine eigene Technik hat und seine individuelle Vorstellung vom jeweiligen Zustand des Nierengewebes einfließen lässt. Um die Unterschiedlichkeit zwischen allen Readern verifizieren zu können, wurden statistische Hilfen wie Cohen's Kappa und das Bland-Altman-Diagramm verwendet.

## 4.1.8 Gilt die Effektivität von Aliskiren auch beim Renin des Mausmodells?

Aliskiren ist hochspezifisch für humanes Renin mit einem  $IC_{50}$ -Wert (mittlere inhibitorische Konzentration) von 0,6nM (Lu et al. 2008). Die Spezifität für das Renin von Ratten ist geringer und liegt bei einem  $IC_{50}$ -Wert von 80nM (Lu et al. 2008). Aus diesem Grund hat man für Versuche mit Ratten ein doppelt-transgenes Rattenmodell (dTGR) entwickelt, welches die Gene für humanes Renin als auch für humanes Angiotensinogen vorweist (Buczko und Hermanowicz 2008). Der  $IC_{50}$ -Wert beim Maus-Renin liegt jedoch nur gering unter dem  $IC_{50}$ -Wert, den Aliskiren beim Humenen-Renin erreicht (Lu et al. 2008). Entsprechend rechnet man damit, dass Aliskiren im Mausmodell ähnlich effektiv wie beim Menschen wirkt (Lu et al. 2008).

# 4.2 Ergebnisdiskussion

# 4.2.1 Überleben

Ein signifikant längeres Überleben wurde sowohl in der Kaplan-Meier-Kurve (p<0,01) als auch im Box-Plot-Diagramm (p<0,01) für die Therapie-Gruppe festgehalten. Die mit Aliskiren therapierten COL4A3-Knockout-Mäuse lebten im Durchschnitt zehn Tage bzw. zwölf Tage länger als die Mäuse der Kontroll-Gruppe.

Aliskiren scheint sich demnach günstig auf die Entwicklung des terminalen Nierenversagens ausgewirkt zu haben. Bestärkt wird dies durch die Tatsache, dass die Therapie-Gruppe mit der Pumpenimplantation zusätzlich belastet wurde und dennoch ein längeres Überleben vorweist. Möglicherweise wäre der Unterschied zwischen beiden Gruppen noch stärker, wenn auch die Kontroll-Gruppe einem vergleichbar schwächenden Einfluss ausgesetzt gewesen wäre. Alternativ hätte man das Medikament oral verabreichen müssen, um vergleichbare Verhältnisse zu schaffen.

Ebenso besteht die Möglichkeit, dass sich die Mäuse der Therapie-Gruppe in einem physiologisch besseren Gesundheitszustand befanden und gegenüber einer Manipulation wie

der Pumpenimplantation resistenter waren. Tatsächlich war der postoperative Verlauf in den Therapie-Gruppen mit Ausnahme von einer Maus, welche perioperativ verstorben ist, komplikationslos. In diesem Zusammenhang sei noch einmal darauf hingewiesen, dass eine Gruppen-Zuordnung nur nach Genotyp erfolgt ist, ohne den Phänotyp der zugehörigen Maus zu kennen.

Neben der Pumpenimplantation stellt auch die Urinabnahmetechnik eine Manipulation dar, welche zu einer gewissen Ungleichheit zwischen den untersuchten Gruppen führt. Diese wurde lediglich in den Gruppen B (Organ-, Blut- und Urinabnahme) mit sechs, siebeneinhalb und neuneinhalb Wochen durchgeführt. Die Abnahme in der neuneinhalbten Woche erfolgte allerdings erst nach der Tötung. Zur Uringewinnung wurden die Mäuse nicht wie bei anderen Studien in Stoffwechselkäfige gesetzt (Gross et al. 2003; Gross et al. 2004 b; Koepke et al. 2007). Ein Griff in den Nacken der Mäuse führte zu einem Schreckensmoment, welcher zum Wasserlassen des Tieres führte. Interessanterweise starben sowohl in der Therapie-Gruppe B als auch in der Kontroll-Gruppe B insgesamt drei Mäuse noch vor der Organentnahme. Postoperative Komplikationen bezüglich der Pumpenimplantation wurden bei diesen Mäusen nicht beschrieben. Bei der perioperativ verstorbenen Maus der Gruppen A ist dagegen die Operation als Todesursache nahe liegend. Man sollte daher die Möglichkeit in Betracht ziehen, dass sich die Urinabnahme negativ auf den Krankheitsverlauf und das Überleben der Gruppen B ausgewirkt hat. Um den möglichen Einfluss der Urinabnahme auszuschließen, hat man in der folgenden Diskussion der Überlebenszeitergebnisse lediglich die Gruppe A (ausschließliche Bestimmung der Überlebenszeit ohne Organentnahme) betrachtet.

Es liegen zwei tierexperimentelle Medikamenten-Studien von Gross et al. vor, welche mit der vorliegenden Arbeit vergleichbar sind. Beide greifen am RAAS an und haben ebenso die COL4A3-Knockout-Maus als Tiermodell gewählt. Eine Studie vergleicht die Wirkungen von ACE-Hemmern und AT<sub>1</sub>-Antagonisten (Gross et al. 2004 b), die andere untersucht Unterschiede zwischen einem frühen (vier Wochen) und späten Therapiebeginn (sieben Wochen) mit Ramipril sowie Unterschiede in der Therapiedauer (Gross et al. 2003). Es fällt auf, dass diese Studien in einigen Punkten von der vorliegenden Arbeit abweichen. So stellt man fest, dass die unbehandelten COL4A3-Knockout-Mäuse mit 71± 5,7 Tagen im Schnitt längere Überlebenszeiten aufweisen. Die unbehandelten COL4A3-Knockout-Mäuse der vorliegenden Arbeit lebten dagegen nur ca. 67 Tage. Des Weiteren wurden die Arzneimittel (ACE-Hemmer bzw. AT<sub>1</sub>-Antagonisten) über das Trinkwasser verabreicht und nicht über eine

subkutane osmotische Pumpe. Außerdem kommt hinzu, dass in keiner der verglichenen Studien ein Therapiebeginn mit sechs Wochen gewählt wurde und sich auch Unterschiede in der Therapiedauer zu dieser Arbeit ergeben.

Der Grund für die abweichenden Überlebenszeiten trotz gleichem Tiermodell ist nicht ganz klar. Interessanterweise sind auch die Studien von Gross et al. von der Studie, in der erstmals das COL4A3-Knockout-Mausmodell beschrieben wurde (Cosgrove et al. 1996), bezüglich der Überlebenszeit abgewichen. Eine mögliche Begründung wären Unterschiede in der Tierstall eigenen Haltung. Diese Begründung lässt sich durch eine weitere Studie unterstützen, deren unbehandelten COL4A3-Knockout-Mäuse im selben Tierstall wie bei dieser Arbeit gehalten wurden und ähnliche Überlebenszeiten (65,9± 6,1) (Brandhorst et al. aufwiesen. Betrachtet man die therapierten COL4A3-Knockout-Mäuse der 2010) Vergleichsstudien, so sind auch bei dieser Gruppe die Überlebenszeiten länger als in der vorliegenden Arbeit. Dies kann zum einen mit der fehlenden Pumpenimplantation zusammenhängen, zum anderen könnten der abweichende Therapiebeginn sowie die abweichende Therapiedauer eine Rolle spielen. In der zweitgenannten Studie, welche sich mit dem Therapiebeginn von Ramipril beschäftigt (Gross et al. 2003), konnte gezeigt werden, dass Ramipril bei einer frühen Gabe ab vier Wochen zu einem signifikant längeren Überleben führt. Des Weiteren kommt es je nach Therapiedauer zu einer zusätzlichen Verlängerung der Überlebenszeit. So erreichte man bei einer Therapie von der vierten bis zur zehnten Woche ein Überleben von  $104 \pm 13$  Tagen. Eine Therapieverlängerung bis zum Lebensende bewirkte eine Lebensverlängerung auf 150 ± 21 Tage. Signifikante Ergebnisse bei einem Therapiebeginn ab sieben Wochen konnten in dieser Studie jedoch nicht erreicht werden. Im Gegensatz dazu ist der Überlebensvorteil von Aliskiren bei einem vergleichbar späten Therapiebeginn mit sechs Wochen signifikant. Hätte man auch bei Aliskiren einen Therapiebeginn mit vier Wochen gewählt, so wären die Überlebenszeiten möglicherweise noch besser ausgefallen. Der Benefit der frühzeitigen Therapie mit vier Wochen konnte auch beim AT<sub>1</sub>-Antagonisten beobachtet werden (Gross et al. 2004 b). In der vorliegenden Arbeit wurde Aliskiren nur bis zur zehnten Lebenswoche verabreicht. Es ist nicht auszuschließen, dass man durch eine Therapiegabe bis zum Lebensende eine zusätzliche Verlängerung der Überlebenszeit erreicht hätte. Eine Optimierung der bisherigen Aliskiren-Therapie erscheint demnach sinnvoll. In späteren Studien sollte man sowohl einen früheren Beginn als auch eine Verlängerung der Therapie mit dem Renin-Inhibitor in Erwägung ziehen.

# 4.2.2 Histologie

Im Rahmen der histologischen Ergebnisse konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Therapie- und Kontroll-Gruppe erhoben werden. Tendenziell zeigte sich ein Vorteil für die Therapie mit Aliskiren. So wurden die immunhistochemischen Präparate der Therapie-Gruppe insgesamt seltener mit 3 Punkten (3 Punkte= krankes Nierengewebe) beurteilt als die der Kontroll-Gruppe. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen der Überlebenszeit unterstützt dies die These, dass sich Aliskiren positiv auf das AS auswirkt. Die Aussagekraft der histologischen Ergebnisse sollte trotz allem kritisch hinterfragt werden. Sowohl ein Nicht-Übereinstimmen in der Score-Methode von Reader 3 mit den anderen beiden Readern als auch die Cohen's-Cappa-Werte zwischen Reader 1 und 2, welche kaum die 80 % erreicht haben, und zusätzlich die geringe Fallzahl zeigen Schwächen in der Analyse dieses Abschnitts auf. Dennoch bestätigen die Bland-Altman-Diagramme, dass eine gewisse Vergleichbarkeit zwischen allen drei Readern vorliegt. Die histologische Analyse soll demnach lediglich der Untermauerung der Studienthese dienen und nicht allein als aussagekräftiges Ergebnis in den Vordergrund gestellt werden.

Verglichen mit dem signifikanten Unterschied in der Überlebszeit im Abschnitt 4.2.1, wäre auch in der Histologie ein deutlicherer Unterschied zu erwarten gewesen. Dies soll in den folgenden Abschnitten genauer untersucht werden.

