

Aus der Klinik für Nephrologie und Rheumatologie

(Prof. Dr.med. G. A. Müller)

im Zentrum Innere Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Neue Therapieansätze für das Alport-Syndrom:
Nephroprotektives, antifibrotisches und antiinflammatorisches
Potential von Paricalcitol additiv zu Ramipril in einem Mausmodell
für progressive Nierenfibrose**

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Henrik Robert Hiller

aus

Marburg an der Lahn

Göttingen 2014

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. O. Groß

II. Berichterstatter/in:

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Grundidee und Studiendesign	1
1.2 Der mikroskopische Aufbau der Niere	2
1.2.1 Das Nephron.....	2
1.2.2 Das tubulointerstitielle System	2
1.2.3 Die Blut-Harn-Schranke	3
1.3 Die chronische Niereninsuffizienz bei chronischer Nierenfibrose	4
1.4 Das Alport-Syndrom.....	6
1.5 Zu untersuchende Serumparameter: Harnstoff.....	7
1.6 TGF- β	8
1.7 CTGF.....	9
1.8 Der ACE-Hemmer Ramipril.....	10
1.9 Der Vitamin-D-Rezeptor-Aktivator Paricalcitol.....	11
2. Material und Methoden	15
2.1 Einführung in das tierexperimentelle Modell	15
2.1.1 Gruppeneinteilung	16
2.1.2 Bestimmung der Überlebenszeiten	17
2.1.3 Uringewinnung.....	18
2.1.4 Medikamentenbehandlung.....	18
2.2 Genotypisierung.....	19
2.2.1 DNA-Isolation aus Mäuseschwanzbiopsien	19
2.2.2 PCR	19
2.2.3 Agarose – Gelelektrophorese	20
2.3 Proteinuriebestimmung per Gelelektrophorese	21
2.3.1 Vorbereitung der Proben.....	21
2.3.2 Protein-Chloroform-Methanol-Fällung	21
2.3.3 Elektrophorese	22
2.3.4 Färbung und Auswertung.....	23
2.4 Western Blot	23

2.4.1 Anfertigen des Zelllysats	23
2.4.2 Quantitative Proteinbestimmung	23
2.4.3 Elektrophorese	24
2.4.4 Western-Blotting	24
2.4.5 Immundetektion	24
2.5 Immunhistochemie	25
2.5.1 Immunhistochemie-Score	27
2.6 Harnstoffbestimmung	30
2.7 Statistik	30
2.7.1 Boxplot	30
2.7.2 Kaplan-Meier-Schätzkurve	31
2.7.3 Kruskal-Wallis-Test	31
2.7.4 Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test mit Adjustierung des Signifikanzniveaus nach Bonferroni	31
3. Ergebnisse	31
3.1 Überlebenszeiten	32
3.1.1 Tabellarische Auflistung der Überlebenszeiten	32
3.1.2 Grafische Darstellung der Überlebenszeiten als Boxplot	33
3.1.3 Grafische Darstellung der Überlebenszeiten als Kaplan-Meier-Kurve	35
3.1.4 Kruskal-Wallis-Test	36
3.1.5 Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test	36
3.2 Proteingele	37
3.3 Westernblot / TGF- β und CTGF im Nierengewebe	43
3.4 Harnstoffwerte im Serum	46
3.5 Immunhistochemie	48
4. Diskussion	56
4.1 Zielsetzungen	56
4.2 Wirkung von Ramipril und Paricalcitol auf die Proteinurie	56
4.3 Wirkung von Ramipril und Paricalcitol auf TGF- β und CTGF im Nierengewebe	59
4.4 Wirkung von Ramipril und Paricalcitol auf die Harnstoffwerte im Serum	61
4.5 Wirkung von Ramipril und Paricalcitol auf die mikrostrukturelle Nierenmorphologie ..	62
4.6 Wirkung von Ramipril und Paricalcitol auf die Überlebenszeiten	64

<i>4.7 Fazit, Ausblick und aktueller Stand der Forschung</i>	66
<i>5. Zusammenfassung</i>	68
<i>6. Anhang Material und Methoden</i>	70
<i>7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</i>	76
<i>8. Literaturverzeichnis</i>	78

Abkürzungsverzeichnis

ACE	<i>angiotensin-converting-enzyme</i> : hier auch für Ramipril
ACE + PC	Ramipril + Paricalcitol
ARAS	autosomal-rezessives Alport-Syndrom
ARB	Angiotensin-Rezeptorblocker
AS	Alport-Syndrom
ATL	<i>animal tissue lysis</i>
AT1	Angiotensin I
BHS	Blut-Harn-Schranke
BP	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
C°	Celcius
CaSR	kalziumsensitiver Rezeptor
COL4A3	Kollagen-4- α 3
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i> (verbindender Gewebewachstumsfaktor)
d	Tage
Da	Dalton
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
ESRD	<i>end stage renal disease</i> (terminales Nierenversagen)
EZM	extrazelluläre Matrix
FWER	<i>familywise error rate</i>
g	Gramm
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GBM	glomeruläre Basalmembran
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
μ g	Mikrogramm
mg	Milligramm
ml	Milliliter
nm	Nanometer
PC	Paricalcitol
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i> (verzweigender Plättchenwachstumsfaktor)
PTH	Parathormon
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SP	Scorerpunkte
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i> (transformierender Wachstumsfaktor beta)
TBST	<i>tris-buffered saline and tween</i>
UV	ultraviolett
V	Volt
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
VDRA	Vitamin-D-Rezeptoraktivator
VDRE	<i>vitamin D response element</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
vs.	versus
W	Wochen
WT	Wildtyp
XLAS	<i>X-linked Alport-Syndrome</i> (X-chromosomal vererbtes Alport-Syndrom)

1. Einleitung

1.1 Grundidee und Studiendesign

Patienten, die am Alport-Syndrom erkranken, entwickeln durch einen genetischen Defekt des Kollagens Typ IV eine Nierenfibrose. Noch während der Adoleszenz führt die Erkrankung zum terminalen Nierenversagen.

Unsere Arbeitsgruppe etablierte die COL4A3-Knockout-Maus, die innerhalb von 10 Wochen aufgrund einer progressiven Glomerulopathie an Nierenversagen stirbt. Die Mäuse gelten als ein Modell für das humane Alport-Syndrom. Mit Hilfe dieses Modells wurden bereits antifibrotische und antiinflammatorische Effekte anderer Medikamente (ACE-Hemmer, AT1 Antagonisten etc.) beschrieben.

In dieser Arbeit sollen das nephroprotektive Potential von Paricalcitol als Monotherapie und als Dualtherapie zusammen mit Ramipril getestet und mögliche neue medikamentöse Therapieansätze bei der Behandlung des Alport-Syndroms geprüft werden.

Der nephroprotektive Effekt soll durch das Untersuchen von Überlebenszeiten, Proteinurie, Urämie und durch den Nachweis entzündungsassoziierter Proteine im Nierengewebe wie TGF- β und CTGF demonstriert werden.

Darüber hinaus sollen immunhistochemisch-histologische Untersuchungen der Nieren die beobachteten nephroprotektiven Effekte stützen.

1.2 Der mikroskopische Aufbau der Niere

1.2.1 Das Nephron

Für die Funktionalität der Niere ist der mikrostrukturelle Aufbau entscheidend. Er stellt die Basis für die Regulationsmechanismen dar, die Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Basenhaushalt sowie endokrine Funktionen kontrollieren.

Die mikroskopische Bau- und Funktionseinheit der Niere ist das Nephron, welches sich aus dem Nierenkörperchen und den sich daran anschließenden Segmenten des unverzweigten Tubulus zusammensetzt (LÜLLMANN-RAUCH 2003).

Das Nierenkörperchen besteht bei näherer Betrachtung aus dem Glomerulus, welches von der Bowman-Kapsel eingefasst wird (BULGER 1986). Vasaler Zu- und Abfluss liegen im Bereich des Gefäßpols nahe beieinander und erfolgen durch zwei Arteriolen, das Vas afferens und das Vas efferens.

Die zentrale Aufhängung der glomerulären Kapillaren erfolgt durch das Mesangium (Mesangiumzellen in Extrazellulärmatrix eingebettet), das als eine Art interkapilläres Gerüst fungiert (LÜLLMANN-RAUCH 2003).

Die Bowman-Kapsel, die den Glomerulus umgibt, besteht aus einem viszeralen und einem parietalen Blatt. Beide Blätter umschließen den Kapselraum, in dem der Primärharn aufgefangen und in den proximalen Tubulus fortgeleitet wird (BULGER 1986).

Das viszerale Blatt setzt sich aus spezialisierten Epithelzellen, den Podozyten, zusammen, die mit den Kapillarwänden der Gefäße des Glomerulus den Filter zwischen Blut- und Harnkompartiment aufspannen (LÜLLMANN-RAUCH 2003).

1.2.2 Das tubulointerstitielle System

Am Harnpol, dort wo das parietale Blatt der Bowman-Kapsel in den proximalen Tubulus übergeht, beginnt das tubulointerstitielle System der Niere.

Die Tubuli bestehen aus einschichtigem Epithel und sind in mehrere Segmente aufgeteilt, die sich durch die Morphologie der Epithelzellen und der Segmente sowie durch deren Funktionalität unterscheiden (LÜLLMANN-RAUCH 2003).

Die einzelnen Segmente werden der Reihenfolge nach von proximal nach distal als proximaler, intermediärer, distaler und Verbindungstubulus bezeichnet, die schließlich ins Sammelrohr münden.

Die Zusammensetzung des Interstitiums variiert zwischen den unterschiedlichen Baueinheiten der Niere und enthält im Bereich der Rinde besonders Fibroblasten und dendritische Zellen, im Bereich des Marks zusätzlich sulfatierte Proteoglykane sowie Prostaglandine produzierende Fetttröpfchen (BOOR et al. 2010, LÜLLMANN-RAUCH 2003). Die Sammelrohre enden schließlich im Nierenkelchsystem, welches sich in die ableitende Harnwegen fortsetzt.

1.2.3 Die Blut-Harn-Schranke

Die Aufgabe der Blut-Harn-Schranke (BHS) besteht im Filtern des Blutplasmas: große korpuskuläre Blutbestandteile werden zurückgehalten, während Wasser und kleine gelöste Teilchen die BHS passieren können.

Die BHS setzt sich aus dem Endothel der glomerulären Kapillarschlingen, der glomerulären Basalmembran (GBM) und den Podozyten bzw. dem viszeralen Blatt der Bowman-Kapsel zusammen (LÜLLMANN-RAUCH 2003).

Das Endothel ist fenestriert (50-100 nm) und besitzt kein erkennbares Diaphragma.

Die gegen das Lumen gerichtete Plasmamembran des Endothels ist mit einer dicken, negativ geladenen Glykokalyx besetzt, die auch die fenestrierten Bereiche überdeckt (BULGER 1986). Die GBM, die von Podozyten einerseits und dem Endothel der Kapillarschlingen andererseits gebildet wird, setzt sich aus drei Blättern, der Lamina densa, der Lamina rara interna sowie der Lamina rara externa zusammen (LÜLLMANN-RAUCH 2003).

Der zentral gelegenen, elektronendichten Lamina densa wird eine Barriere-Funktion zugeschrieben. Sie ist von den weniger elektronendichten Laminae rara interna (Richtung Endothel) und rara externa (Richtung Podozyten) eingefasst (PAVELKA 2005). Die GBM besteht überwiegend aus Laminin, Kollagen Typ IV, Entactin/Nidogen sowie sulfatierten Proteoglykanen (MINER 1999).

Die im Harnraum liegenden Podozyten entsenden Trabekeln gleichende Primärfortsätze Richtung GBM, von denen fingerförmige Sekundärfortsätze abgehen.

Diese verankern sich mit den Fortsätzen benachbarter Podozyten und bilden so eine fast vollständige Abdeckung gegenüber dem Harnraum: die Schlitzmembran.

Die bestehenbleibenden Zwischenräume haben eine Breite von ca. 40nm und sind durch ein Schlitzdiaphragma überbrückt. Weiterhin sind die dem Harnraum zugewandten Seiten der Podozytenfüße mit einer anionischen Glykokalyx, ähnlich der des Endothels, bedeckt (LÜLLMANN-RAUCH 2003).

Die BHS besitzt eine Größen- und Ladungsselektivität, sodass Moleküle mit einer Masse größer als 80 kDa sowie negativ geladene Proteine die Barriere nicht passieren können (KLINKE und SILBERNAGL 2004).

Albumin besitzt eine Molekülmasse von 66–69 kDa und einen Siebkoeffizienten von 0,00062, der sich aus dem Verhältnis der Albuminkonzentration im Plasma zur der im Filtrat zusammensetzt (TOJO und KINUGASA 2012).

Grund für den niedrigen Siebkoeffizienten ist eine starke negative Ladung des Albumins. Bei Molekülen gleicher Größe und mit neutraler oder positiver Ladung ist die Durchlässigkeit der Blut-Harn-Schranke höher (KLAHR et al. 1988).

Albumin, das dennoch über die glomeruläre Filtrationsbarriere gelangt, wird zu 96 % - überwiegend im proximalen Tubulus - rückresorbiert.