Ein Erklärungansatz könnte in der Überlebenszeitabweichung dieser Arbeit von den oben genannten Vergleichsstudien (Gross et al. 2003 und Gross et al. 2004 b) zu finden sein. Es liegt nahe, dass von Tierstall zu Tierstall nicht nur die Lebenszeit divergiert, sondern dies auch zu Abweichungen im zeitlichen Ablauf des AS führt. So entwickelten die Mäuse das terminale Nierenversagen vermutlich früher als in den vorigen Studien. Entsprechend dieser These hätte man die Tötung zeitlich vorverlegen müssen, um die protektiven Auswirkungen der Aliskiren-Therapie auf das Nierengewebe deutlicher sehen zu können. Nun wurde die Organentnahme aber schon mit neuneinhalb Wochen durchgeführt. In den Vergleichsstudien (Gross et al. 2003, Gross et al. 2004 b) erfolgte die Tötung mit zehn Wochen. Betrachtet man jedoch die zusätzlichen lebensverkürzenden Faktoren, denen die Mäuse der Gruppe B ausgesetzt waren, erscheint eine Vorverlegung von einer halben Woche nicht effizient genug. Als lebensverkürzende Faktoren sind insbesondere die Pumpenimplantation, aber auch die Urinabnahme zu nennen, welche in den Vergleichstudien nicht vorlagen.

Es sollte überlegt werden, ob die alleinige Beurteilung des Gewebes mittels immunhistochemischer Präparate einen Rückschluss auf die Nierenfunktion rechtfertigt. Diese Präparate zeigen per Antikörper-Markierung wie Laminin, eine Grundsubstanz der Basalmembran, in der Niere vorliegt. Entsprechend liefern sie vor allem Informationen über strukturelle Veränderungen der extrazellulären Matrix in einer verhältnismäßig geringen Vergrößerung. Eine Aussage zur Organfunktion ist dabei reine Interpretation auf der Wissensgrundlage früherer Studien. Mehr Informationen bezüglich der Organfunktion ermöglicht ein Blick auf die Ebene der GBM, so machen starke Veränderungen der GBM eine intakte Filterfunktion der Nieren unwahrscheinlich. Die genaue Betrachtung der GBM kann aber mit der Immunhistochemie kaum durchgeführt werden. Sinnvoll wäre daher eine elektronenmikroskopische (EM) Darstellung. Mittels EM werden Veränderungen der GBM sicher erkannt und so ein differenzierterer Blick auf das Nierengewebe ermöglicht (Flinter 1997, Heidet und Gubler 2009). Es ist daher nicht auszuschließen, dass die immunhistochemischen Präparate ein pathologisch verändertes Nierengewebe zeigen, während die Nierenfunktion kaum eingeschränkt ist. Diese Diskrepanz würde erklären, dass kein Widerspruch vorliegt, wenn die Überlebenszeitergebnisse einen Vorteil für Aliskiren zeigen, die Nierengewebe aber vermehrt pathologische Veränderungen aufweisen.

Die Möglichkeit einer Minderperfusion der Niere aufgrund der blutdrucksenkenden Eigenschaft von Aliskiren sollte ebenso in die Diskussion mit einbezogen werden. So könnte bei der Therapie-Gruppe ein Teil der pathologischen Veränderungen des Nierengewebes auf eine Minderperfusion zurückgehen und erklären, weshalb die histologischen Ergebnisse in dieser Gruppe so schlecht ausgefallen sind. Der Renin-Inhibitor erzielte in der Blutdrucksenkung vergleichbar gute Ergebnisse wie ACE-Hemmer (Strasser et al. 2007 und Andersen et al. 2008) und AT<sub>1</sub>-Antagonisten (Stanton et al. 2003 und Oparil et al. 2007). In tierexperimentellen Studien wurde in der Regel eine Standarddosis Aliskiren von 25mg/kg/Tag verabreicht. Diese Dosiereung konnte bei hypertensiven Mausmodellen eine signifikante Blutdrucksenkung erreichen (Dong et al. 2010 und Pöss et al. 2010). Auch in der vorliegenden Arbeit verwendete man diese Dosierung. Bei der sechs Wochen alten COL4A3-Knockout-Maus handelt es sich jedoch um ein normotensives Mausmodell. Die chronisch progressive Nierenerkrankung AS entwickelt sich, ohne dass eine Hypertonie oder eine entzündliche Genese eine Rolle spielen (Gross et al. 2003). Ino et al. (2009) konnten zeigen, dass auch bei einem normotensiven Mausmodell mit einer Dosierung von 25mg/kg/Tag Aliskiren eine signifikante Blutdrucksenkung wie beim hypertensiven Mausmodell erreicht wird. Eine Blutdrucksenkung und damit verbundene Minderperfusion der Niere könnte daher bei den Mäusen dieser Studie vorgelegen haben. Des Weiteren ist zu überlegen, inwieweit eine Minderperfusion die Anreicherung von Aliskiren im Nierengewebe und damit seine Wirkung behindert. Eine fehlende renale Wirkung des Renininhibitors passt allerdings nicht mit dem signifikanten Vorteil in der Überlebenszeit von Abschnitt 4.2.1 zusammen. Plausibler wäre eine geringgradige Minderperfusion mit ausreichender Aliskiren-Anreicherung, welche eine suffiziente Wirkung ermöglicht. Dennoch würden renale Bereiche, in denen das Gewebe schon physiologisch schwach oxigeniert ist, auch bei einer leichten Perfusionsminderung unterversorgt. Insbesondere das Nierenmark hat einen hohen Sauerstoffbedarf (Riegel 1999). So sind zuerst die langen Henle-Schleifen als auch die proximalen Tubuli betroffen (Riegel 1999). Der tubuläre Schaden macht sich schließlich in einer Mikroglobulinurie bemerkbar. Die Glomerula, welche sich in der besser oxigenierten Nierenrinde befinden, werden nach dieser These weniger geschädigt. Eine Aussage diesbezüglich anhand der Histologie ist im Nachhinein schwierig, was unter anderem auch an den bereits erwähnten Mängeln der histologischen Auswertung liegt. Die Urinanalyse mit Hilfe von SDS-PAGE Uringelen im Abschnitt 4.2.3 ermöglicht eine bessere Beurteilung, da hier zwischen einem glomerulären sowie tubulären Schaden differenziert werden kann. Letztlich bleibt die These der Minderperfusion eine Vermutung, da man ohne eine Blutdruckmessung nicht sicher von einer Hypotonie der Mäuse ausgehen kann.

Es gibt vergleichbare Studien, welche Therapien bezüglich ihrer nephroprotektiven Wirkung am COL4A3-Knockout-Mausmodell untersucht haben. Wie auch in dieser Studie wurden immunhistochemische Präparate analysiert. In der bereits erwähnten Studie ACE-Hemmer vs. AT<sub>1</sub>-Antagonisten (Gross et al. 2004 b) zeigten sowohl Ramipril als auch Candensartan eine deutliche Verringerung der Matrixakkumulation im Nierengewebe. Zwei weitere Studien untersuchten die Wirkung des HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor Cervastatin (Koepke et al. 2007) sowie des Vasopeptidase Inhibitor AVE 7688 (Gross et al. 2005) am selben Mausmodell. Auch hier konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden. Diese Ergebnisse scheinen im Vergleich zur vorliegenden Arbeit aussagekräftiger zu sein. Es ist festzuhalten, dass in all diesen Studien keine vergleichbare Manipulation wie die Pumpenimplantation dieser Studie stattfand. Auch der Zeitpunkt des Therapiebeginns bzw. die Therapiedauer weichen von dieser Arbeit ab. Es könnte sein, dass diese Unterschiede den deutlicheren Therapievorteil dieser Studien bewirken. Des Weiteren ist interessant, dass eine im Abschnitt 4.2.1 erwähnte Studie mit dem gleichen Mausmodell und demselben Tierstall neben
vergleichbar kurzen Überlebenszeiten auch keinen deutlichen Unterschied zwischen der Therapie- und Kontroll-Gruppe in den immunhistochemischen Präpraten erzielte (Brandhorst et al. 2010). Ob die Tierstallhaltung einen starken Einfluss auf die Studienergebnisse genommen hat oder ob es sich lediglich um einen Zufall handelt, bleibt unklar.

### 4.2.3 Proteinurie

Vergleicht man Therapie- und Kontroll-Gruppe im Alter von sieben Wochen, so fällt die Proteinurie bei den Mäusen der Therapie-Gruppe geringer aus. Hier lässt sich ein Vorteil für Aliskiren ableiten. Mit neuneinhalb Wochen nimmt die Proteinurie in beiden Gruppen ab. Wobei die Abnahme der unbehandelten Kontrolle sogar so ausgeprägt ist, dass ihre Proteinurie-Werte noch unter die der Therapie-Gruppe fallen. Entsprechend ist der Vorteil von Aliskiren in das Gegenteil umgeschlagen. Beim Vergleich mit ähnlichen Studien steigt die Proteinurie trotz protektiver Therapie mit zunehmendem Alter an (Gross et al. 2004 b; Koepke et al. 2007). Dass die Proteinurie in der vorliegenden Arbeit jedoch im Alter von neuneinhalb Wochen abfällt, ist besonders bei der unbehandelten Kontrolle ungewöhnlich und lässt vielmehr einen Fehler vermuten. Möglicherweise sind nicht alle Schritte in der Herstellung der Uringele korrekt durchgeführt worden. Aufgrund der geringen Anzahl an Ergebnisdaten und der starken Varianz dieser bleibt es offen, ob es sich um einen systematischen und zufälligen Fehler gehandelt hat.

Bei der Betrachtung der Gele unter dem Aspekt des funktionellen Schadens lassen sich klarere Aussagen treffen. Das Bandenmuster zeigt deutliche Unterschiede zwischen der unbehandelten Kontrolle und den mit Aliskiren therapierten Mäusen. Im Gel der unbehandelten Kontrollen ist ein glomerulärer Schaden zu sehen. Dieser passt zur Pathologie des AS, da es mit pathologischen Veränderungen der GBM einhergeht. Die dafür typischen Banden von Makroglobulinen und Albumin sind ab dem Alter von sechs Wochen bis zum Alter von neuneinhalb Wochen deutlich zu erkennen. Auch in anderen Studien mit COL4A3-Knockout-Mäusen entwickelten die unbehandelten Alport-Mäuse ab der sechsten Lebenswoche eine Proteinurie (Gross et al. 2003, Koepke et al. 2007). Bei den Mäusen der Therapie-Gruppe ist ein glomerulärer Schaden kaum vorhanden. Die Banden der Makroglobuline sind nur schwach zu sehen, ebenso sind die Albumin-Banden weniger Anscheinend konnte Aliskiren dem glomerulären Schaden protektiv ausgeprägt. entgegenwirken. Stattdessen ist jedoch eine deutliche Mikroglobulinurie zu erkennen.

Die Anhäufung von Mikroglobulinen im Uringel der Therapie-Gruppe könnte einerseits auf einem Fehler in der Methodik basieren, welcher eine ungewünschte Proteindegeneration noch vor der Urinelektrophorese verursacht hat. Dabei lässt sich allerdings kaum verifizieren, welche Molekülklasse die Proteine vor der Degeneration hatten. Ob es sich um Mikro- oder Makroglobuline gehandelt hat und ob dementsprechend ein tubulärer oder glomerulärer Schaden vorlag, bietet lediglich Anreiz für Spekulationen und soll hier nicht weiter diskutiert werden.

Andererseits besteht die Möglichkeit des tubulären Schadens. Hier kann erneut die blutdrucksenkende Wirkung des Renin-Inhibitors Aliskiren zur Erklärung herangezogen werden. Nach der These der Minderperfusion (Riegel 1999) ist das Nierenmark mit den proximalen Tubuli und den langen Henle-Schleifen im Sinne der letzten Wiese als erstes betroffen (s.o.). Eine Mikroglobulinurie als Zeichen des tubulären Schadens wäre eine plausieble Folge. Für Aliskiren würde dies bedeuten, dass es nur einen schmalen therapeutischen Grad zwischen Nephroprotektion und Minderperfusion gibt. Da in der vorliegenden Arbeit auf eine Blutdruckmessung verzichtet wurde, kann eine mögliche Minderperfusion weder bestätigt noch ausgeschlossen werden.

Des Weiteren ist ein tubulärer Schaden durch eine glomeruläre Proteinurie bzw. ein Selektivitätsverlust der GBM zu erklären (Fogo 2007). Man vermutet, dass das tubuläre Epithel durch Noxen geschädigt wird, welche zusätzlich mit den Makroglobulinen ausgeschieden werden. Hier sind oxidierte Proteine, Komplementfaktoren, verschiedene Lipoproteine und Sauerstoffradikale zu nennen (Fogo 2007). Eine glomeruläre Proteinurie entsteht beim AS durch verschiedene Faktoren. Zum einen das AS an sich, was durch die Verdickung der GBM (Hudson et al. 2003) und Rarifizierung der Podozyten (Kashtan und Segal 2011) zu einer Durchlässigkeit des renalen Filters führt. Zum anderen spielt das aktivierte RAAS eine Rolle, da Ang (Angiotensin) II in Podozyten eine Supprimierung der Nephrinexpression bewirkt (Pöschel und Wolf 2006). Auch hier lässt sich mit der These des zeitlich gerafften Krankheitsverlaufs aufgrund von kürzeren Überlebenszeiten im Vergleich zu anderen Studien (s.o.) argumentieren. So könnte bei den Mäusen dieser Arbeit die glomeruläre Proteinurie sogar noch vor einem Alter von sechs Wochen entstanden sein. Demzufolge hätte sich ein proteinuriebedingter tubulärer Schaden noch vor Therapiebeginn entwickeln können.

#### **4.2.4 TGF** β, CTGF

Während der experimentellen Phase dieser Studie wurden die Wachstumsfaktoren TGF  $\beta$  (*engl. transforming growth faktor*  $\beta$ ) und CTGF (*engl. connective tissue growth factor*) mittels Western Blot bestimmt. Aufgrund der geringen Datenmenge hat man auf eine Darstellung im Kapitel 2 und 3 verzichtet. Die Ergebnisse sind im Anhang (9.8 Wachstumsfaktoren) zu finden. Beide Wachstumsfaktoren wirken als profibrotische Zytokine und stimulieren die Transkription von ECM-Genen in renalen Zellen (Wolf 2006). Durch ihre Aktivität wird eine verstärkte Matrixakkumulation und schließlich eine Nierenfibrose gefördert (Girgert et al. 2010). Unter Aliskiren-Therapie konnten beide Wachstumsfaktoren im Vergleich zur Kontroll-Gruppe reduziert werden. Dies spricht für einen Benefit durch den Renin-Inhibitor, was die Ergebnisse der Überlebenszeit zusätzlich unterstützt. Studien mit dem gleichen Mausmodell konnten konnten vergleichbare Ergebnisse festhalten (Gross et al. 2004 b; Koepke et al. 2007).

### 4.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisdiskussion

Insgesamt zeigen die Ergebnisdaten, dass der Renin-Inhibitor Aliskiren einen positiven Einfluss auf das AS im Tierexperiment hat. Deutlich ist seine Effizienz in der signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit auch wenn die Therapie-Gruppe auf Grund der Pumpenimplantation stärker geschwächt sein müsste. Durch diesen harten Endpunkt wird eine zuverlässige Aussage zur nephroprotektiven Wirkung von Aliskiren ermöglicht. Im Vergleich dazu ist die Aussagekraft der Ergebnisse aus Histologie und Proteinurie geringer. Sowohl durch die Histologie als auch durch die Proteinurie kann der Zustand der Niere erahnt werden, beide liefern aber weniger definitive Informationen zum Vorliegen eines terminalen Nierenversagens. Des Weiteren weisen beide Punkte einen sehr kleinen Stichprobenumfang auf. Im Fall der Histologie kommen Schwächen in der Score-Methode und der statistischen Auswertung hinzu. Schwierigkeiten bei der Proteinurie ergeben sich darin, dass Fehler in der Herstellung der Uringele nicht sicher ausgeschlossen werden können. Dennoch wird tendenziell ein Vorteil für Aliskiren beobachtet. Die histologischen Präparate der Therapie-Gruppe sind meist etwas besser bewertet worden als die der unbehandelten Kontrolle. Bei der Proteinurie scheint sich der glomeruläre Schaden der Therapie-Gruppe verringert zu haben. Unterschiede, die sich beim Vergleich mit anderen Studien ergeben, lassen sich wahrscheinlich durch einige Abweichungen in der Planung des Studiendesigns erklären. Dazu gehört die Varianz in Therapiebeginn und -dauer sowie der Urinabnahmetechnik. Eine Pumpenimplantation ist in Studien mit anderen Medikamenten nicht vorgenommen worden. Schließlich könnte auch eine nicht auszuschließende Minderperfusion zu gewissen Abweichungen geführt haben.

### 4.3 Verbesserungspotential der vorliegenden Arbeit

Unterschiede tierexperimentellen Durch zu anderen Studien werden auch Verbesserungspotentiale für die Therapie mit Aliskiren aufgezeigt. Zum Beispiel scheint es sinnvoll, den Therapiebeginn schon vor das Entstehen der Proteinurie zu setzen. Auch eine Fortsetzung der Therapie bis zum Lebensende könnte von Vorteil sein. In nachfolgenden Studien sollte auf eine Blutdruckmessung nicht verzichtet werden, um eine Hypotonie ausschließen zu können. Eine orale Verabreichung von Aliskiren würde den Kofaktor Pumpenimplantation ausschließen. Dies könnte auf Grund der geringen Bioverfügbarkeit des Renin-Inhibitors allerdings erschwert sein (Buczko und Hermanowicz 2008). Ähnlich könnte man mit Stoffwechselkäfigen den Kofaktor Urinabnahme stressfreier gestalten. Außerdem besteht die Möglichkeit, durch eine größere Fallzahl in den Abschnitten Proteinurie und Histologie eine Aussagekraft erreichen. Eine bessere der Ergebnisse zu elektronenmikroskopische Darstellung neben der Immunhistochemie des Nierengewebes würde sich als sinnvoll erweisen, da diese eine sicherere Beurteilung der GBM ermöglicht (Flinter 1997). Ebenso wäre eine Vergleichsstudie mit anderen RAAS-Blockern interessant. Dabei ließe sich prüfen, ob Aliskiren im direkten Vergleich neben den konventionellen Therapien bestehen kann. Die Tatsache, dass es sich bei der vorliegenden Arbeit um eine tierexperimentelle Studie handelt, führt zwangsweise zu gewissen pharmakokinetischen Abweichungen zum Menschen (Buczko und Hermanowicz 2008). Hier ist insbesondere die schwächere Bindungsaffinität von Aliskiren zum Maus-Renin festzuhalten (Lu et al. 2008). Es ist nicht auszuschließen, dass das therapeutische Potential beim Menschen im Vergleich zum Tiermodell noch zunimmt. Sicherlich gilt dies sowohl für negative als auch positive Effekte des Renin-Inhibitors.

### 4.4 Aliskiren und weitere Möglichkeiten der RAAS-Blockade

### 4.4.1 Konventionelle RAAS-Blockade bei allen chronischen Nierenerkrankungen?

Eine nephroprotektive Wirkung über die Blockade des RAAS konnte sowohl für ACE-Hemmer als auch für AT<sub>1</sub>-Antagonisten bei Patienten mit diabetischer und nicht-diabetischer Nephropatie bestätigt werden (Siragy und Carey 2010). Dies beweist zum einen die Effizienz dieser Medikamente, andererseits wird damit der pathogenetische Stellenwert des RAAS in Bezug auf chronische Nierenerkrankungen demonstriert. Beide Medikamentenklassen konnten so stark von sich überzeugen, dass sie als First-Line-Therapie für chronische Nierenerkrankungen etabliert wurden (Bichu et al. 2009; Siragy und Carey 2010). Dennoch führt die Heterogenität der verschiedenen Nierenerkrankungen zu der Frage, ob man diese Form der RAAS-Blockade tatsächlich bei allen chronischen Nierenerkrankungen anwenden kann. So fällt nach Lattanzio und Weir das Ansprechen auf diese Therapie je nach Patientengut unterschiedlich aus (Lattanzio und Weir 2010). Diese Problematik sollte auch beim AS bedacht werden und wird teilweise bereits durch Studien beantwortet. Für eine einheitliche Therapie verschiedener Nephropathien spricht dagegen die Theorie der gemeinsamen Endstrecke. So wird auf der Grundlage von experimentellen und klinischen Studien postuliert, dass nicht allein die Grunderkrankung für die Progression von chronischen Nierenerkrankungen verantwortlich ist. Vielmehr geht man davon aus, dass diese durch den Einfluss von gemeinsamen sekundären Faktoren fortschreiten (Lattanzio und Weir 2010; van der Meer et al. 2010). So soll vor allem der Verlust von Nephronen, bedingt durch die jeweilige Grunderkrankung, zu einer kompensatorischen Hyperfiltration der übrigen Nephrone führen (van der Meer et al. 2010). Es folgt eine glomeruläre Hypertrophie sowie Albuminurie (Lattanzio und Weir 2010). Langfristig kommt es zu irreversiblen Schäden der Niere, und man schreibt dem renalen RAS dabei eine Hauptverantwortung zu (Pöschel und Wolf 2006). Sollten alle chronischen Nierenerkrankungen wie auch das AS diese gemeinsame Endstrecke vorweisen, erscheint eine einheitliche Therapie mittels RAAS-Blockade als sinnvoll. Speziell beim AS bestätigte sich die Effizienz beider Medikamentenklassen im Tierexperiment (Gross et al. 2003 und Gross et al. 2004 b). Beobachtungen bei Alport-Patienten sind bisher nur in wenigen, oft kleinen Studien gemacht worden. Zwei dieser Studien konnten zeigen, dass Enalapril bei Kindern mit AS eine Verringerung der Proteinurie bewirkt (Proesmans et al. 2000; Proesmans und Van Dyck 2004). Studien zu AT<sub>1</sub>-Antagonisten am Menschen wurden soweit nicht gefunden. Man erhofft sich neue Erkenntnisse durch die Analyse des europäischen Alport-Registers, an dem unsere Forschungsgruppe gerade arbeitet (Gross und Kashtan 2009). Das Register soll vor allem die Wirksamkeit von ACE-Hemmern untersuchen (Gross und Kashtan 2009).