Proteine mit geringerer Molekularmasse werden überwiegend frei filtriert (Siebkoeffizient 0,987) und im Tubulussystem größtenteils rückresorbiert (TOJO und ENDOU 1992).

1.3 Die chronische Niereninsuffizienz bei chronischer Nierenfibrose

Die chronische Niereninsuffizienz wird durch den progredienten und irreversiblen Verlust von funktionstüchtigem Nierenparenchym ausgelöst.

Die Ätiologie der Erkrankung ist vielfältig und kann prä-, intra- oder postrenal bedingt sein. Die zu Grunde liegende Pathogenese mit der Entwicklung einer Glomerulosklerose, Tubulusatrophie und -dilatation, einer tubulointerstitiellen Fibrose sowie einer Sklerose der intrarenalen Gefäße ist jedoch dieselbe (BOOR et al. 2010, HINZ 2010). Der Verlust der exkretorischen Funktion der Nieren führt zur Akkumulation toxischer Stoffwechselprodukte in Blut und Organen, was eine Azotämie und Multiorganschäden bedingt (LOPEZ-HERNANDEZ und LOPEZ-NOVOA 2011).

Unterteilen kann man diese Erkrankungen abhängig von ihrem primären Entstehungsort in chronische Glomerulopathien und in chronische tubulointerstitielle Nephropathien.

Unabhängig davon, ob die primäre Schädigung glomerulären, tubulointerstitiellen oder vasalen Ursprunges ist, führt die chronische Niereninsuffizienz zu einer histologischen und funktionellen Veränderung des Nierengewebes mit generalisierter Fibrose, Nephronverlust und der Bildung von Narbengewebe (LOPEZ-HERNANDEZ und LOPEZ-NOVOA 2011).

Bei den Glomerulopathien ist für die Pathogenese eine Veränderung der sich im Glomerulum befindlichen Zellen ursächlich. Diese kann mit den Podozyten, den glomerulären Endothelzellen und der glomerulären Basalmembran alle Kompartimente der BHS (LOPEZ-HERNANDEZ und LOPEZ-NOVOA 2011) sowie die intraglomerulären Mesangiumzellen betreffen. Auch hier kann eine weitere Einteilung durch Morphologie und Ätiologie bzw. durch die Einteilung in primäre und sekundäre sowie proliferative und nicht proliferative Glomerulopathien erfolgen (HRICIK et al. 1998).

Abhängig vom Schweregrad der glomerulären Schädigung führt der Krankheitsprozess zu einer Beeinträchtigung der selektiven Filterfunktion und so zu einer Verminderung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) mit Proteinurie und Hämaturie (MADAIO und HARRINGTON 2001).

Der so entstehende Funktionsverlust einzelner Nephrone wird kompensatorisch durch die noch intakten Nephrone übernommen und führt bei diesen zu einer glomerulären Hyperfiltration.

Dieser physische Stressor ist als wichtiger prosklerotischer Stimulus zu werten. Der erhöhte intraglomeruläre Druck durch afferente Vasodilatation und erhöhte Wandspannung, die

dem reaktiv vergrößerten vaskulärem Radius zuzuschreiben ist, führen zur Zelldehnung und Zellschädigung. (LOPEZ-NOVOA et al. 2011)

Darüber hinaus spielen auch chemische Stimuli wie Hormone und Zytokine, welche die Glomeruli entweder über den hämatogenen Weg erreichen oder direkt von den Zielzellen im Glomerulum produziert werden, im profibrotischen und prosklerotischen Prozess eine wichtige Rolle. Dazu zählen beispielsweise Angiotensin II, TGF- β , VEGF oder auch PDGF (LOPEZ-HERNANDEZ und LOPEZ-NOVOA 2011).

Diese Stimuli verschärfen die Entstehung der Glomerulopathie sowie der sklerotischen und fibrotischen Veränderungen und führen zu einem progredienten Verlust des funktionstüchtigen Nierenparenchyms (HINZ 2010).

Der tubulointerstitielle Teil des Nierenparenchyms macht bis zu 90% des gesamten Nierenvolumens aus, sodass pathologische Veränderungen in diesem Bereich nicht ohne Folge bleiben können (STRUTZ und NEILSON 2003).

Die exzessive Ablagerung von extrazellulärer Matrix bzw. von kollagenösen Fasern ist zentraler Bestandteil der tubulointerstitiellen Fibrose (BOHLE et al. 1979) und dem Prozess einer ablaufenden Entzündungs- und Wundheilungsreaktion als Folge einer Verletzung sehr ähnlich (BOOR et al. 2010).

Durch auftretende tubuläre Schäden, beispielsweise durch einen postrenalen Harnaufstau, eine Inkubation mit zelltoxischen Substanzen oder eine persistierende Proteinurie, kommt es zu einer Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren. Diese führen wiederum zu einer vermehrten Synthese von extrazellulären Matrixproteinen im Interstitium durch Tubuluszellen (ABBATE et al. 2006, HINZ 2010).

Tubulusatrophie mit Tubulusnekrose und eine tubulointerstitielle Fibrose mit weiterer Verschlechterung der Nierenfunktion sind die Folge.

Hierbei lagern sich vornehmlich Kollagenfasern, überwiegend vom Typ I- und III-Kollagen, sowie Glykoproteine wie Fibronektin und Tenascin ab. Doch auch andere Matrix-Proteine wie Kollagen Typ IV und Laminin sind in den Zellzwischenräumen zu finden (EDDY 1996).

Üblicherweise tritt Fibronektin als eines der ersten Proteine auf. Dieses adhärenente Glykoprotein dient als Gerüst für die Anlagerung weiterer Proteine und zieht darüber hinaus Fibroblasten chemotaktisch an (EDDY 1996, KUNCIO et al. 1991).

Diese Fibroblasten wie auch Myofibroblasten, Tubulusepithelzellen und Makrophagen bilden eine reaktiv extrazelluläre Matrix und sind für die fortschreitende Fibrose verantwortlich (BOOR et al. 2010).

1.4 Das Alport-Syndrom

Das Alport-Syndrom (AS) ist eine hereditäre, progrediente, glomeruläre Nephropathie, die durch Hämaturie und Proteinurie charakterisiert ist. Weiterhin treten häufig extrarenale Manifestationen wie Innenohrschwerhörigkeit und okuläre Läsionen auf (GROSS und WEBER 2005, KASHTAN 1998 - 2013).

Die Erkrankung wurde nach ihrem Erstbeschreiber Arthur Cecil Alport (Alport, 1927) benannt.

Abhängig vom Erbgang bestehen unterschiedliche Prävalenzen für das AS.

In 85% aller Fälle liegt eine x-chromosomale Vererbung (XLAS) mit einer geschätzten Prävalenz von 1 : 5 000 vor. 10 – 15 % hingegen folgen einem autosomal rezessiven Erbgang (ARAS) mit einer geschätzten Häufigkeit von 1 : 50 000 in der Bevölkerung (GROSS und WEBER 2005). 80% der erkrankten Patienten sind männlich.

Die Ätiologie des AS ist auf eine Mutation jener Gene zurückzuführen, die für die Alphaketten α_3 , α_4 oder α_5 des Kollagens Typ IV kodieren. Beim autosomalen Erbgang sind die für die α -Ketten 3 und 4 kodierenden Gene COL4A3 und COL4A4 betroffen, während bei der x-chromosomalen Vererbung das Gen für die α -Kette 5, COL4A5, beeinträchtigt ist (HEIDET und GUBLER 2009).

Das Typ-IV-Kollagen besteht aus einer rechtsgängigen Tripelhelix, die von drei linksgängigen Kollagen- α -Ketten ($\alpha_1,2,3,4,5,6$) gebildet wird.

Das α_3 - α_4 - α_5 -Kollagen IV ist die dominierende Kollageneinheit in der glomerulären Basalmembran sowie in bestimmten Basalmembranen von Cochlea und Retina und bildet zusammen mit Laminin, Entactin/Nidogen und Proteoglykanen ein tertiäres Netzwerk (MINER 1999, RHEAULT 2012).

Durch Mutationen in den α_3 - α_4 - α_5 -Ketten des Kollagen IV und dem anschließenden Verlust oder Einbau von defekten Kollagen-IV-Ketten, kommt es zum falschen Aufbau mit Aufsplitterung und Lamellierung der GBM (GROSS und WEBER 2005). Diese Prozesse führen zur Podozytenhypertrophie, einer verdickten GBM und glomerulärer Sklerose.

Abhängig vom Schweregrad der glomerulären Schädigung führt der Krankheitsprozess zu einer Beeinträchtigung der selektiven Filterfunktion und so zu einer Verminderung der glomerulären Filtrationsrate mit Hämaturie und Proteinurie bzw. Hypoalbuminämie.

Beinahe 90% aller männlichen XLAS-Patienten haben bis zum 40. Lebensjahr das terminale Nierenversagen erreicht, während es bei den weiblichen heterozygoten XLAS-Patientinnen nur 12% sind (JAIS et al. 2003). Für am autosomalen AS erkrankte Frauen ist die Prognose jedoch ebenfalls schlecht und endet – wie bei den männlichen Erkrankten – im terminalen Nierenversagen (ESRD).

Abhängig von der Art der Mutation fällt auch der Schweregrad der Erkrankung aus. Man spricht von einer Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp (GROSS und WEBER 2005, JAIS et al. 2003).

So führen Mutationen wie *frameshift*, *large rearrangements* oder *premature stop codon*, die eine Verkürzung des betroffenen Proteins hervorrufen, signifikant früher zu ESRD als solche, die die Proteinstruktur verändern oder zu einer Glycinmutation führen (HUDSON et al. 1993).

Dadurch kann das AS in eine juvenile und eine erwachsenen Form eingeteilt werden, die sich neben dem Manifestationsalter auch in der Schwere der Symptome unterscheidet.

Dies zeigt sich beispielsweise in Form einer Innenohrschwerhörigkeit, die universell beim juvenilen Typus festgestellt werden konnte, während beim erwachsenen Typus nur die Hälfte der Patienten unter diesem Symptom zu leiden hat (WESTER et al. 1995).

1.5 Zu untersuchende Serumparameter: Harnstoff

Harnstoff ist ein 60Da großes Molekül, das bei Säugern als Endprodukt beim Proteinkatabolismus anfällt und in der Leber aus Ammoniak synthetisiert wird (SCHRIER 2007). Es handelt sich um ein ungeladenes Molekül, das leicht durch Biomembranen diffundieren kann und renal eliminiert wird.

In der Niere dient Harnstoff der Urinkonzentration und unterliegt dort einem Kreislauf zwischen Tubuli, Interstitium und Gefäßen (YANG und BANKIR 2005).

Die Harnstoffkonzentration im Blut ist von einer Vielzahl an Faktoren abhängig. Dazu zählen Ernährung, Trinkmenge, anabole bzw. katabole Stoffwechselsituationen oder die Flussgeschwindigkeit des Primärharns im proximalen Tubulus. Erst bei hohen Konzentrationen wirkt Harnstoff direkt toxisch.

Nimmt die Nierenfunktion ab, steigen die Harnstoffwerte im Blutplasma und dienen somit als Maß für das voranschreitende Nierenversagen.

Neben Harnstoff akkumulieren bei eingeschränkter Nierenfunktion auch andere, biologisch aktive Substanzen, die als urämische Toxine bezeichnet werden (VANHOLDER et al. 2008).

Demnach ist der Grad der Harnstoffclearance mit dem klinischen *outcome* bei Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen eng verbunden. Akute und große Anstiege von Serumharnstoff sind charakteristisch für das Entwickeln eines *urämischen Syndroms*, welches mit der Retention von urämischen Toxinen einhergeht (RONCO et al. 2009).

Eine Akkumulation dieser urämischen Toxine führt zur Forcierung des chronischen Nierenversagens und kann darüber hinaus auch zu kardiovaskulären und anderen Organschäden führen (LIABEUF et al. 2011).

1.6 TGF- β

TGF- β zählt zur Gruppe der Zytokine und ist in seiner Wirkungsweise multifunktionell.

Es spielt erwiesenermaßen eine große Rolle in vielen pathologischen Prozessen, die mit dem chronischen Nierenversagen vergesellschaftet sind (LOPEZ-NOVOA et al. 2011).

Die Erstbeschreibung des 25 kDa großen Homodimers erfolgte anhand seiner aktivierenden Wirkungen auf Fibroblasten in Nieren von Ratten (ROBERTS et al. 1981). Später konnte eine weitreichendere Funktionalität von TGF- β bewiesen und seine Wirkung in Abhängigkeit der Zielzelle, beispielsweise in Form von Differenzierung, Apoptose oder Überleben, gezeigt werden (MASSAGUE 1998).

Freigesetzt wird TGF- β in der Niere unter anderem durch biomechanische Belastungen des Nierenparenchyms, bei oxidativem Stress oder Angiotensin II vermittelt.

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition des Zytokins zur abgeschwächten Manifestation von renalen Schäden führt, während die Überexpression eine Nierenfibrose bewirkt (KOPP et al. 1996, MOZES et al. 1999, SCHNAPER et al. 2009).

Die physiologische und pathologische Wirkungsweise von TGF- β wird durch die Stimulation von bestimmten oberflächlichen membranassoziierten Rezeptoren in den Zielzellen vermittelt.