Die Effizienz der RAAS-Blockade, auch beim AS, zeigt sich weiterhin in der Reduktion der Proteinurie. Die Proteinurie kann wie ein Marker für renale Schäden angesehen werden und weist auf eine insuffiziente Filtrationsselektivität hin (Fogo 2007). Sie entsteht beim AS in der Regel nach der Entwicklung der Hämaturie (Flinter 1997). Sie stellt eines der Hauptsymptome des AS dar (Gross und Weber 2005). In Studien bewirkte eine Reduzierung der Proteinurie eine langsamere Progression von chronischen Nierenerkrankungen (Lattanzio und Weir 2010). Eine Erhöhung dieser führte dagegen zu einer Verschlechterung der Nephropathien (Fogo 2007). Experimente in vitro konnten zeigen, dass Albumin bei Tubuluszellen zu einem Anstieg des Ang II führt (Fogo 2007). Daher vermutet man, dass die Proteinurie eine Aktivierung des lokalen RAS (Renin-Angiotensin-System) induziert (Pöschel und Wolf 2006). Wie bei einem Circulus vitiosus führt das lokale RAS eigens zu einem renalen Schaden, welcher wiederum eine Proteinurie ermöglicht (Pöschel und Wolf 2006). Eine Proteinuriereduktion und damit Protektion vor dem erwähnten Circulus vitiosus kann durch konventionelle RAAS-Blocker erreicht werden (Lattanzio und Weir 2010; Fogo 2007). Auch in einer Tiermodellstudie des AS wurde bei der präemptiven Gabe von ACE-Hemmern eine Abnahme der Proteinurie beobachtet. Vermutlich ist dies ein Grund für das signifikant längere Überleben der Therapie-Gruppe dieser Studie (Gross et al. 2003).

### 4.4.2 Inwiefern stellt sich Aliskiren als vorteilhafte RAAS-Blockade dar?

Die konventionelle RAAS-Blockade mit ACE-Hemmern oder AT<sub>1</sub>-Antagonisten kann das RAAS nicht zu hundertprozent blockieren. Beide hemmen nur bestimmte Wege des Systems und lassen gewisse Lücken offen. Eine solche Lücke, die bei beiden besteht, ist die erhöhte Plasma-Renin-Aktivität. Sie ist auf die fehlende negative Rückkopplung von Ang II auf die Reninfreisetzung zurückzuführen (Siragy und Carey 2010). Dies ist insofern problematisch, da Renin über einen eigenen Rezeptor, Ang-II-unabhängig, die Entwicklung des terminalen Nierenversagens fördert (Pöschel und Wolf 2006). Ebenso ergibt sich aus einer hohen PRA eine Hochregulierung von Ang I (Cagnoni et al. 2010). Im Fall der ACE-Hemmer muss das ACE-Escape-Phänomen bedacht werden. So kann neben dem Enzym ACE z.B. auch das Enzym Chymase Ang II aus Ang I generieren (Pöschel und Wolf 2006). Folglich steigen anfangs erniedrigte Ang-II-Level im Intervall wieder auf das Ausgangsniveau an (Siragy und Carey 2010). Bei den AT<sub>1</sub>-Antagonisten führt die erhöhte PRA ohne Nebenwege zu einer erhöhten Ang-II-Konzentration (Kobori et al. 2007). Da diese Medikamentenklasse nur den AT<sub>1</sub>-Rezeptor inhibiert, besteht die Möglichkeit, dass die Ang-II-Wirkung verstärkt über den AT<sub>2</sub>-Rezeptor ausgeübt wird (Kim und Iwao 2000; Fogo 2007). Erhöhte Ang-II-Level könnten dies noch potenzieren. Der AT<sub>2</sub>-Rezeptor wird vielfach als Gegenstück des AT<sub>1</sub>-

Rezeptors angesehen. Neben konträren eher nephroprotektiven Prozessen wird über den  $AT_2$ -Rezeptor ebenso das Chemokin RANTES hochreguliert, welches sich proinflammatorisch auswirkt und damit einen negativen Effekt der  $AT_1$ -Antagonisten aufzeigt (Wolf et al. 1997 und Mezzano et al. 2001).

Auf Grund der unvollständigen RAAS-Blockade wurde nach therapeutischen Alternativen gesucht. Eine Option stellt die Kombination der beiden konventionellen RAAS-Blocker dar. Eine solche Doppelblockade müsste theoretisch zu einer gegenseitigen Ergänzung der beiden Medikamente führen. Zum einen schützen ACE-Hemmer vor einem Ang-II-Anstieg, zum anderen spielt das ACE-Escape-Phänomen für AT<sub>1</sub>-Antagonisten kaum eine Rolle (van der Meer et al. 2010). Zusätzlich wird vermutet, dass das Aldosteron-Escape-Phänomen durch die Kombinationstherapie verhindert werden kann und die Aldosteronkonzentration nicht wieder ansteigt (Pöschel und Wolf 2006). Allerdings bleibt die Problematik der erhöhten PRA weiterhin bestehen. Zudem bringt die Kombinationstherapie auch einen Anstieg von Nebenwirkungen mit sich. Besonders die Hyperkaliämie kommt häufig vor (Düsing und Sellers 2009). Des Weiteren zeichtneten sich bisherige Studien dieser Therapievariante durch ein verhältnissmäßig kleines Patientenkollektiv und einen kurzen Beobachtungszeitraum aus. Es kommt hinzu, dass lediglich die Proteinurie als Marker für die therapeutische Effektivität diente (Siragy und Carey 2010). Die gerade anlaufenden Studien VANEPHRON-D und VALID berücksichtigen erstmals auch Endpunkte wie die Progression zum Nierenversagen und Tod. Man erwartet, dass beide eine bessere Aussagekraft bezüglich einer nephroprotektiven Wirkung bieten (Siragy und Carey 2010).

Eine weitere Variante, das RAAS zu blocken, und vermutlich mit weniger Nebenwirkungen, ist der Renin-Inhibitor Aliskiren. Mit der Hemmung von Renin greift Aliskiren ganz am Anfang der RAAS-Kaskade an. Demzufolge werden alle nachgeschalteten Prozesse, ausgehend von Angiotensinogen, ebenfalls inhibiert (Siragy und Carey 2010). Im Gegensatz zu ACE-Hemmern und AT<sub>1</sub>-Antagonisten führt Aliskiren weder zu einer erhöhten PRA noch zu erhöhten Ang-I- und Ang-II-Konzentrationen (Cagnoni et al. 2010). Theoretisch werden so auch die komplexen Nebenwege der Ang-II-Generierung umgangen. Zusätzlich scheint Aliskiren für eine langanhaltende renale Vasodilatation verantwortlich zu sein (Fisher et al. 2008). Gemäß Theorie. der dass eine glomeruläre Hyperfiltration bzw. Kapillardruckerhöhung die Glomerulosklerose forciert, könnte eine Valsodilatation eine geringere Sclerosierungstendenz bewirken (Fogo 2007). Ein weiterer Vorteil des

Reninantagonisten ist neben der Inhibition von Renin auch die Prorenininhibition (Siragy und Carey 2010). Zusätzlich verringert Aliskiren die Expression des Pro-Renin-Rezeptors, was den Ang-II-unabhängigen Wirkungen von Prorenin und Renin entgegenwirkt (Siragy und Carey 2010). Auch die Aldosteronsekretion wird durch den Renin-Inhibitor erfolgreich gesenkt (Cagnoni et al. 2010; Siragy und Carey 2010). Aliskiren weist sich durch ein nebenwirkungsarmes Profil aus und schneidet im Vergleich zur Kombinationtherapie von ACE-Hemmern und AT<sub>1</sub>-Antagonisten besser ab. Bei der Betrachtung von fünf Studien brachen aus einem Pool von über 3000 Patienten insgesamt nur 1,9 % die Therapie aufgrund von Nebenwirkungen vorzeitig ab (Sever et al. 2009). Eine Dosis zwischen 150-300 mg wird gut vertragen. Zudem wird keine Dosisreduzierung bei älteren Menschen oder Patienten mit verminderter renaler bzw. hepatischer Funktion gefordert (Sever et al. 2009; Cagnoni et al. 2010). Die Gefahr der Medikamenteninteraktion wird als gering eingestuft. So wird Aliskiren zwar auch durch das Enzym CYP3A4 metabolisiert, die Aktivität der CYP450 Isoenzyme wird dabei jedoch nicht beeinflusst (Buczko und Hermanowicz 2008). Ebenso zeichnet sich Aliskiren durch eine geringe Proteinbindung aus (Buczko und Hermanowicz 2008; Sever et al. 2009). Bei den Kontraindikationen unterscheidet sich Aliskiren kaum von ACE-Hemmern Hier und AT<sub>1</sub>-Antagonisten. sind Schwangerschaft, molekülbedingte Hypersensitivitätsreaktion und beidseitige Nierenstenose auch bei Aliskiren zu nennen (Cagnoni et al. 2010). Insgesamt stellen die aufgeführten Punkte Aliskiren als einen interessanten alternativen RAAS-Blocker dar. Im Vergleich zu den konventionellen RAAS-Blockern scheint es sogar in gewissen Bereichen im Vorteil zu sein, besonders was das Nebenwirkunsprofil der Kombinationstherapie angeht. Dennoch muss Aliskiren ähnlich der Doppelblockade seine Effektivität in Langzeitstudien mit harten Endpunkten beweisen. Diesbezüglich erhofft man sich weiterführende Erkenntnisse von der gerade laufenden ALTITUDE-Studie. Sie soll die Wirkung von Aliskiren in Kombination mit ACE-Hemmern oder AT<sub>1</sub>-Antagonisten bezüglich kardiorenaler Endpunkte analysieren (Siragy und Carey 2010). Im Gegensatz zu Aliskiren sind ACE-Hemmer und AT<sub>1</sub>-Antagonisten bereits als leitlininengerechte Medikamente bei chronischen Nephropathien anerkannt und stellen somit die First-Line-Therapie dar (Bichu et al. 2009; Siragy und Carey 2010). Es gibt jedoch Patienten mit einer Intoleranz gegenüber ACE-Hemmern oder AT<sub>1</sub>-Antagonisten, so dass diese keine adäquate Wirkung entwickeln können (Buczko und Hermanowicz 2008; Cagnoni et al. 2010). Gerade in solchen Situationen könnte sich Aliskiren als Therapiealternative etablieren.