In Glomerulopathien spielt TGF- β eine entscheidende Rolle beim Verlust von Podozyten, die einen wichtigen Teil der Blutharnschanke bilden, indem es deren Apoptose induziert. Weiterhin führt es auch zu einer Ablösung der Podozyten von der glomerulären Basalmembran sowie zu einer Mehrproduktion von VEGF, was die Bildung von Kollagen-4-alpha-3 und eine Verdickung der Basalmembran bedingt (CHEN et al. 2000, LOPEZ-HERNANDEZ und LOPEZ-NOVOA 2011, REGOLI und BENDAYAN 1997, SCHIFFER et al. 2001).

Auch im Bereich der Mesangiumzellen führen Stressoren wie mechanische Belastung über mehrstufige Signaltransduktionswege zur Freisetzung von TGF- β (GRUDEN et al. 2000).

Vermittelt über eine Interaktion mit CTGF führt TGF- β dann bei den Mesangiumzellen zu einer Hypertrophie und Proliferation sowie zur vermehrten Synthese und Ablagerung von extrazellulären Matrixproteinen. Dies beinhaltet sowohl die Produktion von Kollagen Typ I und IV als auch die der Glykoproteine Laminin und Fibronectin (RODRIGUEZ-BARBERO et al. 2006). Auch im Bereich der glomerulären Endothelzellen, die eine wichtige Aufgabe beim Aufrechterhalten der glomerulären Filtrationsbarriere innehaben, reguliert TGF- β endotheliale Funktionen wie Proliferation, Migration und Apoptose (LEBRIN et al. 2005).

Im tubulointerstitiellen System nimmt TGF- β Schlüsselrollen bei pathologischen Prozessen wie interstitieller Fibrose, Tubulusatrophie und -apoptose, extrazellulärer Matrixakkumulation (EZM) oder beim epithelialen Zelltod und Proliferation ein (GARCIA-SANCHEZ et al. 2010, LOPEZ-HERNANDEZ und LOPEZ-NOVOA 2011).

Ähnlich den Glomerulopathien werden geschädigte Tubuluszellen von TGF- β und anderen Wachstumsfaktoren aktiviert, um eine inflammatorische Antwort auszulösen.

Diese Antwort in Form von inflammatorischen Zytokinen aktiviert im Gegenzug wiederum Tubuluszellen, Fibroblasten und Myofibroblasten zur EZM-Produktion und verstärkt dadurch die tubulointerstitielle Fibrose und den tubulären Schaden (TAMAKI und OKUDA 2003).

Im Rahmen dieser Entzündungsreaktion werden von den betroffenen somatischen Zellen erneut TGF- β und andere Zytokine ausgeschüttet, die abermals Fibroblasten stimulieren und Makrophagen aktivieren, welche durch die Sekretion proapoptotischer Proteine erneute Zellschäden in den Tubuli hervorrufen (STRUTZ und NEILSON 2003).

Endstrecke dieses Prozesses ist die intrarenale Narbenbildung, bei der verlorene Strukturen oder Gewebe durch abnorme Produktion von EZM ersetzt werden.

Dennoch, gerade unter pathophysiologischen Gesichtspunkten kann die Aktivierung von TGF- β als eine Art Auto-Reparatur-Antwort des Körpers auf Verletzungen des Nierenparenchyms verstanden werden, die bei Dysregulation zum Voranschreiten des Schadens durch die oben genannten Pathomechanismen führen kann (LOPEZ-HERNANDEZ und LOPEZ-NOVOA 2011, MASSAGUE 1990).

1.7 CTGF

CTGF (Connective Tissue Groth Factor) ist ein 38 kDa großes Protein, das bei fibroseassoziierten pathologischen Vorgängen (z.B. Atherosklerose, Lungen- oder Nierenfibrose) gebildet wird und bei dabei ablaufenden biologischen Prozessen wie Zellzyklusregulationen, Apoptose oder Angiogenese eine wichtige Rolle spielt.

Die Bildung und Sezernierung von CTGF findet in den jeweiligen Zielgeweben durch spezialisierte Zelltypen statt und unterliegt einem äußerst komplexen Regulationsmechanismus (PHANISH et al. 2010, SANCHEZ-LOPEZ et al. 2009).

In der Niere wird die CTGF-Produktion von Mesangiumzellen und Tubulusepithelzellen durch gerichtete Stimulation von TGF- β oder Angiotensin II über Protein-Signalkaskaden – jedoch auch durch unspezifische Stimuli wie erhöhte Glucosespiegel und mechanischen oder oxidativen Stress – getriggert. In der gesunden Niere kommt CTGF kaum vor.

Erhöhte CTGF-Spiegel führen zur Nierenfibrose und einer Entzündungsreaktion (SANCHEZ-LOPEZ et al. 2009).

Zwischen TGF- β und CTGF besteht ein starker Synergismus: die Produktion von CTGF wird durch TGF- β induziert. Anschließend kann sich CTGF direkt an TGF- β binden und so dessen Affinität für die TGF- β assoziierten Rezeptoren erhöhen. Eine intensivierte und prolongierte Antwort an diesen Zielzellen ist die Folge. Darüber hinaus führt die endogene durch TGF- β getriggerte Produktion von CTGF über eine transkriptionelle Suppression spezifischer intrazellulärer Proteine (SMAD) zu einer Inhibition der Rückkopplungskontrolle von TGF (LEE et al. 2004).

1.8 Der ACE-Hemmer Ramipril

Ramipril ist ein Medikament aus der Gruppe der ACE-Hemmer (*Angiotensin-Converting-Enzyme-Hemmer*) und findet beim Menschen Anwendung zur Therapie bei Hypertonie, symptomatischer Herzinsuffizienz, Nephropathien sowie zur Prävention bei kardiovaskulären Erkrankungen.

Der Angriffspunkt des Ramiprils liegt im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), einem Hormonsystem, welches unter physiologischen Bedingungen der Regulation von Blutdruck und Wasserbilanz im Körper dient (HERDEGEN 2008).

Bei vermindertem intravasalem Volumen wird das Hormon Renin vom juxtaglomerulären Apparat endokrin sezerniert. Renin triggert anschließend die Umwandlung von Angiotensinogen in Angiotensin I, welches dann über das in den Lungen produzierte *angiotensin converting enzyme* in Angiotensin II überführt wird (HERDEGEN 2008).

Das ACE katalysiert weiterhin einen Abbau des vasodilatatorisch wirksamen Bradykinin, während Angiotensin II direkt vasokonstriktorisch wirksam ist und darüber hinaus über die Freisetzung von Aldosteron und damit über eine Natriumretention zur Erhöhung des intravasalen Volumens führt (SIRAGY und CAREY 2010).

Allerdings spielt Hypertonie in den ersten 15 Lebensjahren bei Alport-Patienten hinsichtlich der Nierenfibrose nur eine untergeordnete Rolle (GROSS et al. 2002). Auch die in dieser Arbeit untersuchten COL4A3-Knockout-Mäuse leiden an einer nicht hypertensiven, progredienten Nierenfibrose, sodass vielmehr die anti-fibrotischen als die anti-hypertensiven Eigenschaften von Ramipril von Bedeutung sind (GROSS et al. 2004).

Neben den genannten hämodynamischen Eigenschaften ist Angiotensin II auch proliferativ wirksam, indem es Fibroblasten aktiviert, die zu einer verstärkten Synthese von Matrixproteinen führen. Außerdem aktiviert Angiotensin II mononukleare Zellen und erhöht proinflammatorische Mediatoren (MEZZANO et al. 2001).

Ramipril wird nach oraler Aufnahme im Magen-Darm-Trakt schnell resorbiert. Die Resorption verläuft weitestgehend unabhängig von vorher aufgenommener Nahrung und die orale Bioverfügbarkeit beträgt 44 - 66% (HARAHAP Y 2009).

Bei Ramipril handelt es sich um ein Prodrug, das durch Metabolisierung in der Leber in den aktiven Metaboliten Ramiprilat umgewandelt wird (VAN GRIENSVEN et al. 1995).

Das Ramiprilat hemmt das Enzym Dipetidylcarboxypeptidase, welches auch als *angiotensin converting enzyme* bekannt ist.

In einer Vielzahl von Studien wurde das nephroprotektive und antifibrotische Potential von ACE-Hemmern in Nephropathien untersucht (GROSS et al. 2003, GROSS et al. 2012a, GROSS et al. 2004).

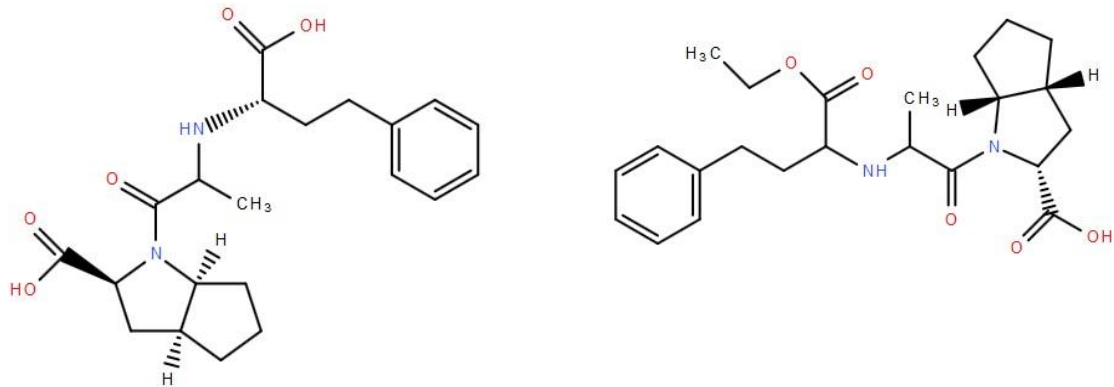


Abbildung 1: Strukturformel von Ramipril (li) und Ramiprilat (re)

In diesen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Ramiprilbehandlung bei am Alport-Syndrom erkrankten Mäusen die Überlebensdauer signifikant verlängert. Darüber hinaus konnte in retrospektiven Studien nachgewiesen werden, dass die ACE-Therapie bei Alport-Patienten die Manifestation eines terminalen Nierenversagens verzögert (GROSS et al. 2012b).

In dieser Arbeit soll das nephroprotektorische Potential von Ramipril mit dem von Paricalcitol hinsichtlich einer Nierenfibrose verglichen werden. Zusätzlich wird die Kombination beider Medikamente untersucht.

1.9 Der Vitamin-D-Rezeptor-Aktivator Paricalcitol

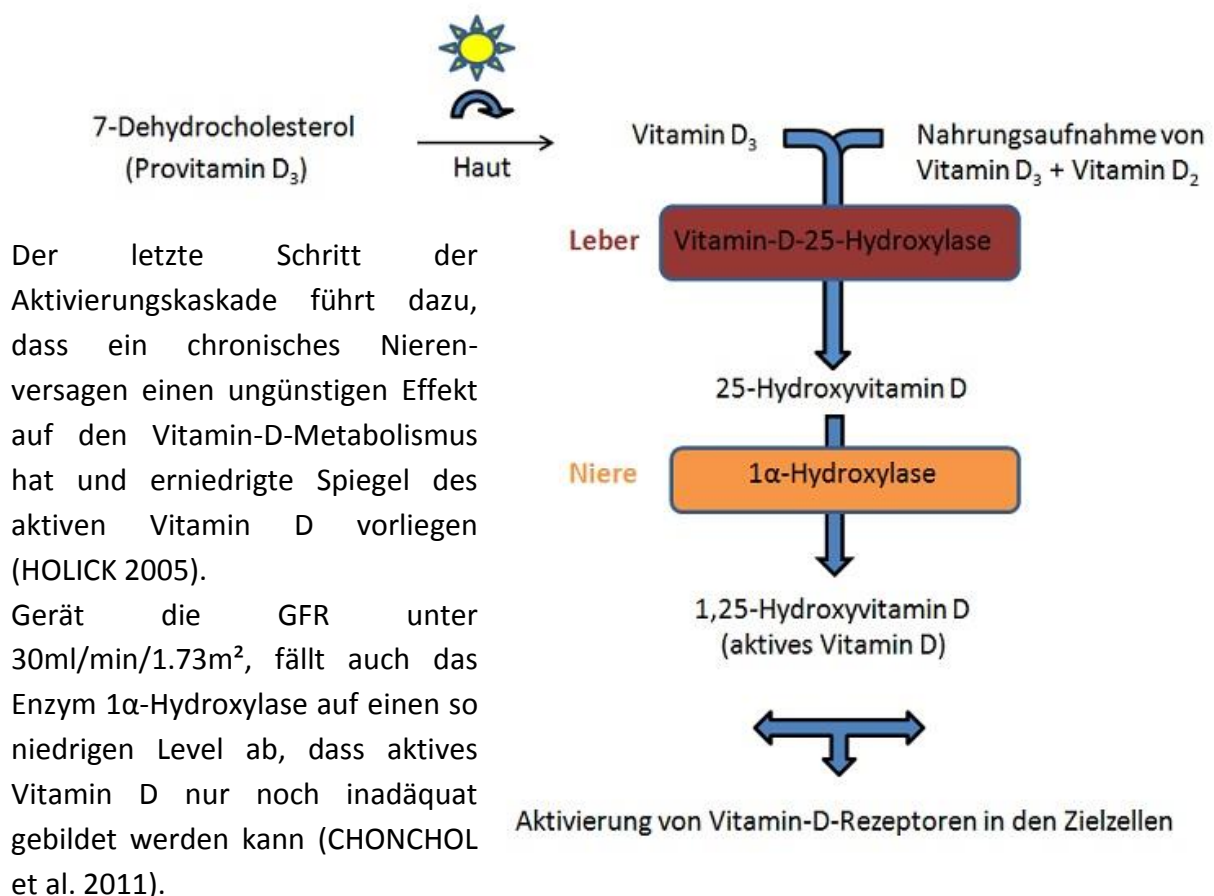
Der Vitamin-D-Metabolismus ist sehr komplex. Im Gegensatz zu vielen anderen Vitaminen ist eine orale Nahrungsaufnahme von Vitamin D beim Menschen nicht essentiell, da meistens eine ausreichende Sonnenlichtexposition vorhanden ist.

Der aktive Metabolit 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (Calcitriol) ist an einer Vielzahl biologischer Prozesse wie der Zellproliferation und -differenzierung, der Kalzium- und Phosphorhämostase und Immunmodulation im Körper beteiligt. Vitamin-D-Rezeptoren (VDR) finden sich außerdem in vielen Geweben des menschlichen Körpers wie Niere, Skelettmuskel, Gehirn, Prostata, Brust und Colon (ANDRESS 2007, ANKER und VON HAEHLING 2012, TAN et al. 2007).

Beim VDR handelt es sich um einen liganden-abhängigen Transkriptionsfaktor. Nach der Aktivierung durch seinen Liganden (Vitamin D) formt der VDR einen heterodimeren Komplex mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) und bindet anschließend an das so genannte „vitamin D response element“ (VDRE).

Das VDRE ist eine spezifische Nukleotidsequenz, die an der Promotorregion der entsprechenden Ziel-Gene lokalisiert ist und nach Aktivierung die Transkription dieser Gene auslöst (TAN et al. 2006).

Vitamin D₃ wird in der Haut des Menschen mit Hilfe von UV-Licht aus einer Vitaminvorstufe, dem 7-Dehydrocholesterol, gebildet und anschließend über ein vitaminbindendes Protein zur Leber transportiert. Mit der Nahrung aufgenommenes Vitamin D₃ (Cholecalciferol) oder Vitamin D₂ (Ergocalciferol) wird, nach dem es resorbiert wurde, ebenfalls zur Leber transportiert und über die D-25-Hydroxylase der Leber zu 25-Hydroxyvitamin-D hydroxyliert. Die Bildung des biologisch aktiven Vitamin D (Calcitriol) erfolgt dann durch eine erneute Hydroxylierung durch die 1 α -Hydroxylase in den proximalen Tubuluszellen der Niere. (SIEGENTHALER und BLUM 2006)



Demzufolge resultiert aus einer Dysfunktion – bzw. dem Parenchymverlust des proximalen Tubulusepithels – ein Defizit in der Produktion von aktivem Vitamin D₃ wie auch ein Verlust von VDR im Nierenparenchym (TAN et al. 2006). Die hierdurch ausgelöste Hypokalzämie führt zu einem sekundären Hyperparathyreoidismus mit renaler Osteopathie und Hyperphosphatämie.

Die Substitution von aktiven Vitamin-D₃-Präparaten bietet bei diesem Krankheitsbild daher einen vielversprechenden Forschungsansatz.

In einer Vielzahl von Studien wurde aus diesem Grund eine Substitution mit Calcitriol bei chronischen Nierenerkrankungen untersucht. Es zeigten sich verbesserte Nierenfunktionen durch verringerte Albuminurie, verringertes Serumkreatinin, abgeschwächte Glomerulosklerose sowie eine Eindämmung der glomerulären Proliferation (HIRATA et al. 2002, KUHLMANN et al. 2004, SCHWARZ et al. 1998).

Die in dieser Arbeit zu untersuchende Substanz Paricalcitol gehört zur Gruppe der selektiven Vitamin-D-Rezeptor-Aktivatoren und ist am Menschen zur Prävention und Therapie eines sekundären Hyperparathyreoidismus, assoziiert mit chronischer Niereninsuffizienz bei chronischem Nierenversagen, zugelassen.

Chemisch betrachtet handelt es sich um ein synthetisches, biologisch aktives Vitamin-D-Analogon von Calcitriol.

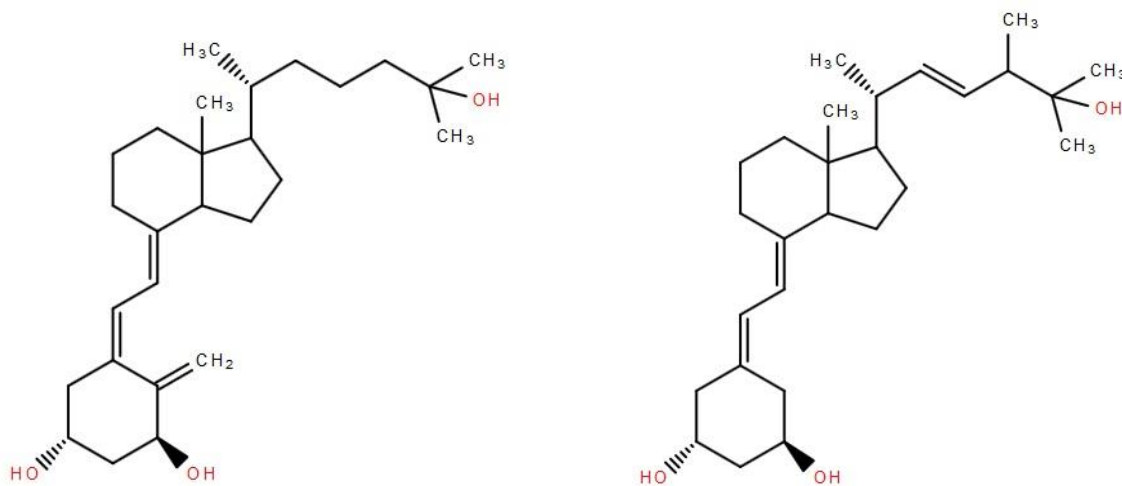


Abbildung 3: Strukturformel von Calcitriol (li) und Paricalcitol (re) im Vergleich

Im Vergleich zum Calcitriol liegt eine Modifikation der Seitenkette (D₂) und des A (19-nor) Rings vor.

Im Gegensatz zu Calcitriol ist Paricalcitol ein selektiver Aktivator des VDR und reguliert VDR und kalziumsensitive Rezeptoren (CaSR) in der Nebenschilddrüse nach oben, ohne dabei VDR im Intestinum und Knochen wesentlich zu beeinflussen.

Folglich ist Paricalcitol weniger aktiv bezüglich der Knochenresorption und senkt über eine Inhibition der Nebenschilddrüsenproliferation den Parathormonspiegel (PTH) (FINCH et al. 1999, LUND et al. 2010).

Klinisch machte sich dies in Studien durch eine schnellere Absenkung des PTH-Niveaus und weniger hyperkalzämischen Episoden mit erhöhtem Kalzium-Phosphat-Produkt im Vergleich zu Calcitriol bemerkbar (SLATOPOLSKY et al. 2002, SPRAGUE et al. 2003).

Durch die geringere Kalzämie und Phosphatämie wurde in jüngsten Studien ein besseres *outcome* bei Paricalcitol- gegenüber Calcitriolbehandlung deutlich (ANDRESS 2007, PATEL und SINGH 2009).

Im Nierengewebe führt Paricalcitol ebenfalls zu einer Aktivierung und Hochregulierung von VDR, was eine Aufrechterhaltung der Vitamin-D-getriggerten Effekte ermöglicht.

In tierexperimentellen Untersuchungen mit obstruktiven Nephropathien konnte gezeigt werden, dass bei Gabe von Paricalcitol weniger fibrotische Läsionen, bedingt durch vermindertes interstitielles Volumen und verminderte Ablagerungen interstitieller Matrixkomponenten, auftreten. (TAN et al. 2006).

In der Folge waren Senkungen der Level von Fibronectin, Kollagen Typ I und III sowie von TGF- β , bei gleichzeitiger Erhaltung der Vitamin-D-Rezeptoren erkennbar.

In dieser Arbeit soll das nephroprotektorische Potential von Paricalcitol mit dem von Ramipril hinsichtlich einer Nierenfibrose bei am AS erkrankten Mäusen verglichen werden. Zusätzlich soll die Kombination beider Medikamente untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Einführung in das tierexperimentelle Modell

In dieser Studie wurde die svj129-Maus mit einem Knockout des Kollagen-4-A3-Gens als Modell für am Alport-Syndrom erkrankte Patienten gewählt, um die nephroprotektiven Effekte der Substanzen Ramipril und Paricalcitol auf die Nieren zu untersuchen.

Die COL4A3-Knockout-Maus, die unbehandelt innerhalb von 10 Wochen am Nierenversagen stirbt, ist als ein Modell für das humane Alport-Syndrom in mehreren Studien etabliert worden:

Der Phänotyp der svj129-Mäuse entspricht mit den Symptomen einer Glomerulonephritis mit Mikrohämaturie und Proteinurie sowie dem Entwickeln eines terminalen Nierenversagens ohne hypertensive Komponente dem des Alport-Syndroms beim Menschen (COSGROVE et al. 1996).

Darüber hinaus konnten GROSS et al. (2005) in einer Studie zeigen, dass entscheidende Schritte in der Pathogenese der Erkrankung der COL4A3-Knockout-Maus denen des humanen Alport-Syndroms gleichen. Im Einzelnen waren dies der fehlende Einbau $\alpha 3$, $\alpha 4$ und $\alpha 5$ Ketten des Kollagen Typ IV, die Aufsplitterung und Verbreiterung der GBM, Podozytenaktivierung, tubulointerstitielle Matrixakkumulation und die Akkumulation und Aktivierung von Fibroblasten.

Die Mäuse wurden in einer pathogenarmen Umgebung gemäß den geltenden Tierschutzbestimmungen gehalten und behandelt. Die Ernährung der Tiere erfolgte mit dem Futter *R/M-H (V153x)* der Firma *Snniff* mit folgender Zusammensetzung:

Rohprotein: 19%

Rohfett: 3,3%

Rohfaser: 4,9%

Trockensubstanz: 72,8%

Für die Versuchstiere lag eine Genehmigung mit der Tierversuchsantragsnummer G10/163 vor.

2.1.1 Gruppeneinteilung

In der Studie wurden insgesamt 116 Mäuse vom Typ svj129 behandelt und untersucht. Davon hatten 32 Mäuse den Genotyp eines Wildtyps und 84 wiesen als Genotyp einen homozygoten COL4A3-Knockout auf.

Die Einteilung in die Behandlungsgruppen wurde wie folgt vorgenommen:

- **16 Wildtyp-Mäuse, Placebobehandlung:** Unterteilung in vier Gruppen je vier Tiere mit Tötung nach 4.5, 6, 7.5 und 9.5 Wochen.
Bis zum Todeszeitpunkt wurde den Mäusen nach 4.5, 6, 7.5 und 9.5 Wochen Urin abgenommen.
- **16 Wildtyp-Mäuse, Ramipril-Behandlung :** Unterteilung in vier Gruppen je vier Tiere mit Tötung nach 4.5, 6, 7.5 und 9.5 Wochen.
Bis zum Todeszeitpunkt wurde den Mäusen nach 4.5, 6, 7.5 und 9.5 Wochen Urin abgenommen.
- **24 Mäuse mit einem homozygoten Knockout des COL4A3-Gens, Placebobehandlung:** Unterteilung in fünf Gruppen. 16 Mäuse waren in vier Gruppen zu je vier Tieren eingeteilt, die, anhängig von der Gruppennummer, nach 4.5, 6, 7.5 oder 9.5 Wochen getötet wurden.
8 Mäuse befanden sich in der Überlebensgruppe, von denen nach 4.5, 6, 7.5 und 9.5 Wochen Urin abgenommen wurde und deren natürlicher Todeszeitpunkt bzw. die Überlebenszeit festgehalten wurde.
- **34 Mäuse mit einem homozygoten Knockout des COL4A3-Gens, Ramipril-Behandlung:**
Unterteilung in fünf Gruppen. 24 Mäuse waren in vier Gruppen zu je sechs Tieren eingeteilt, die, anhängig von der Gruppennummer, nach 4.5, 6, 7.5 oder 9.5 Wochen getötet wurden.
10 Mäuse befanden sich in der Überlebensgruppe, von denen nach 4.5, 6, 7.5 und 9.5 Wochen Urin abgenommen wurde und deren natürlicher Todeszeitpunkt bzw. die Überlebenszeit festgehalten wurde.
- **12 Mäuse mit einem homozygoten Knockout des COL4A3-Gens, Paricalcitol-Behandlung:**
Unterteilung in zwei Gruppen. Vier Mäuse wurden nach 9.5 Wochen getötet. Die weiteren acht Mäuse befanden sich in der Überlebensgruppe, von denen nach 4.5, 6, 7.5 und 9.5 Wochen Urin abgenommen wurde und deren natürlicher Todeszeitpunkt bzw. die Überlebenszeit festgehalten wurde.
- **14 Mäuse mit einem homozygoten Knockout des COL4A3-Gens, Paricalcitol-Ramipril-Behandlung:**
Unterteilung in zwei Gruppen. Sechs Mäuse wurden nach 9.5 Wochen getötet. Die weiteren acht Mäuse befanden sich in der Überlebensgruppe, von denen nach 4.5, 6, 7.5 und 9.5 Wochen Urin abgenommen wurde und deren natürlicher Todeszeitpunkt bzw. die Überlebenszeit festgehalten wurde.