### 4.4.3 Weitere Möglichkeiten der RAAS-Blockade

Neben den Monotherapien zeigt sich immer wieder die Tendenz zur Kombinationstherapie. Dabei gibt es verschiedene Möglichkeiten. Die Doppelblockade mit ACE-Hemmern und AT<sub>1</sub>-Antagonisten wurde bereits erwähnt. Beide können auch jeweils in Kombination mit Aliskiren gegeben werden, wie es z.B. bei der ALTITUDE- und AVOID-Studie der Fall ist (Siragy und Carey 2010). Als zusätzlichen Therapieansatz hat man in verschiedenen Studien einen Aldosteronantagonisten additiv zu ACE-Hemmern oder AT<sub>1</sub>-Rezeptorblockern hinzugegeben. Man konnte in dieser Form der Kombinationstherapie eine Reduktion der Proteinurie erreichen (Pöschel und Wolf 2006; van der Meer et al. 2010). Prinzipiell erhofft man sich von den Kombinationstherapien, dass die Komplexität des RAAS noch besser angegangen wird. Dies birgt aber auch die Gefahr, dass Nebenwirkungen wie die Hyperkaliämie vermehrt auftreten. Insbesondere in der Kombination mit einem Aldosteronantagonisten (Pöschel und Wolf 2006). Dementsprechend muss zwischen Risiko und Nutzen sorgfältig abgewogen werden.

### 4.4.4 Welche Art von RAAS-Blockade ist für das AS am sinnvollsten?

Beim AS handelt es sich um eine Nephropathie, die auf Veränderungen im Gen des Kollagens Typ IV zurückzuführen ist (Gross und Weber 2005). Die Erkrankung ist weder durch eine entzündliche Genese noch durch eine Hypertonie bedingt (Gross et al. 2003). Der Selektivitäsverlust der GBM steht bei der Pathogenese des AS im Vordergrund (Hudson et al. 2003). Dieser entsteht einerseits durch Einbau des  $\alpha 1.\alpha 1.\alpha 2$ (IV)-Netzwerks, welches leichter anfällig gegenüber Proteolyse ist (Hudson et al. 2003). Des Weiteren führt der Verlust des α3.α4.α5(IV)-Netzwerks zu einer Verdickung der GBM, was vermutlich zusätzlich eine Durchlässigkeit dieser mit sich bringt (Hudson et al. 2003). Ein weiterer Prozess, der die Selektionsfähigkeit verringert, ist die Rarifizierung der Podozyten (Kashtan und Segal 2011). All diese pathogenetischen Veränderungen an der GBM haben schließlich eine Hämaturie und Proteinurie zur Folge. Die Hämaturie scheint allerdings weniger vom Selektionsverlust herzurühren, sondern vielmehr auf Grund von ausgedünnten glomerulären Kapillaren zu entstehen (Kashtan und Segal 2011). Man konnte beobachten, dass sich eine Reduktion des Proteingehalts im Urin nephroprotektiv auswirkt (Lattanzio und Weir 2010). Entsprechend sollten Therapien, die eine Proteinurie zuverlässig senken, beim AS Anwendung finden. Eine effektive Proteinuriesenkung konnte sowohl bei ACE-Hemmern, AT<sub>1</sub>-Antagonisten, Aldosteronantagonisten als auch dem Renin-Inhibitor Aliskiren beobachtet werden (Fogo

2007; Bichu et al. 2009; van der Meer et al. 2010). Bei Alport-Patienten handelt es sich häufig um Kinder (Gross et al. 2004 a). Aufgrund der unzureichenden Studienlage sind Arzneimittel-Interaktionen einer Kombinationstherapie im kindlichen Stoffwechsel schwer abzuschätzen. Daher ist die Monotherapie im Kindesalter vermutlich die sicherste Variante. Derzeit sind noch keine RAAS-Blocker bei Kindern zugelassen (Gross und Kashtan 2009). Die Zulassung für ACE-Hemmer soll durch das europäische Alport-Register erreicht werden (Gross und Kashtan 2009). Auch Aliskiren ist derzeit bei Kindern nicht zugelassen (KBV 2008). Sollte es sich in späteren Studien weiterhin als effektiv erweisen, könnte es als Monotherapeutikum eine ausreichende RAAS-Blockade bewirken. Dagegen wird im jungen Erwachsenenalter eine nebenwirkungsreichere Kombinationstherapie vermutlich besser vertragen. Hier ist das nebenwirkungsarme Profil von Aliskiren eine gute Basis für die Therapie mit anderen RAAS-Blockern. Da mit zunehmendem Alter eine Komorbidität wahrscheinlicher wird, sollte man bei älteren Alport-Patienten abwägen, inwiefern eine Kombinationstherapie noch sinnvoll ist, und individuell entscheiden. Die erwähnten Therapievorschläge sind jedoch ohne die Grundlage von klinischen Studien nicht genügend ausgereift. Man ist in der Erforschung von möglichen Therapien weiterhin auf Fortschritte angewiesen, um eine sichere evidenz-basierte Therapie bei Patienten mit AS zu entwickeln.

# 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Renininhibitor Aliskiren bei homozygoten Col4A3-Knockout-Mäusen auf seine nephroprotektive Wirkung hin untersucht. Ähnlich dem Menschen erkrankt das Mausmodell am Alport-Syndrom und zeigt eine annähernd vergleichbare Pathogenese sowie einen vergleichbaren Krankheitsverlauf.

Beim Alport-Syndrom handelt es sich um eine progressive Glomerulonephritis erblicher Genese. Sie wird von einer Hämaturie und Proteinurie begleitet. Als weitere Symptome kommen eine Innenohrschwerhörigkeit und Augenveränderungen hinzu. Im weit fortgeschrittenen Stadium entwickelt sich schließlich ein terminales Nierenversagen. Ursache der Erkrankung sind Mutationen in den Genen des Kollagens Typ IV.

Ziel der Studie war es zu klären, ob Aliskiren der Entwicklung des Nierenversagens beim AS protektiv entgegenwirken kann. Bei insgesamt 39 Mäusen wurden Lebenszeit, Histologie und Proteinurie untersucht. Als Kontrolle dienten unbehandelte homozygote Col4A3-Knockout-Mäuse. Für die Analyse der Überlebenszeit nutzte man einen Kaplan-Mayer-Schätzer. Die histologischen Präparate wurden über einen Punktescore beurteilt. Für die Proteinuriebestimmung gewann man Urinproben und untersuchte diese mittels SDS-Page. Tendenziell zeigten die Ergebnisse einen Vorteil für die Behandlung mit Aliskiren. Insbesondere bei der Auswertung der Überlebenszeiten konnte ein signifikanter Vorteil für den Renininhibitor festgestellt werden. Die Ergebnisse aus Histologie und Proteinurie waren weniger aussagekräftig, was zum Teil auf geringe Fallzahlen zurückzuführen ist. Dennoch zeigte sich auch in der Histologie eine geringere Sclerosierungstendenz des Nierengewebes bei der Therapie-Gruppe als bei der Kontroll-Gruppe. Genauso konnte die Therapie-Gruppe eine Reduktion der Makroglobulinurie verzeichnen. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Reninhemmung durch Aliskiren, und damit der Eingriff in das RAAS, eine Verlängerung der Lebenszeit im untersuchten Mausmodell bewirkt hat. Aliskiren scheint demnach die Entwicklung des terminalen Nierenversagens hinauszuzögern und stellt einen potentiellen Therapieansatz für das AS dar. Noch ist Aliskiren nicht von offiziellen Leitlinien zur Anwendung bei chronischen Nierenerkrankungen bzw. beim AS anerkannt. Es muss sich daher erst neben etablierten Medikamenten wie den ACE-Hemmern oder AT<sub>1</sub>-Antagonisten in weiteren Studien beweisen.

Die pathogenetische Entwicklung des terminalen Nierenversagens beim AS ist nach wie vor nicht klar verstanden. Eine Klärung der genauen Pathogenese ist aber wichtig für ein besseres Verständnis der Erkrankung. Dies kann wiederum die Entwicklung von effizienteren und die Festigung von erprobten Therapien ermöglichen. Dass das RAAS einen wichtigen Stellenwert in der Pathogenese des AS einnimmt, konnte sowohl durch die vorliegende Arbeit als auch durch Studien mit anderen RAAS-Blockern beim Menschen wie auch im Tiermodell gezeigt werden. Zurzeit stellt die Transplantation jedoch immer noch die einzige tatsächliche Heilungschance dar. Es handelt sich dabei um ein recht belastendes Verfahren, und Komplikationen wie die Abstoßung des Transplantats sind nicht immer zu vermeiden. Es ist daher von großem Interesse, komplikationsärmere Therapien zu etablieren, die eine suffiziente Behandlung des AS ermöglichen. Die Blockade des RAAS könnte eine sinnvolle Alternative zur Transplantation darstellen. Zur Verfügung stehen Monotherapien mit ACE-Hemmern, AT<sub>1</sub>-Antagonisten, Aldosteronantagonisten und der Renin-Inhibitor Aliskiren sowie Kombinationstherapien mit diesen Medikamenten in den verschiedensten Varianten. Studien wie das europäische Alport-Register, welches den Einsatz von ACE-Hemmern bei Alport-Patientin im Kindesalter untersucht, sollen in Zukunft weitere Erkenntnisse bringen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden als Abstract im "American Journal of Hypertension" (Gross et al. 2011) publiziert