Der Urin der Mäuse wurde zur Bestimmung der Proteinurie mittels Gelelektrophorese genutzt.

Den getöteten Mäusen wurden Blut bzw. Serum zur Harnstoffbestimmung sowie Urin zur Proteinbestimmung abgenommen. Anschließend wurden die Tiere nephrektomiert, um eine Histologie der Nieren durchführen zu können.

Genotyp	Wildtyp	Wildtyp	COL4A3 Knockout	COL4A3 Knockout	COL4A3 Knockout	COL4A3 Knockout
Behandlung	Placebo	Ramipril	Placebo	Ramipril	Paricalcitol	Paricalcitol + Ramipril
Tötungsgruppe 4.5 Wochen	4 Tiere	4 Tiere	4 Tiere	6 Tiere	-	-
Tötungsgruppe 6 Wochen	4 Tiere	4 Tiere	4 Tiere	6 Tiere	-	-
Tötungsgruppe 7.5 Wochen	4 Tiere	4 Tiere	4 Tiere	6 Tiere	-	-
Tötungsgruppe 9.5 Wochen	4 Tiere	4 Tiere	4 Tiere	6 Tiere	4 Tiere	4 Tiere
Überlebensgruppe	-	-	8 Tiere	10 Tiere	8 Tiere	8 Tiere

Tabelle 1: Gruppeneinteilung

Bei **gelb** markierten Tieren erfolgten Urinentnahmen abhängig von ihrer Gruppeneinteilung bzw. nach 4.5, 6, 7.5 und 9.5 Wochen

2.1.2 Bestimmung der Überlebenszeiten

Zur Bestimmung der Überlebenszeiten wurden insgesamt 32 Tiere untersucht. Alle 32 Tiere besaßen einen homozygoten Knockout für das COL4A3-Gen. Die Versuchstiere wurden in 4 unterschiedliche Behandlungsgruppen zu je 8 Tieren aufgeteilt und ihre natürlichen Todeszeitpunkte festgehalten.

Die Gruppeneinteilung wurde wie folgt vorgenommen:

Anzahl der Tiere	Genotyp	Behandlung
8	COL4A3 Knockout	-
8	COL4A3 Knockout	Paricalcitol
8	COL4A3 Knockout	Ramipril
8	COL4A3 Knockout	Ramipril + Paricalcitol

Tabelle 2: Einteilung der Überlebensgruppen

2.1.3 Uringewinnung

Zur Uringewinnung wurden die entsprechenden Mäuse unter eine desinfizierte Sterilbank mit laufendem Abzug gesetzt. Durch die manuelle Fixierung der Mäuse mit der rechten Hand und eine Manipulation der Harnblase mittels der linken Hand, konnte eine reflektorische Entleerung der Harnblase erreicht werden.

Der Urin wurde im Anschluss durch eine Pipette in vorher beschriftete Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei -30°C für die spätere Verwendung zur Bestimmung der Proteinurie tiefgefroren.

2.1.4 Medikamentenbehandlung

Mit der Ramipril-Behandlung der Mäuse wurde ab Woche 4.5 begonnen. Das Medikament wurde per os über das Trinkwasser mit einer Konzentration von 2,5mg / Liter verabreicht.

Dazu wurden 40mg des in Pulverform vorliegenden Ramiprils in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, anschließend mit 1ml Ethanol versetzt und so lange vermischt, bis eine homogene Lösung entstand.

Dieses wurde dann in einer Glasflasche auf ein Volumen von einem Liter mit Leitungswasser verdünnt.

Die 250 ml fassenden Trinkwasserflaschen der Mäuse wurden dreimal wöchentlich (montags, mittwochs und freitags) mit frischem Ramipril-versetztem Wasser neu aufgefüllt.

Die Paricalcitol-Behandlung der Mäuse wurde ab der sechsten Woche begonnen und fünfmal pro Woche (Mo. – Fr.) durchgeführt. Die Behandlung endete in der zwölften Woche oder vorzeitig bei Tod der entsprechenden Maus.

Das Medikament wurde intraperitoneal per Bauchspritze mit einer Konzentration von 0,05 µg / kg verabreicht.

Um eine Überdosierung zu vermeiden, wurden nur solche Mäuse in die Behandlungsgruppe aufgenommen, die ein minimales Gewicht von 20g vorwiesen.

Die Dosis entsprach somit bei einer 20g schweren Maus einer Menge von 0,001 µg Paricalcitol pro Tag.

Dazu wurde eine Stammlösung aus in Ethanol gelöstem Paricalcitol mit einer Konzentration von 2000 µg Paricalcitol / ml angesetzt. Um die Injektionslösung mit einem Volumen von 5ml und einer Konzentration von 0,02 µg / ml zu erhalten, wurden erneut 0,05 µl der Stammlösung auf 250 µl Ethanol verdünnt und anschließend mit 4,75 ml 0,9 prozentiger Kochsalzlösung vermischt.

Die Spritzen zur intraperitonealen Injektion wurden täglich neu und unter sterilen Bedingungen präpariert.

In jede Spritze wurden 50 µl der Injektionslösung aufgezogen und den Mäusen injiziert.

2.2 Genotypisierung

2.2.1 DNA-Isolation aus Mäuseschwanzbiopsien

Die DNA Präparation wurde mit dem *DNeasy® Blood & Tissue Kit* von der Firma *Qiagen* durchgeführt.

Die Isolation erfolgte nach dem *Qiagen Spin - Column Protokoll for Purification of total DNA from animal Tissues*.

Zur DNA-Isolation wurde den Mäusen am distalen Ende ihres Schwanzes ein ungefähr 2-3 mm langes Biopsat entnommen und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt.

Diese Biopsien wurden dann mit je 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Preproteinase K zum Andauen über Nacht bei 56°C inkubiert und am darauf folgenden Tag zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt.

Im Anschluss wurden die Proben mit je 200 µl AL-Puffer und 100% Ethanol versetzt und das Gemisch auf eine Säule aufgetragen.

Der Ansatz wurde eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Durchfluss verworfen und auf die Säule wurden 500 µl AW1 Puffer pipettiert und wiederholt für eine Minute mit 8000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut verworfen und die Probe mit 500 µl AW2-Puffer versetzt und bei 13.500 rpm für drei Minuten zentrifugiert.

Zum letzten Schritt wurde die Säule auf einen neuen Durchfluss gesetzt und für eine Minute mit 200 µl AE-Puffer inkubiert. Anschließend wurde die Probe nochmals eine Minute lang bei 8000 rpm zentrifugiert.

Die isolierte DNA konnte nun im nächsten Schritt zur PCR genutzt werden.

2.2.2 PCR

Die PCR zum Untersuchen des COL4A3-Gens wurde in einem Volumen von 25 µl angesetzt.

Der PCR-Mix bestand aus folgenden Komponenten:

- 10 µl DNA
- 0,5 µl Col4A3 forward primer (5'-CCA-GGC-TTA-AAG-GGA-AAT-CC-3') / 20pM
- 0,5 µl Col4A3 reverse primer (5'-CCT-GCT-AAT-ATA-GGG-TTC-GAG-A-3') / 20pM
- 0,5 µl Col4A3 mutant primer (5'-AAT-CGC-CAA-TGA-CAA-GAC-G-3') / 20pM
- 0,2 µl Taq Polymerase (F-100, Biozym)
- 2,5 µl 10X PCR-Puffer
- 0,5 µl Nukleotide dATP, dGTP, dCTP, dTTP (10mM)
- 10,3 µl dH₂O

Die Amplifizierung der DNA im Thermocycler lief nach dem folgenden Protokoll ab:

- 1.) 95°C - 4 Minuten
 - 2.) 64°C - 1 Minute
 - 3.) 72°C - 2,5 Minuten
 - 4.) 95°C - 1 Minute
 - 5.) 62°C - 1 Minute
 - 6.) 72°C - 2 Minuten
 - 7.) 95°C - 1 Minute
 - 8.) 60°C - 1 Minute
 - 9.) 72°C - 2 Minuten
 - 10.) 95°C - 1 Minute
 - 11.) 58°C - 1 Minute
 - 12.) 72°C - 5 Minuten
-
- The diagram shows three cycles of steps 4-6, steps 7-8, and steps 9-11, each repeated a certain number of times. The first cycle (steps 4-6) is repeated 3 times (x3). The second cycle (steps 7-8) is repeated 3 times (x3). The third cycle (steps 9-11) is repeated 4 times (x4).

2.2.3 Agarose – Gelelektrophorese

Um das benötigte 1.5% Agarose-Gel herzustellen, wurde die entsprechende Menge Agarose mit TAE-Puffer aufgekocht, 10 µL 0.6%-Ethidiumbromid pro 30 mL TAE-Puffer beigemischt und in eine 16-well Elektrophorese-Kammer gegossen.

Nachdem das Gel gefestigt war, wurden pro Well 10 µL des entsprechenden PCR-Produkts mit jeweils 2 µL des Probenpuffers vermischt und auf das Gel aufgetragen.

Anschließend erfolgte die Auftrennung, indem die Gele für 60 Minuten an eine Spannungsquelle mit 70 V angeschlossen wurden.

Die Detektion der Banden und die Bestimmung des Genotyps erfolgten unter UV-Licht mit Hilfe des BioDoc Analyze.

Die Größe des zu untersuchenden COL4A3-Gens verhielt sich wie folgt (siehe Abb. 5):

- Wildtyp 950 BP
 - Mutation 1050 BP
-
- Beim Vorliegen beider Banden ist das Tier heterozygot für den COL4A3-Knockout (-/+)
 - Beim alleinigen Vorliegen der unteren Bande (950BP) hat das Tier den Genotypen eines Wildtyps (+/+)
 - Beim alleinigen Vorliegen der oberen Bande (1050BP) ist das Tier homozygot für den COL4A3-Knockout (-/-)

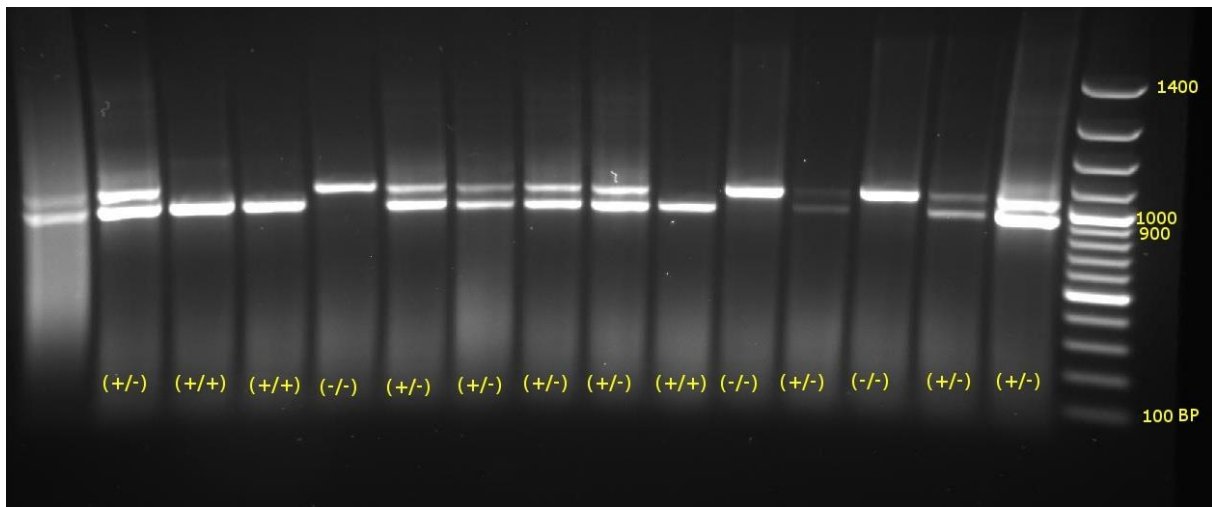


Abbildung 4: Bandenmuster bei Genotypisierung

2.3 Proteinuriebestimmung per Gelelektrophorese

2.3.1 Vorbereitung der Proben

Zu Beginn wurden die benötigten Urinproben aufgetaut und eine Minute bei 14000 rpm zentrifugiert, sodass Verunreinigungen vom restlichen Urin getrennt werden konnten. Anschließend wurden 20 µl Urin je Probe in vorbereitete Eppendorf-Gefäße (1,5ml) pipettiert.

2.3.2 Protein-Chloroform-Methanol-Fällung

Zu den jeweiligen Proben wurden nacheinander 80 µl destilliertes Wasser und 400 µl Methanol gegeben und damit vermischt. Anschließend wurden 100 µl Chloroform und 300 µl destilliertes Wasser hinzugefügt und durchmischt.

Dann wurden die Proben eine Minute lang bei 14000 rpm zentrifugiert, mit dem Resultat, dass sich in den Eppendorf-Gefäßen zwei Phasen bildeten, zwischen denen sich das Protein als Pallet befand.

Im Anschluss daran wurde die obere Phase abgenommen und verworfen.

Im nächsten Schritt wurden die Proben gewaschen, indem 400 µl Methanol hinzu pipettiert und mit der übrig gebliebenen unteren Phase sowie dem Protein-Pallet durchmischt wurden. Daraufhin wurden die Proben wieder bei 14000 rpm für zwei Minuten zentrifugiert, sodass sich im Anschluss das Proteinpallet auf dem Boden des Eppendorf-Gefäßes befand. Der Überstand wurde abpipettiert und die Probe nochmals mit 400 µl Methanol gewaschen, durchmischt und bei 14000 rpm für zwei Minuten zentrifugiert.

Nachdem der Überstand verworfen worden war, konnten die noch feuchten übergebliebenen Proteinpellets im Luftstrom unter einer Sterilbank getrocknet werden (ca. 45 Minuten.)

2.3.3 Elektrophorese

Nachdem die Proben getrocknet waren, wurden 15 µl des Probenpuffers – 1:1 mit destilliertem Wasser verdünnt – hinzugegeben und mit dem Protein vermischt.

Die durchmischten Proben wurden dann bei 95°C für fünf Minuten auf einer Wärmeplatte denaturiert und anschließend für 3 Minuten auf Eis gestellt.

Die Elektrophoresekammer wurde vorbereitet, die 4-12% TG 1,5mm Tris-Glycin-Gele eingesetzt und die Kammer zwischen beiden Gelplatten zu $\frac{3}{4}$ mit Laufpuffer gefüllt. Bei dichtem Verschluss wurde auch der Rest der Elektrophoresekammer zu $\frac{2}{3}$ mit Laufpuffer aufgefüllt.

Nach dem Ziehen der Kämme der Tris-Glycin-Gele wurde in die erste Tasche 10 µl des Molekulargewichtsmarkers pipettiert und anschließend die anderen Taschen mit je 15 µl der vorbereiteten Proben aufgefüllt.

Auf jedes Gel wurden 14 Proben aufgetragen, darunter jeweils die eines unbehandelten Wildtyps sowie die einer unbehandelten Alport-Maus, die als Kontrolle bzw. zur Vergleichbarkeit der Gele untereinander dienen.

Die restlichen 12 Taschen der Proteingele wurden jeweils mit Proben von drei behandelten Mäusen zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten aufgefüllt. Dadurch wurde die Proteinurie in Abhängigkeit zum Lebensalter/Krankheitsdauer deutlich.

Aufgrund des progredienten Krankheitsverlaufs der Mäuse, der die Uringewinnung in den späten Stadien sehr schwierig gestaltete, konnte nur ausreichend Urin für drei Proteingele gewonnen werden.

Auf diesen Proteingelen wurde die Proteinurie von insgesamt sechs Ramipril + Paricalcitol und drei Paricalcitol behandelten Mäusen im Verlauf dargestellt.

Die Elektrophoresekammer wurde an eine Spannungsquelle angeschlossen und für 30 Minuten unter eine Spannung mit 80 V und anschließend für nochmals 60 Minuten unter 120 V gesetzt.

2.3.4 Färbung und Auswertung

Die durchgelaufenen Proteingele wurden aus den Gelplatten gelöst, vom Agarstreifen befreit und anschließend über Nacht in einer fünffach verdünnten Coomassie-Blue Färbelösung inkubiert.

Danach wurden die Gele mit Leitungswasser mehrfach gewaschen.

Zur Detektion wurden die Gele eingescannt und die Bandenintensität per Image J ausgewertet.

2.4 Western Blot

2.4.1 Anfertigen des Zelllysats

Je ein Viertel pro Versuchstiere wurde in 500 µl Lysepuffer für 30 Sekunden per Messerhomogenisator in einem 5 ml Röhrchen homogenisiert.

Das Zelllysate wurde daraufhin in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und für zehn Minuten bei 16.500 rpm zentrifugiert.

Das Zellpellet wurde verworfen und ein Teil des Überstandes zur quantitativen Proteinbestimmung weiter verwendet. Der restliche Überstand wurde bei -80°C tiefgefroren.

2.4.2 Quantitative Proteinbestimmung

Die quantitative Proteinbestimmung für die Western-Blot-Analyse erfolgte durch eine photometrische Messung.

Dazu wurden die Lysate im Verhältnis 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt. Als Eichstandard diente eine BSA-Verdünnungsreihe mit Konzentrationen von 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,75 mg/ml, 1,0 mg/ml, 1,5 mg/ml und 2,0 mg/ml.

Jeweils 10 µl der Proben -wie auch des Eichstandards- wurden mit 200 µl Bradford-Reagenz gemischt, auf eine Elisa-Platte aufgetragen und im Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen einen Leerwert (10 µl H₂O + 200 µl Reagenz) gemessen und die Proteinkonzentrationen anhand einer Eichgerade rechnerisch ermittelt.

2.4.3 Elektrophorese

Die Auftrennung der Proteinfractionen nach dem Molekulargewicht erfolgte anhand einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

Dazu wurde in Abhängigkeit von der vorher ermittelten Proteinkonzentration eine bestimmte Menge der einzelnen Lysate mit destilliertem Wasser auf je 10 µL verdünnt, sodass eine Proteinkonzentration von 40 µg/ 10 µl pro zu bestimmender Probe vorlag. Diese wurde dann in 1 µl Reduktionspuffer und 2,5 µl Probenpuffer aufgenommen und fünf Minuten lang bei 95°C denaturiert und anschließend für 3 Minuten auf Eis gekühlt.

Daraufhin wurden die Proben neben einem Molekulargewichtsmarker auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen und elektrophoretisch über eine Spannungsquelle zunächst für 30 Minuten bei 80 V und anschließend für 60 Minuten bei 100 V aufgetrennt.

2.4.4 Western-Blotting

Das Western-Blotting erfolgte in einer Biorad-Transblot-Kamme, in der die Proteine innerhalb von 60 Minuten bei 100 V vom Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF-Membran transferiert wurden. Die Membran wurde zunächst in Methanol aktiviert und in Blot-Puffer inkubiert.

2.4.5 Immundetektion

Nach erfolgtem Transfer auf die Membran wurden die unspezifischen Bindungsstellen geblockt, indem die PVDF-Membran eine Stunde in einer 5% Magermilchlösung in TBST-Puffer inkubiert wurde.

Zur Immundetektion wurde die Membran dann über Nacht bei 4 °C mit einem spezifischen Primäntikörper in einer Verdünnung von 1:1000 gegen das zu detektierende Protein (TGF-β, CTGF, Aktin) in fünfprozentiger Magermilchlösung inkubiert.

Am darauf folgenden Tag konnte die Membran dann für 4 x 15 Minuten mit TBST-Puffer gewaschen und anschließend für 60 Minuten in 5% Magermilchlösung in TBST-Puffer mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundäntikörper inkubiert werden.

Die Membran wurde anschließend erneut wie oben beschrieben mit TBST gewaschen.

Die Proteinsignale wurden dann per Chemilumineszenz detektiert, indem die aus der peroxidasevermittelten Reaktion resultierenden Lichtemissionen dazu benutzt wurden, einen Röntgenfilm zu belichten. Hierzu wurde die Membran für 60 Sekunden mit sechs ml einer Chemilumineszenz-Reagenz inkubiert und anschließend in einer Röntgenkassette zwischen zwei Folien eingebettet.

In der Dunkelkammer wurden dann Röntgenfilme in der Röntgenkassette gegenüber der Chemilumineszenz aktivierten Membran exponiert, belichtet und entwickelt.

Anschließend konnten die entwickelten Röntgenbilder eingescannt und digital densitometrisch ausgewertet und die verschiedenen Proteinfractionen aufgrund des mit aufgetragenen Molekularmarkers bestimmt werden (siehe Abb. 38).

Die Membran wurde nach der Detektion kurz mit dH₂O gespült und dann für 15 Minuten mit einem Stripping-Puffer inkubiert, um die gebundenen Antikörper wieder zu entfernen.

Anschließend konnte die Membran mit dem nächsten Primäntikörper gemäß der oben beschriebenen Methode inkubiert werden, sodass das die nächste Proteindetektion stattfinden konnte.

2.5 Immunhistochemie

Wie in Punkt 2.1.1 beschrieben fand eine Einteilung der Versuchstiere in unterschiedliche Versuchsgruppen statt.

Diejenigen Tiere, die sich nicht in den Überlebensgruppen befanden oder vorzeitig verstorben waren, wurden zu geplanten Zeitpunkten (4.5, 6, 7.5 oder 9.5 Wochen) durch kraniozervikale Dislokation getötet und ihre Nieren der immunhistochemischen Untersuchung zugeführt.

Dazu wurden die post mortem entnommenen Nieren längs halbiert, in Einbettkassetten gelegt und über 24 Stunden in 4 %-Formaldehyd fixiert.

Anschließend wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und dann in einer Metallform mit heißem Paraffin übergossen.

Mit der Abkühlung der Präparate erhielt man in festen Paraffinblöcken fixierte Nieren.

Diese wurden in ein Mikrotom eingespannt und 10 Schnitte mit einer Schnittdicke von 3 µm angefertigt.

Die im Wasserbad geglätteten Schnitte wurden auf Objektträger übertragen und zur Aushärtung und Fixierung auf eine Heizplatte gelegt.

Um bei der anschließenden Immunhistochemie die Stadien der glomerulären sowie der tubulointerstitiellen Fibrose zu erfassen, wurden die gewonnenen Präparat-Schnitte mit monoklonalen Antikörpern gegen Laminin sowie gegen Fibronectin markiert.

Laminin:

Die auf Objektträgern fixierten Nierenschnitte wurden 60 Minuten lang in einem Wärmeschrank bei 80°C aufbewahrt und anschließend in eine absteigende Alkoholreihe überführt, um das flüssige Paraffin zu entfernen.

Zur Andauung der Präparate wurden diese mit je 100 µL einer 1%-Proteinase-K-Lösung versetzt und 23 Minuten lang bei 37°C inkubiert und danach dreimal für jeweils 10 Minuten in TBS-Puffer (1x) gewaschen.

Als nächstes wurden die Schnitte mit einer 5%-BSA in TBS-Lösung bedeckt und für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren.

Anschließend wurde der Primärantikörper gegen Laminin (1:25 in TBS) zur Inkubation bei 4°C über Nacht auf die Präparate gegeben.

Die Objektträger mit den Präparaten wurden am folgenden Tag erneut dreimal für zehn Minuten in TBS-Puffer gewaschen und mit einer Blocklösung (5%-Goat-Normalserum in 0,8%-BSA in TBS-Lösung) 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert.

Im nächsten Schritt wurden die Präparate mit dem CY3-markierten Sekundärantikörper versetzt und erneut für 60 Minuten in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert.

Abschließend wurden die Schnitte nochmals für 15 Minuten in TBS gewaschen und mit einem Deckgläschen im Einbettmedium fixiert.

Fibronectin:

Die immunhistochemische Behandlung der Nierenschnitte zum Nachweis von Fibronectin, folgte einem Protokoll, das dem der Immunhistochemie von Laminin sehr ähnlich war.

Unterschiede ergaben sich beim Andauen der Präparate, welches mit Citratpuffer anstelle von Proteinase-K erfolgte. Hierzu wurden die Objektträger mit den Nierenschnitten in eine mit Citratpuffer gefüllte Kunststoffküvette gesteckt und sechsmal für jeweils fünf Minuten zum Sieden gebracht. Dem durch den Siedevorgang bedingten Flüssigkeitsverlust wirkte ein wiederholtes Auffüllen der Küvette mit destilliertem Wasser entgegen.

Weiterhin unterschied sich die immunhistochemische Behandlung durch die Wahl eines anderen Primärantikörpers (gegen Fibronectin; 1:100 in TBS) und eines entsprechenden Sekundärantikörpers.

Die Auswertung der Präparate erfolgte unter einem Fluoreszenzmikroskop.

Dabei wurde mittels eines Lasers unter dem Mikroskop eine Fluoreszenzreaktion der Cy3-markierten Sekundärantikörper ausgelöst und die Präparate bei 10-, 20- und 40-facher Vergrößerung betrachtet. Pro Vergrößerung konnten vier bis zehn Fotografien von repräsentativen Abschnitten des Präparates angefertigt werden.

2.5.1 Immunhistochemie-Score

Bei allen Tieren, die sich in den „Tötungsgruppen“ befanden, wurde eine Nephrektomie durchgeführt, anschließend die Nieren wie in Punkt 2.5 beschrieben präpariert, um immunhistochemisch die Stadien der glomerulären sowie der tubulointerstitiellen Fibrose zu erfassen. Dies geschah mit Hilfe von Markierung bestimmter extrazellulärer Matrixproteine, die mit voranschreitender renaler Fibrose vermehrt anfallen (Laminin und Fibronectin).

Die mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops erstellten Bilder wurden randomisiert und durch fünf unabhängige Personen unter Berücksichtigung bestimmter Bewertungskriterien hinsichtlich ihres glomerulären und tubulointerstitiellen Fibrosegrades beurteilt und durch Scorerpunkte (SP) von 0 bis 3 in 4 Gruppen eingeteilt.