# 6 Literaturverzeichnis

- Andersen K, Weinberger MH, Egan B, Constance CM, Ali MA, Jin J, Keefe DL (2008): Comparative efficacy and safety of aliskiren, an oral direct renin inhibitor, and ramipril in hypertension: a 6-month, randomized, double-blind trial. J Hypertens <u>26</u>, 589-99
- Alport AC (1927): Hereditary familial congenital haemorrhagic nephritis. BMJ <u>1927, 1</u>, 504-506
- Alves FR, de A Quintanilha Ribeiro F (2005): Revision about hearing loss in the Alport's syndrome, analyzing the clinical, genetic and bio-molecular aspects. Braz J Otorhinolaryngol <u>71</u>, 813-9
- Bichu P, Nistala R, Khan A, Sowers JR, Whaley-Connell A (2009): Angiotensin receptor blockers for the reduction of proteinuria in diabetic patients with overt nephropathy: results from the AMADEO study. Vasc Health Risk Manag <u>5</u>, 129-40
- Brandhorst G, Brehmer F, Petrova DT, Gross O, Miosge N, Armstrong VW, Oellerich M (2010): Mycophenolic acid predose concentrations and renal function in a mouse model for progressive renal fibrosis. Ther Drug Monit <u>32</u>, 73-8
- Brunotte J: Die Bedeutung von Erythropoietin und seinem Rezeptor für die Prognose humaner Glioblastome. Med. Diss. Göttingen 2010
- Buczko W, Hermanowicz JM (2008): Pharmacokinetics and pharmacodynamics of aliskiren, an oral direct renin inhibitor. Pharmacol Rep <u>60</u>, 623-31
- Busse R: Kapitel 28, Kreislauf; in: Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie, hrsg.
  v. Schmidt RF und Lang F u. a.; Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2007, 619-680
- Cagnoni F, Njwe CA, Zaninelli A, Ricci AR, Daffra D, D'Ospina A, Preti P, Destro M (2010): Blocking the RAAS at different levels: an update on the use of the direct renin inhibitors alone and in combination. Vasc Health Risk Manag <u>6</u>, 549-59
- Cosgrove D, Meehan DT, Grunkemeyer JA, Kornak JM, Sayers R, Hunter WJ, Samuelson GC (1996): Collagen COL4A3 knockout: a mouse model for autosomal Alport syndrome. Genes Dev <u>10</u>, 2981-92
- Cosgrove D, Rodgers K, Meehan D, Miller C, Bovard K, Gilroy A, Gardner H, Kotelianski V, Gotwals P, Amatucci A, Kalluri R (2000): Integrin alpha1beta1 and transforming

growth factor-beta1 play distinct roles in alport glomerular pathogenesis and serve as dual targets for metabolic therapy. Am J Pathol <u>157</u>, 1649-59

- Cosgrove D, Kalluri R, Miner JH, Segal Y, Borza DB (2007): Choosing a mouse model to study the molecular pathobiology of Alport glomerulonephritis. Kidney Int <u>71</u>, 615-8
- Crawfurd MA (1988): Alport's syndrome. J Med Genet 25, 623-7
- Dechend R, Shagdarsuren E, Gratze P, Fiebeler A, Pilz B, Meiners S, Derer W, Feldman DL, Webb R, Muller DN (2007): Low-dose renin inhibitor and low-dose AT(1)-receptor blocker therapy ameliorate target-organ damage in rats harbouring human renin and angiotensinogen genes. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst <u>8</u>, 81-4
- Derer W, Müller DN, Dechend R (2006): Renininhibitor Aliskiren als Antihypertensivum/ Ein klinischer Ausblick. Clin Res Cardiol Suppl <u>1</u>, 149-156
- Dong YF, Liu L, Kataoka K, Nakamura T, Fukuda M, Tokutomi Y, Nako H, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S (2010): Aliskiren prevents cardiovascular complications and pancreatic injury in a mouse model of obesity and type 2 diabetes. Diabetologia <u>53</u>, 180-91
- Düsing R, Sellers F (2009): ACE inhibitors, angiotensin receptor blockers and direct renin inhibitors in combination: a review of their role after the ONTARGET trial. Curr Med Res Opin <u>25</u>, 2287-301
- Fisher ND, Jan Danser AH, Nussberger J, Dole WP, Hollenberg NK (2008): Renal and hormonal responses to direct renin inhibition with aliskiren in healthy humans. Circulation <u>117</u>, 3199-205
- Flinter F (1997): Alport's syndrome. J Med Genet 34, 326-30
- Flinter FA, Cameron JS, Chantler C, Houston I, Bobrow M (1988): Genetics of classic Alport's syndrome. Lancet <u>1988, 2</u>, 1005-7.
- Fogo AB (2007): Mechanisms of progression of chronic kidney disease. Pediatr Nephrol <u>22</u>, 2011-22
- Giebisch G und Windhager E: Chapter 40: Integration of salt and water balance; in: Medical Physiology: A cellular and molekular approach, hrsg. v. Boron WF und Boulpaep EL; Sounders, Elsevier Verlag, Philadelphia 2009, 866-880

- Girgert R, Martin M, Kruegel J, Miosge N, Temme J, Eckes B, Müller GA, Gross O (2010): Integrin α2-deficient mice provide insights into specific functions of collagen receptors in the kidney. Fibrogenesis Tissue Repair <u>3</u>, 19
- Gratzl M und Wurzinger LJ : Kapitel 4, Bindegewebe; in: Histologie, hrsg. v. Junqueira LCU, Carneiro J, Gratzl M, u. a.; Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2005, 58-74
- Gross O und Weber M (2003): COL4A3 knockouts: ein neues Tiermodell für die chronisch progrediente Nierenfibrose und für die Therapie des Alport-Syndroms. http://www.medicom.cc/medicom/inhalte/nephronews/entries/1488/entries\_sec/1499.php
- Gross O und Weber M (2005): From Bench to Bedside; Von der Molekulargenetik des Alport-Syndroms zu Prinzipien der Organprotektion bei chronischen Nierenerkrankungen. Med Klin (Munich) <u>100</u>, 826-831
- Gross O und Kashtan CE (2009): Treatment of Alport syndrome: beyond animal models. Kidney Int <u>76</u>, 599-603
- Gross O, Netzer KO, Lambrecht R, Seibold S, Weber M (2002): Meta-analysis of genotypephenotype correlation in X-linked Alport syndrome: impact on clinical counselling. Nephrol Dial Transplant <u>17</u>, 1218-27
- Gross O, Beirowski B, Koepke ML, Kuck J, Reiner M, Addicks K, Smyth N, Schulze-Lohoff E, Weber M (2003): Preemptive ramipril therapy delays renal failure and reduces renal fibrosis in COL4A3-knockout mice with Alport syndrome. Kidney Int <u>63</u>, 438-46
- Gross O, Koepke M-L, Weber M (2004 a): Alport-Syndrom und familiäre benigne Hämaturie Eine Übersicht über hereditäre Erkrankungen des Typ-IV-Kollagens der Gefäßbasalmembranen. Nieren-Hochdruckkr <u>33</u>, 348-356
- Gross O, Schulze-Lohoff E, Koepke ML, Beirowski B, Addicks K, Bloch W, Smyth N, Weber M (2004 b): Antifibrotic, nephroprotective potential of ACE inhibitor vs AT1 antagonist in a murine model of renal fibrosis. Nephrol Dial Transplant <u>19</u>, 1716-23
- Gross O, Koepke M-L, Beirowski B, Schulze-Lohoff E, Segerer S, Weber M (2005): Nephroprotection by antifibrotic and anti-inflammatory effects of the vasopeptidase inhibitor AVE7688. Kidney Int <u>68</u>, 456-63
- Gross O, Girgert R, Beirowski B, Kretzler M, Kang HG, Kruegel J, Miosge N, Busse AC, Segerer S, Vogel WF, Müller GA, Weber M (2010): Loss of collagen-receptor DDR1 delays renal fibrosis in hereditary type IV collagen disease. Matrix Biol <u>29</u>, 346-56

- Gross O, Girgert R, Rubel D, Temme J, Theissen S, Müller GA (2011): Renal protective effects of aliskiren beyond its antihypertensive property in a mouse model of progressive fibrosis. Am J Hypertens <u>24</u>, 355-61
- Gunwar S, Ballester F, Noelken ME, Sado Y, Ninomiya Y, Hudson BG (1998): Glomerular basement membrane. Identification of a novel disulfide-cross-linked network of alpha3, alpha4, and alpha5 chains of type IV collagen and its implications for the pathogenesis of Alport syndrome. J Biol Chem 273, 8767-75
- Heidet L und Gubler MC (2009): The renal lesions of Alport syndrome. J Am Soc Nephrol 20, 1210-5
- Heikkilä P, Tryggvason K, Thorner P (2000): Animal models of Alport syndrome: advancing the prospects for effective human gene therapy. Exp Nephrol <u>8</u>, 1-7
- Heino J (2007): The collagen family members as cell adhesion proteins. Bioessays <u>29</u>, 1001-10
- Hood JC, Savige J, Hendtlass A, Kleppel MM, Huxtable CR, Robinson WF (1995): Bull terrier hereditary nephritis: a model for autosomal dominant Alport syndrome. Kidney Int 47, 758-65
- Hood JC, Huxtable C, Naito I, Smith C, Sinclair R, Savige J (2002): A novel model of autosomal dominant Alport syndrome in Dalmatian dogs. Nephrol Dial Transplant <u>17</u>, 2094-8
- Hudson BG, Reeders ST, Tryggvason K (1993): Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis. J Biol Chem 268, 26033-6
- Hudson BG, Tryggvason K, Sundaramoorthy M, Neilson EG (2003): Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. N Engl J Med <u>348</u>, 2543-56
- Ino J, Kojima C, Osaka M, Nitta K, Yoshida M (2009): Dynamic observation of mechanically-injured mouse femoral artery reveals an antiinflammatory effect of renin inhibitor. Arterioscler Thromb Vasc Biol 29, 1858-63