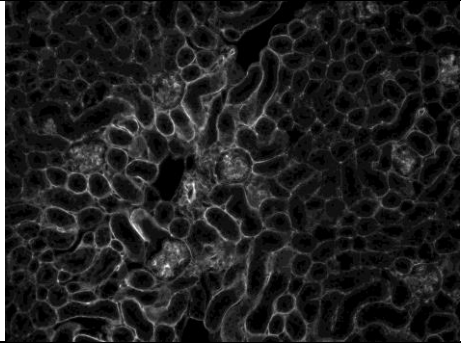
Zur Veranschaulichung wurde jeweils ein Beispielbild pro Gruppe gezeigt.

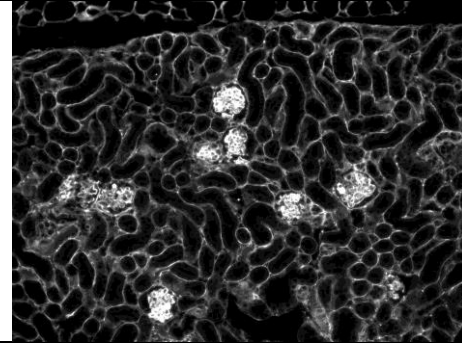
In den Gruppen Ramipril, Ramipril + Paricalcitol und Placebo wurden je $n = 4$ Mäuse untersucht. In der Wildtyp-Kontrollgruppe waren es $n = 3$.

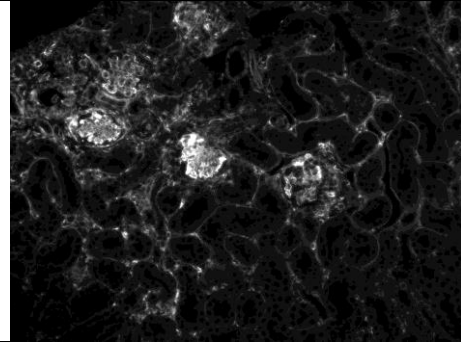
Die Nieren jeder Maus wurden, abhängig von der Größe des Präparates, in der 10-fachen Vergrößerung 6- bis 8-mal fotografiert, sodass die gesamte Niere optisch erfasst werden konnte.

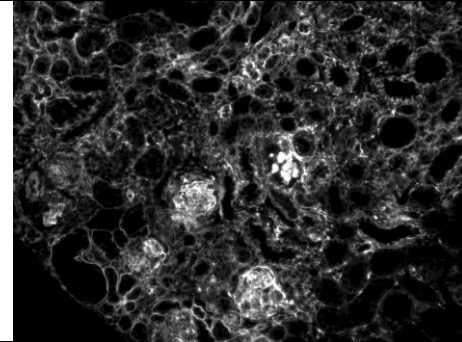
In der 40-fachen Vergrößerung wurden 4 bis 5 Fotos von den zu beurteilenden Strukturen (Glomeruli, Interstitium) angefertigt.

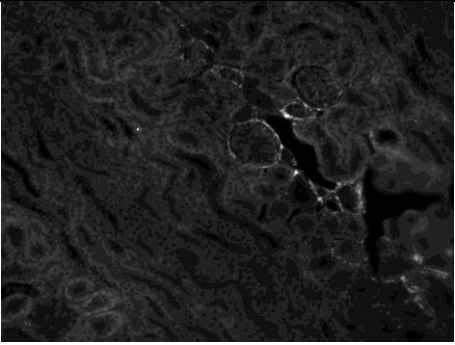
Abbildung 5: Beispielbilder

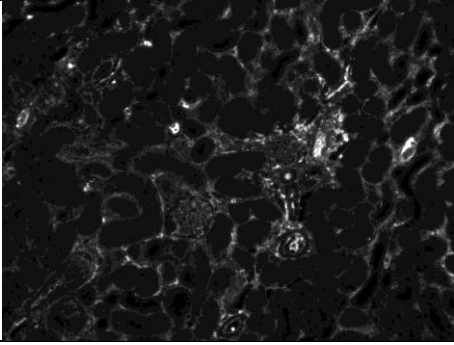
Gruppe/SP 0, Laminin
Beispielbild

Glomerulum
Klar erkennbare, feine Struktur des Kapillarknäuels, freies Lumen der Bowman-Kapsel
Tubulointerstitium
Klar erkennbare Struktur, schmales Interstitium ohne fibröse Verbreiterung, keine Fibroseinseln

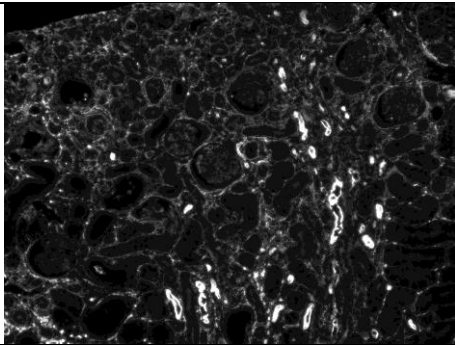
Gruppe/SP 1, Laminin
Beispielbild

Glomerulum
Klar erkennbare Struktur, Kapillarschlingen aufgehellt, beginnende Kapselbildung
Tubulointerstitium
Erkennbare strukturelle Anordnung der Tubuli, verbreitertes Interstitium mit vereinzelt Fibroseinseln

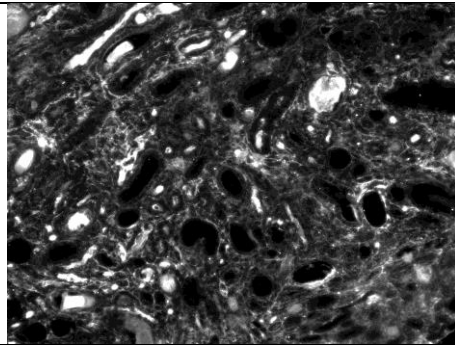
Gruppe/SP 2, Laminin
Beispielbild

Glomerulum
Stark veränderte Kapillarstruktur, verschmälertes Bowman-Lumen
Tubulointerstitium
Unregelmäßige strukturelle Anordnung der Tubuli, verbreitertes Interstitium mit diffus verteilten Fibrosebereichen

Gruppe/SP 3, Laminin
Beispielbild

Glomerulum
Keine Strukturierung erkennbar, vollständige glomeruläre Sklerose, Verschmelzung von Kapillarknäuel und Kapsel
Tubulointerstitium
Struktur durch Fibrosierung aufgehoben, breite bindegewebige Durchsetzung des Gewebes

Gruppe/SP 0, Fibronektin
Beispielbild

Tubulointerstitium
Vereinzelte, zarte Signalanreicherung um Glomeruli und Gefäße sowie Gewebsspalten

Gruppe/SP 1, Fibronektin
Beispielbild

Tubulointerstitium
Vermehrte Singnalanreicherung im Interstitium, Fibroseinseln im Interstitium

Gruppe/SP 2, Fibronektin
Beispielbild

Tubulointerstitium
Deutliche Fibrosestraßen im Interstitium, beginnende Verdrängung des Nierengewebes

Gruppe/SP 3, Fibronektin
Beispielbild

Tubulointerstitium
Breite Vernarbung des Gewebes mit starker Signalanreicherung unter Aufhebung der tubulointerstiellen Architektur

2.6 Harnstoffbestimmung

Zur Probenentnahme wurde den Versuchstieren post mortem durch intrakardiale Punktion Blut abgenommen und in Eppendorf-Reaktiongefäße überführt.

Die Blutentnahme wurde zeitgleich mit der Materialgewinnung für Western Blot und Immunhistochemie durchgeführt.

Die Proben wurden anschließend bei 10.000 rpm zentrifugiert, sodass sich die schwereren korpuskulären Blutbestandteile vom Blutserum trennten. Anschließend wurde letzteres zur weiteren Verwendung in ein neues Eppendorf-Reaktiongefäß gegeben und bei -80 °C tiefgefroren.

Der enzymatische in-Vitro-Test zur Harnstoff-N-Bestimmung im Serum der Versuchstiere wurde mit einem automatischen Analysegerät gemäß den Herstellerangaben bestimmt.

Aus den Messwerten ergab sich ein Harnstoff-Serumspiegel unter Anwendung folgender Formel:

$$\underline{\text{Harnstoff-N in mg/dL} \times 2,14 = \text{Harnstoff in mg/dL}}$$

2.7 Statistik

Die statistische Auswertung der Überlebensdaten sowie der Ergebnisse der Histologie-Scores erfolgte mit Hilfe der Programme Statistica© und GraphPad Prism© sowie unter Beratung des Institutes für medizinische Statistik der Georg-August Universität Göttingen.

Deskriptive Darstellung der Daten

Die grafische Darstellung der ermittelten Daten wurde mittels Boxplot und Kaplan-Meier-Kurve erstellt.

2.7.1 Boxplot

Mit Hilfe des Boxplots lassen sich Aussagen zur Verteilung der ermittelten Daten treffen.

Folgende statistische Größen kamen zur Anwendung:

Minimal- und Maximalwert (kleinster bzw. größter Wert), 25%- und 75%-Quartil (25% bzw. 75% der Werte je Gruppe sind kleiner als der Wert des 25%- bzw. 75%-Quartils) der Median (gleichbedeutend mit dem 50%-Quartil) sowie der Mittelwert.

2.7.2 Kaplan-Meier-Schätzkurve

Die Kaplan-Meier-Schätzkurve dient dem grafischen Bestimmen von spezifischen Überlebensraten oder Überlebenszeiten.

Über die Schätzkurve lässt sich die Wahrscheinlichkeit ablesen, ob ein bestimmtes Ereignis zu einem bestimmten Zeitpunkt eintritt bzw. nicht eintritt. Das Verfahren kann auch dann angewendet werden, wenn nicht alle Versuchstiere identische Beobachtungszeiträume haben (A. ZIEGLER 2007).

Zudem kann mit der Kaplan-Meier Kurve eine Aussage über die Proportionalität der Ereignisraten getroffen werden (ZIEGLER 2007).

2.7.3 Kruskal-Wallis-Test

Der Kruskal-Wallis-Test ist ein parameterfreier Test, mit dem getestet wird, ob unabhängige Stichproben einer gleichen Grundgesamtheit entstammen.

Der Test gleicht dem Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test mit dem Unterschied, dass er gleichzeitig auf mehr als zwei Gruppen angewendet werden kann.

In dieser Arbeit dient der Test der Überprüfung der Nullhypothese: zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen besteht kein Unterschied. Es wurde ein Signifikanzniveau mit $p = 0,05$ festgelegt.

2.7.4 Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test mit Adjustierung des Signifikanzniveaus nach Bonferroni

Als Signifikanzprüfung für Paarvergleiche der Stichprobenmittelwerte wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test verwendet.

Der U-Test prüft die Nullhypothese, dass zwei zu vergleichende Stichproben aus formgleich verteilten Populationen mit identischem Medianwert stammen (BORTZ J 2008).

Ist der U-Test signifikant, kann man davon ausgehen, dass sich die Mediane der zugrunde liegenden Populationen unterscheiden und die H_1 (Alternativhypothese) zutrifft.

Das Signifikanzniveau wurde mit $p = 5\%$ gewählt. Um das Auftreten falsch positiver Ergebnisse bzw. die *familywise error rate* (FWER, falsches Ablehnen einer richtigen Nullhypothese) durch multiples Testen zu kontrollieren, wurde eine Adjustierung nach Bonferroni durchgeführt. Dazu teilt man das multiple Gesamtniveau (5%) durch die Anzahl der durchgeführten Tests ($n = 6$) und vergleicht jeden P-Wert mit dem adjustierten Signifikanzniveau (0,83%) (VICTOR2010).

3. Ergebnisse

In dieser Arbeit sollen das nephroprotektive Potential von Paricalcitol (PC) als Monotherapie und als Dualtherapie zusammen mit Ramipril (ACE) getestet und mögliche neue medikamentöse Therapieansätze bei der Behandlung des Alport-Syndroms geprüft werden. Der nephroprotektive Effekt soll durch das Untersuchen von Überlebenszeiten, Proteinurie, Urämie und durch den Nachweis entzündungsassoziierter Proteine im Nierengewebe wie TGF- β und CTGF demonstriert werden.

Darüber hinaus sollen immunhistochemisch histologische Untersuchungen der Nieren die beobachteten nephroprotektiven Effekte stützen.

3.1 Überlebenszeiten

Um eine Aussage über den Therapieerfolg der Behandlung zu geben, sind nachfolgend die Überlebenszeiten der Versuchstiere aufgeführt.