- Kaito H, Nozu K, Iijima K, Nakanishi K, Yoshiya K, Kanda K, Przybyslaw Krol R, Yoshikawa N, Matsuo M (2006): The effect of aldosterone blockade in patients with Alport syndrome. Pediatr Nephrol <u>21</u>, 1824-9
- Kashtan CE, Segal Y (2011): Genetic disorders of glomerular basement membranes. Nephron Clin Pract <u>118</u>, c9-c18
- Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV) (2008): Aliskiren (Rasilez<sup>®</sup>). Wirkstoff Aktuell. http://www.kbv.de/ais/39047.html
- Kim S, Iwao H (2000): Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. Pharmacol Rev <u>52</u>, 11-34
- Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A (2007): The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. Pharmacol Rev <u>59</u>, 251-87
- Koepke ML, Weber M, Schulze-Lohoff E, Beirowski B, Segerer S, Gross O (2007): Nephroprotective effect of the HMG-CoA-reductase inhibitor cerivastatin in a mouse model of progressive renal fibrosis in Alport syndrome. Nephrol Dial Transplant <u>22</u>, 1062-9
- Kruegel J und Miosge N (2010): Basement membrane components are key players in specialized extracellular matrices. Cell Mol Life Sci <u>67</u>, 2879-95
- Lang F und Kurtz Armin: Kapitel 29, Niere; in: Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie, hrsg. v. Schmidt RF und Lang F u. a.; Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2007, 684-719
- Lattanzio MR, Weir MR (2010): Does blockade of the Renin-Angiotensin-aldosterone system slow progression of all forms of kidney disease? Curr Hypertens Rep <u>12</u>, 369-77
- Lees GE, Helman RG, Kashtan CE, Michael AF, Homco LD, Millichamp NJ, Ninomiya Y, Sado Y, Naito I, Kim Y (1998): A model of autosomal recessive Alport syndrome in English cocker spaniel dogs. Kidney Int <u>54</u>, 706-19
- Lees GE, Helman RG, Kashtan CE, Michael AF, Homco LD, Millichamp NJ, Camacho ZT, Templeton JW, Ninomiya Y, Sado Y, Naito I, Kim Y (1999): New form of X-linked dominant hereditary nephritis in dogs. Am J Vet Res <u>60</u>, 373-83

- Lu H, Rateri DL, Feldman DL, Jr RJ, Fukamizu A, Ishida J, Oesterling EG, Cassis LA, Daugherty A (2008): Renin inhibition reduces hypercholesterolemia-induced atherosclerosis in mice. J Clin Invest <u>118</u>, 984-93
- Lüllmann-Rauch R: Taschenlehrbuch Histologie, 3. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2009
- Lüllmann H, Mohr K, Hein L: Pharmakologie und Toxikologie, Arzeimittelwirkungen verstehen Medikamente gezielt einsetzen, 16. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2006
- Mezzano SA, Ruiz-Ortega M, Egido J (2001):Angiotensin II and renal fibrosis. Hypertension <u>38</u>, 635-8
- Miner JH, Sanes JR (1996): Molecular and functional defects in kidneys of mice lacking collagen alpha 3 (IV): implications for Alport syndrome. J Cell Biol <u>135</u>, 1403-13
- Netzer K-O und Weber M: Erbliche Nierenerkrankungen mit vorwiegend glomerulärer Beteiligung/ Alport Syndrom; in: Thiemes Innere Medizin: TIM, hrsg. von Alexander K, Flasnoecker M u. a. ; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1999, 1362-1364
- Ninichuk V, Gross O, Reichel C, Khandoga A, Pawar RD, Ciubar R, Segerer S, Belemezova E, Radomska E, Luckow B, Perez de Lema G, Murphy PM, Gao JL, Henger A, Kretzler M, Horuk R, Weber M, Krombach F, Schlöndorff D, Anders HJ (2005): Delayed chemokine receptor 1 blockade prolongs survival in collagen 4A3-deficient mice with Alport disease. J Am Soc Nephrol <u>16</u>, 977-85
- Oparil S, Yarows SA, Patel S, Fang H, Zhang J, Satlin A (2007): Efficacy and safety of combined use of aliskiren and valsartan in patients with hypertension: a randomised, double-blind trial. Lancet <u>370</u>, 221-9
- Parving HH, Persson F, Lewis JB, Lewis EJ, Hollenberg NK (2008): Aliskiren combined with losartan in type 2 diabetes and nephropathy. N Engl J Med <u>358</u>, 2433-46
- Parving HH, Brenner BM, McMurray JJ, de Zeeuw D, Haffner SM, Solomon SD, Chaturvedi N, Ghadanfar M, Weissbach N, Xiang Z, Armbrecht J, Pfeffer MA (2009):
  Aliskiren Trial in Type 2 Diabetes Using Cardio-Renal Endpoints (ALTITUDE): rationale and study design. Nephrol Dial Transplant 24, 1663-71
- Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R (2006): Physiology of local renin-angiotensin systems.Physiol Rev <u>86</u>, 747-803

- Peixoto AJ, Orias M (2009): Is there a role for direct renin inhibitors in chronic kidney disease? Curr Opin Nephrol Hypertens <u>18</u>, 397-403
- Pilz B, Shagdarsuren E, Wellner M, Fiebeler A, Dechend R, Gratze P, Meiners S, Feldman DL, Webb RL, Garrelds IM, Jan Danser AH, Luft FC, Müller DN (2005):
  Aliskiren, a human renin inhibitor, ameliorates cardiac and renal damage in double-transgenic rats. Hypertension 46, 569-76
- Pöschel K A und Wolf G (2006): Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System als Zentraler Mediator der Progression der Niereninsuffizienz. Nephrologe <u>1</u>, 233-240
- Pöss J, Werner C, Lorenz D, Gensch C, Böhm M, Laufs U (2010): The renin inhibitor aliskiren upregulates pro-angiogenic cells and reduces atherogenesis in mice. Basic research in cardiology <u>105</u>, 725-35
- Proesmans W, Van Dyck M (2004): Enalapril in children with Alport syndrome. Pediatr Nephrol. <u>19</u>, 271-5
- Proesmans W, Knockaert H, Trouet D (2000): Enalapril in paediatric patients with Alport syndrome: 2 years' experience. Eur J Pediatr <u>159</u>, 430-3
- Remuzzi G, Ruggenenti P, Perna A, Dimitrov BD, de Zeeuw D, Hille DA, Shahinfar S, Carides GW, Brenner BM (2004): Continuum of renoprotection with losartan at all stages of type 2 diabetic nephropathy: a post hoc analysis of the RENAAL trial results. J Am Soc Nephrol <u>15</u>, 3117-25
- Remuzzi G, Macia M, Ruggenenti P (2006): Prevention and treatment of diabetic renal disease in type 2 diabetes: the BENEDICT study. J Am Soc Nephrol <u>17</u>, S90-7
- Rheault MN, Kren SM, Thielen BK, Mesa HA, Crosson JT, Thomas W, Sado Y, Kashtan CE, Segal Y (2004): Mouse model of X-linked Alport syndrome. J Am Soc Nephrol <u>15</u>, 1466-74
- Riegel W: Akute Niereninsuffizienz; in: Thiemes Innere Medizin: TIM, hrsg. v. Alexander K, Daniel WG u. a.; Georg Thieme Verlag; Stuttgart 1999; 1389-1396
- Ruggenenti P, Perna A, Remuzzi G (2001): ACE inhibitors to prevent end-stage renal disease: when to start and why possibly never to stop: a post hoc analysis of the REIN trial results. Ramipril Efficacy in Nephropathy. J Am Soc Nephrol <u>12</u>, 2832-7

- Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, Rupérez M, Egido J (2001): Proinflammatory actions of angiotensins. Curr Opin Nephrol Hypertens <u>10</u>, 321-9
- Sayers R, Kalluri R, Rodgers KD, Shield CF, Meehan DT, Cosgrove D (1999): Role for transforming growth factor-beta1 in alport renal disease progression. Kidney Int <u>56</u>, 1662-73
- Schjoedt KJ, Andersen S, Rossing P, Tarnow L, Parving HH (2004): Aldosterone escape during blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system in diabetic nephropathy is associated with enhanced decline in glomerular filtration rate. Diabetologia <u>47</u>, 1936-9
- Sever PS, Gradman AH, Azizi M (2009): Managing cardiovascular and renal risk: the potential of direct renin inhibition. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst. <u>10</u>, 65-76
- Siragy HM, Carey RM (2010): Role of the intrarenal renin-angiotensin-aldosterone system in chronic kidney disease. Am J Nephrol <u>31</u>, 541-50
- Stanton A, Jensen C, Nussberger J, O'Brien E (2003): Blood pressure lowering in essential hypertension with an oral renin inhibitor, aliskiren. Hypertension <u>42</u>, 1137-43
- Strasser RH, Puig JG, Farsang C, Croket M, Li J, van Ingen H (2007): A comparison of the tolerability of the direct renin inhibitor aliskiren and lisinopril in patients with severe hypertension. J Hum Hypertens <u>21</u>, 780-7
- Uresin Y, Taylor AA, Kilo C, Tschöpe D, Santonastaso M, Ibram G, Fang H, Satlin A (2007):
   Efficacy and safety of the direct renin inhibitor aliskiren and ramipril alone or in combination in patients with diabetes and hypertension. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst <u>8</u>, 190-8
- van der Meer IM, Cravedi P, Remuzzi G (2010): The role of renin angiotensin system inhibition in kidney repair. Fibrogenesis Tissue Repair <u>3</u>, 7
- Vanourková Z, Kramer HJ, Husková Z, Cervenka L, Vanecková I (2010) Despite similar reduction of blood pressure and renal ANG II and ET-1 levels aliskiren but not losartan normalizes albuminuria in hypertensive Ren-2 rats. Physiol Res <u>59</u>, 339-45
- Welsch U: Sobotta, Lehrbuch Histologie; Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie, 2. Auflage; Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München 2006
- Wenzel U und Wolf G (2005): Blutdruckunabhängige Wirkungen von Antihypertensiva. Internist (Berl) <u>46</u>, 548-56

- Wolf G (2005): Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System komplexer als bisher gedacht. Med Klin (Munich) <u>100</u>, 471-7
- Wolf G (2006): Renal injury due to renin-angiotensin-aldosterone system activation of the transforming growth factor-beta pathway. Kidney Int <u>70</u>, 1914-9
- Wolf G, Ziyadeh FN, Thaiss F, Tomaszewski J, Caron RJ, Wenzel U, Zahner G, Helmchen U, Stahl RA (1997): Angiotensin II stimulates expression of the chemokine RANTES in rat glomerular endothelial cells. Role of the angiotensin type 2 receptor. J Clin Invest <u>100</u>, 1047-58
- Yamamoto E, Kataoka K, Dong YF, Nakamura T, Fukuda M, Tokutomi Y, Matsuba S, Nako H, Nakagata N, Kaneko T, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S (2009): Aliskiren enhances the protective effects of valsartan against cardiovascular and renal injury in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. Hypertension 54, 633-8
- Zheng K, Thorner PS, Marrano P, Baumal R, McInnes RR (1994): Canine X chromosomelinked hereditary nephritis: a genetic model for human X-linked hereditary nephritis resulting from a single base mutation in the gene encoding the alpha 5 chain of collagen type IV. Proc Natl Acad Sci U S A <u>91</u>, 3989-93
- Zoja C, Morigi M, Benigni A, Remuzzi G (2004): Genetics of rare diseases of the kidney: learning from mouse models. Cytogenet Genome Res <u>105</u>, 479-84

# 7 Anhang

### 7.1 Protokoll: PCR

### 1. Verdau:

### 1. 180µl Puffer ATL

- 2. 20µl Proteinase K
- → Vortex, inkubieren für vier Stunden bei 55°C(Wasserbad, Thermomixer)

### 2. DNA-Extraktion: 1. Vortex

- 2. Verdau zentrifugieren 5 min bei maximaler Geschwindigkeit
- 3. Überstand in PCR-Reaktionsgefäße→ Haare verwerfen
- 4. Vortex
- 5. Mastermix ALE-Puffer: je 200µl AL-Puffer + 200µl Ethanol
   ≥ 96% je Probe (400µl ALE-Puffer je Probe)
- 6. Vortex
- 7. Gemisch auf DN-Easy-Membran (engl. DN Easy Mini spin column)
- 8. Zentrifugieren 1 min bei 8000 rpm→ Unterteil des Cups verwerfen.
- 9. + je 500µl AW1-Puffer
- 10. Zentrifugieren 1 min bei 8000 rpm→ Unterteil des Cups verwerfen.
- 11. + je 500µl AW2-Puffer
- 12. Zentrifugieren 3 min bei maximaler Geschwindigkeit
- 13. Überstand in Auffanggefäße abschütten
- 14. Zentrifugieren 3 min bei maximaler Geschwindigkeit
- 15. Auffangröhrchen verwerfen
- 16. Umsetzen auf PCR-Reaktionsgefäße
- 17. Schwanzbiopsie: + je 200µl AE-PufferOhrbiopsie: + je 70µl AE-Puffer
- 15. bei Raumtemperatur 1 min stehen lassen
- 16. Zentrifugieren 1min bei 8000 rpm → DNA-Membran verwerfen
- <u>3. PCR:</u> 1. von jeder Probe 1,7µl in kleine PCR-Reaktionsgefäße

	2. + je 23ul Mastermix (in der vorgegebenen Reihenfolge) <sup>.</sup>
	-20 μ1 H2O
	-2,5 µl Reactionbuffer S
	-0,5 µl dNTP
	-0,5 µl Primer A
	-0,5 µl Primer B
	-0,5 µl Primer C
	-0,15 µl Taq-Polymerase
	3. gefüllte Reaktionsgefäße in das PCR-Gerät
4. Gel herstellen:	1. 0,3g Agarose + 20 ml TAE
	2. Gemisch aufkochen bis es ganz klar ist, abkühlen
	3. $+ 20\mu$ l Ethidiumbromid(0,02%)
	4. Schlitten, Blöcke und Kamm in die Laufkammer einsetzen
	5. Gel eingießen (nach 10 min fest)
	6. Proben vorbereiten: 2,5 $\mu$ l blauer Laufpuffer + 12,5 $\mu$ l
	$\rightarrow$ je 15µl in eine PCR-Tasche
	7. TAE-Puffer in die Laufkammer, Kamm entfernen
	8. Taschen mit 15µl Probe beschicken
	9. Stromgerät auf 90mA, 120mV für 40 min

- 5. Gel fotografieren: 1. Gel in die Kamera für PCR-Gele legen
  - 2. mit dem Programm Multianalyst das Foto bearbeiten und ausdrucken

## 7.2. Protokoll: Immunhistologische Färbung

1. Erwärmen:	Oven 30 min bei 80°C
2. Absteigende Alkoholreihe:	Xylol 10 min
	Xylol 10 min
	99% Ethanol 6 min
	90% Ethanol 6 min
	80% Ethanol 6 min
	70% Ethanol 6 min

3. Baden in Leitungswasser	6 min
4. Baden in Aqua bidest.	6 min
5. Andauung:	50mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,5);
	Verdünnung 1:20 mit Aqua bidest.
	+ 1% Proteinase K Solution $\rightarrow$ 10 min and auen
<u>6. Waschen:</u>	3 Waschschritte in TBS-Puffer jeweils10 min
7. Blocklösung:	TBS-Puffer + 5% BSA 60 min inkubieren
8. Primärantikörper:	Laminin-Antikörper-Verdünnung 1:25 mit TBS-Puffer
	Inkubation über Nacht bei 4°C
9.Waschen:	3 Waschschritte in TBS-Puffer jeweils 6 min
10. Blocklösung:	3% Ziegenserum, 0,8% BSA in TBS-Puffer
	20 min inkubieren
11. Sekundärantikörper:	Goat-Rabbit-CY3 1:2 verdünnt;
	Verdünnung 1:200 mit TBS-Puffer für 60 min im
	Dunkeln inkubieren.
12. Waschen:	3 Waschschritte in TBS-Puffer jeweils 10 min
13. Eindecken:	mit DAKO-Fluoreszent-Mounting-Medium

# 7.3 Protokoll: HE-Färbung

<u>1. Erwärmen:</u>	Oven 80°C	30 min
2. Absteigende Alkoholreihe:	Xylol	10 min
	Xylol	10 min
	99% Ethanol	6 min
	96% Ethanol	6 min
	80% Ethanol	6 min
	70% Ethanol	6 min
3. Baden in Aqua bidest.		6 min
4. Färben mit Hämalaun nach Mayer		
5. Spülen in Leitungswasser		
6. Bläuen bei fließendem Leitungswasser		
7. Färben mit 0,5% Eosin		
8. Auswaschen in Aqua bidest.		

9. Aufsteigende Alkoholreihe:	70% Ethanol	5 sec
	80% Ethanol	5 sec
	90% Ethanol	5 sec
	99% Ethanol	5 min
	99% Ethanol	5 min
	Xylol	3 min
10. Eindecken:	mit Entellan S	Schnelleindeckmittel

## 7.4 Protokoll Urinelektrophorese:

1. Choroform-Methanol-F	<u>ällung:</u>	- Zugabe 50µl Probe
		- Zugabe 200µl Methanol, vortexen
		- Zugabe 50µl Chloroform, vortexen
		- Zugabe 150µl Aqua bidest., vortexen
2. Konzentration des Prote	<u>eins:</u>	- 1 min zentrifugieren bei 14000 rpm
		- Protein befindet sich zwischen den Phasen, obere Phase
		verwerfen, ca. 1000 µl
		- Zugabe 200µl Methanol, vortexen
		- 2 min zentrifugieren bei 14000 rpm
		- Obere Phase verwerfen
		- Zugabe 200µl Methanol, vortexen
		- 2 min zentrifugieren bei 14000 rpm
		- Obere Phase verwerfen
3. Proben über Nacht im K	Kühlschra	ank belassen
4. Nächster Tag: Methano	<u>l bei geö</u>	ffneten Deckel verdampfen lassen
5. Puffer:	- Zugab	e 15µl Sample-Puffer, 1:1 mit Aqua bidest. verdünnen
6. Erwärmen:	- 5 min i	im Thermomixer bei 95°C
7. Proben auf Eis stellen		
8. Zentrifugieren:	- 1 min	bei max. Geschwindigkeit
9. Proben auf Eis stellen		

- 10. Zusammenstellen von Gel und Laufkammer, Kamm entfernen
- <u>11. Laufpuffer einfüllen:</u> Verdünnung 1:20
- 12. Taschen befüllen:- 15µl je Probe

	- 10µl Kontrolle
13. Stromgerät einschalten:	- 30 min bei 80V
	- 60 min bei 100V
14. Über Nacht in Coomassie Blu	<u>e baden</u>
15. Waschen auf dem Rotamax:	- 1. Waschschritt, 10 min
	- 2. Waschschritt, 50 min
	- 3. Waschschritt, 60 min
16 Gel einscannen und als Comp	uterdatei abspeichern

7.5 Vergleich aller Drei Reader mit dem Bland-Altman-Plot:



Mittelwert aus Reader 1 und 2



Mittelwert aus Reader 1 und 2





Mittelwert aus Reader 1 und 2



Mittelwert aus Reader 1 und 2



Mittelwert aus Reader 1 und 2



### Reder 2 vs. Reader 3: Tubulointerstitielle Fibrose

## 7.6 Urinauswertung:

Zeitpunkt der Urinabnahme	Therapie-Gruppe B	Kontroll-Gruppe B	Wildtyp
6 Wochen	0 0 0	119 234 287	24 103,5 80
Mittelwert	0	69,2	0
7,5 Wochen	525 578 138 385 358	279 766 248 0 0	0 0 0 0 0
Mittelwert	397	431	0
9,5 Wochen	940 228 0	16,1 430 600	0 0 0
Mittelwert	389,3	348,7	0

Vergleich der Proteinurie mit 6 Wochen, 7,5 Wochen und 9,5 Wochen zwischen Therapie-Gruppe B und Kontroll-Gruppe B und Wildtyp

## 7.7 Aliskiren-Serumspiegel

Maus	Konzentration ng/mL
unbehandelt	0 0
behandelt	376 235 254

TGFβ 12kD Col4A3 +/+ -/--/-Aliskiren + 12kD TGFβ Col4A3 +/+ -/--/-Aliskiren + CTGF 44kD 38kD Col4A3 +/+ -/--/-Aliskiren + CTGF 44kD 38kD Col4A3 -/-+/+ -/-Aliskiren + \_

## Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. med. O. Gross für seine Unterstützung bedanken und dafür, dass er mir das Thema dieser Dissertation zur Verfügung gestellt hat. Er war für Fragen immer gut erreichbar und hat mir mit seiner ruhigen und freundlichen Art viel Geduld erwiesen. Zudem möchte ich ihm für die Auswertung der histologischen Präparate danken.

Ebenso möchte ich Herrn PD Dr. rer. nat. R. Girgert danken. Er war stets hilfsbreit, so hat er freundlicherweise die Erstellung des Western Blots für diese Arbeit übernommen und zur Verfügung gestellt. Ebenso war er bei der Herstellung der Proteingele eine große Hilfe.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau A. Bernhard. Sie hat viel Zeit investiert, um mir verschiedene Arbeitsschritte und Vorgehensweisen im Labor näherzubringen. Dies tat sie auf eine angenehme und freundliche Art. Sie war immer sehr interessiert an meiner Arbeit und half mir ganz besonders, indem sie als einer der drei Reader die histologischen Präparate mit auswertete.

S. Koschnick und J. Reinhard danke ich für die Durchführung der Pumpenimplantation sowie für die Tötung der Mäuse.

Herrn Prof. Dr. G.A. Müller möchte ich für die Ermöglichung der Studie innerhalb seiner Abteilung danken.

Ein großes Dankeschön richte ich an meine Kritiker: I. Schuster-Theisen, M. Theisen, S. Stietz, C. Lehmann. Für die Korrektur dieser Arbeit haben sie ihre Freizeit geopfert, was keine Selbstverständlichkeit ist. Ebenso bedanke ich mich bei L. Boche, sie hat es ermöglicht, dass auch geografische Entfernungen kein Hindernis darstellten.