3.1.1 Tabellarische Auflistung der Überlebenszeiten

Die Überlebenszeiten der betrachteten Tiere stellen sich wie folgt dar:

Mausnummer	Behandlung	Überlebenszeit in Tagen
51	Ramipril	89
52	Ramipril	111
54	Ramipril	105
57	Ramipril	98
61	Ramipril	118
73	Ramipril	88
74	Ramipril	105
343	Ramipril	77

Tabelle 3: Überlebenszeiten bei Ramipriltherapie

Mausnummer	Behandlung	Todeszeitpunkt nach Tagen
16	-	99
31	-	71
33	-	59
44	-	65
92	-	63
103	-	78
207	-	68
220	-	60

Tabelle 4: Überlebenszeiten ohne Therapie

Mausnummer	Behandlung	Todeszeitpunkt nach Tagen
245	Ramipril + Paricalcitol	118
260	Ramipril + Paricalcitol	127
261	Ramipril + Paricalcitol	121
267	Ramipril + Paricalcitol	133
270	Ramipril + Paricalcitol	127
273	Ramipril + Paricalcitol	112
291	Ramipril + Paricalcitol	111
380	Ramipril + Paricalcitol	111

Tabelle 5: Überlebenszeiten bei Doppeltherapie mit Ramipril und Paricalcitol

Mausnummer	Behandlung	Todeszeitpunkt nach Tagen
301	Paricalcitol	70
303	Paricalcitol	73
310	Paricalcitol	73
311	Paricalcitol	73
314	Paricalcitol	82
322	Paricalcitol	73
325	Paricalcitol	73
1720	Paricalcitol	84

Tabelle 6: Überlebenszeiten bei Paricalcitoltherapie

3.1.2 Grafische Darstellung der Überlebenszeiten als Boxplot

Durch Überprüfung der Überlebenszeiten mit Hilfe eines Boxplots und einer Kaplan-Meier-Kurve, können die Überlebensdaten der vier Gruppen deskriptiv beschrieben und vergleichend einander gegenüber gestellt werden. Dazu wurden folgende statistische Größen verwendet:

Minimal- und Maximalwert (kleinster bzw. größter Wert), 25%- und 75%-Quartil (25% bzw. 75% der Werte je Gruppe sind kleiner als der Wert des 25%- bzw. 75%-Quartils) der Median (gleichbedeutend mit dem 50%-Quartil) sowie der Mittelwert.

Therapie	Überlebenszeit Mittelwert (Tage)	Versuchstiere (N)	Minimal- / Maximalwert (Tage)	Überlebenszeit 25% Quartil (Tage)	Überlebenszeit Median (Tage)	Überlebenszeit 75% Quartil (Tage)
ACE	98,86	8	77 / 118	88,50	101,5	108
-	70,38	8	59 / 99	61,50	66,5	74,5
PC+ ACE	120	8	111 / 133	111,50	119,5	127
PC	75,13	8	70 / 84	73	73	77,5

Tabelle 7: statistische Auftrennung der Überlebenszeiten

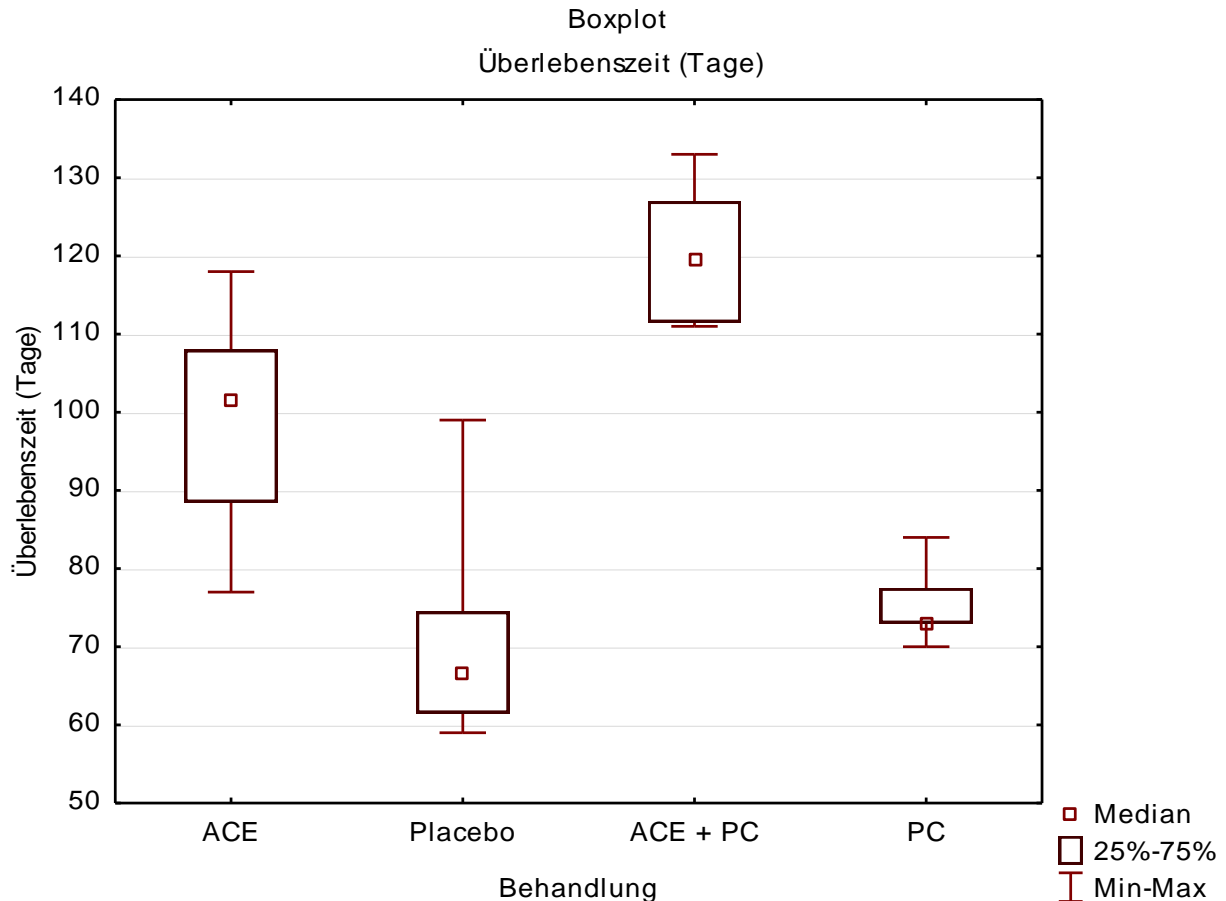


Abbildung 6: Boxplot der Überlebenszeiten, Statistica ©

Bei den unbehandelten Alport-Mäusen (Placebo-Gruppe) stellt sich trotz eines Ausreißers mit einer Überlebenszeit von *99 Tagen* nur ein Mittelwert mit *70,38 Tagen* bzw. ein Median mit *66,5 Tagen* dar. Im Vergleich dazu die Behandlungsgruppen *ACE*, *ACE + PC* und *PC*:

Bei der Paricalcitol-Monotherapie (*PC*) liegen Mittelwert (*75,13 Tage*) und Median (*73 Tage*) bereits höher als bei den unbehandelten *Alport-Mäusen*. Bei der zweiten monotherapierten Behandlungsgruppe (*ACE*, Behandlung mit Ramipril) zeigten sich mit einem Mittelwert von *98,86 Tagen* und einem Median von *101,5 Tagen* noch größere Unterschiede zu den Überlebenszeiten der unbehandelten Mäuse, sodass dies als erster Anhaltspunkt auf einen Therapieeinfluss hinweist.

Am deutlichsten fällt die Wertediskrepanz der Überlebenszeiten jedoch bei jenen Tieren auf, die einer Dualtherapie mit Ramipril und Paricalcitol (*ACE + PC*) unterzogen wurden. Hier liegen Mittelwert und Median mit *120* bzw. *119,5 Tagen* beinahe doppelt so hoch wie bei den unbehandelten Tieren.

3.1.3 Grafische Darstellung der Überlebenszeiten als Kaplan-Meier-Kurve

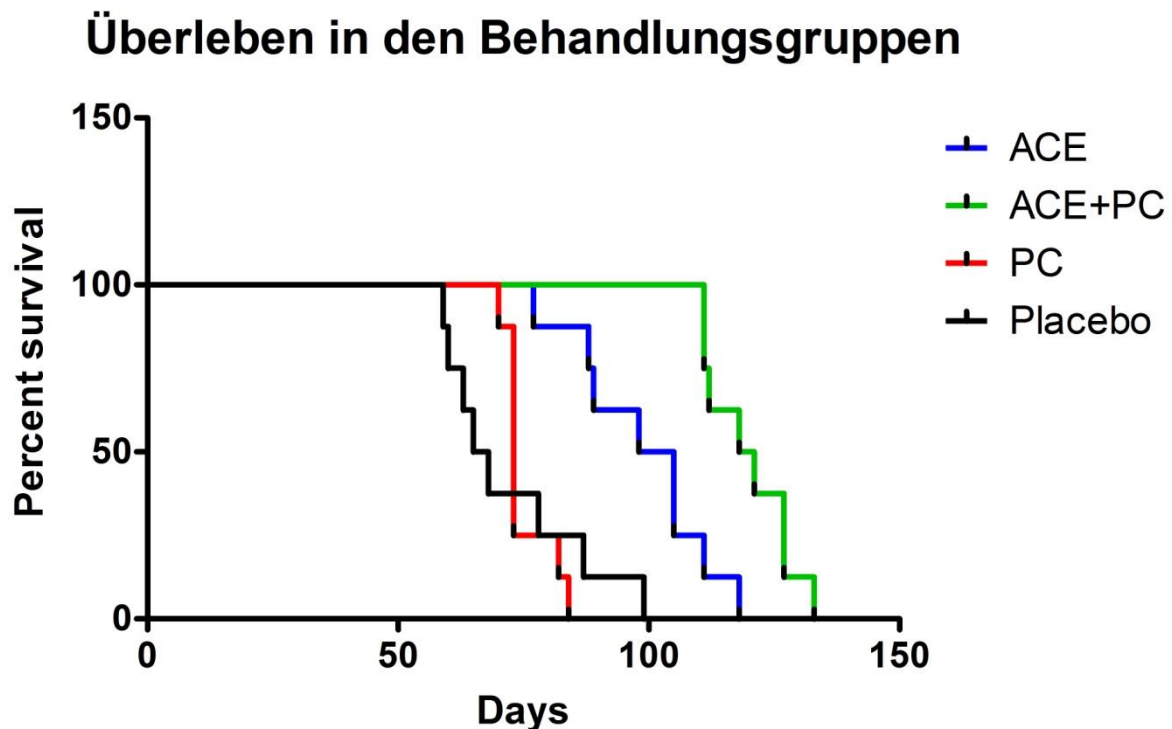


Abbildung 7: Kaplan-Meier-Kurve zur Darstellung der Überlebenszeiten, Graph-Pad Prism ©

In der Kaplan-Meier-Kurve stellt sich eine gleichmäßige Überlegenheit der Behandlungsgruppen *ACE* und *ACE + PC* gegenüber der *Placebo-Gruppe* dar. Diese Aussage kann getroffen werden, da die Kurven der beiden Behandlungsgruppen sich nicht mit jener der unbehandelten *Placebo-Gruppe* kreuzen („proportional hazards regression“). Da sich der Kurvenverlauf bzw. das Ereignisrisiko (Hazard) der Dualtherapie *ACE + PC* ebenfalls proportional zum Kurvenverlauf der monotherapierten *ACE-Gruppe* verhält, kann auch in diesem Fall von einer gleichmäßigen Überlegenheit der *ACE + PC-Gruppe* über die *ACE-Gruppe* ausgegangen werden.

Die Kurve der Behandlungsgruppe *PC* kreuzt hingegen die Kurve der *Placebo-Gruppe*, sodass in diesem Fall keine gleichmäßige Überlegenheit gegeben ist.

3.1.4 Kruskal-Wallis-Test

Um die Nullhypothese H_0 (zwischen den Behandlungsgruppen besteht kein Unterschied) rechnerisch zu bestätigen oder zu widerlegen, wird ein parameterfreier statistischer Test nach Kruskal-Wallis durchgeführt.

Kruskal-Wallis-Test: $H(3, N=32) = 24,32992, p = 0,0000$				
	Code	N	Rangsumme	Arithmetisches Mittel Rang
ACE	101	8	161,5000	20,18750
Placebo	102	8	56,0000	7,00000
ACE + PC	103	8	223,5000	27,93750
PC	104	8	87,0000	10,87500

Tabelle 8: Kruskal-Wallis-Test

Die Auswertung des Kruskal-Wallis-Test zeigt mit einem P-Wert von $p = 0,0000$ eine Irrtumswahrscheinlichkeit nahe 0 Prozent und widerlegt damit die Nullhypothese H_0 . Die Alternativhypothese H_1 (es bestehen Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen) ist damit bewiesen.

3.1.5 Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test

Um Unterschiede in der Wirksamkeit der Behandlung zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen zu untersuchen, wird ein Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test für Paarvergleiche herangezogen und der p-Wert nach Bonferroni adjustiert. Das Signifikanzniveau liegt bei 0,83 %.

Paarvergleiche			P-Wert	Signifikanz bei $p < 0,0083$
ACE	vs.	Placebo	0,005385	Ja
ACE	vs.	PC	0,001948	Ja
ACE	vs.	ACE/PC	0,004575	Ja
Placebo	vs.	PC	0,083124	Nein
Placebo	vs.	ACE/PC	0,000939	Ja
PC	vs.	ACE/PC	0,000939	Ja

Tabelle 9: Paarvergleiche nach Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test

In Tabelle 2 bestätigt sich die Alternativhypothese H_1 (siehe Punkt 3.1.4): Es bestehen Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Bei den durchgeführten Paarvergleichen zeigen sich jeweils Signifikanzniveaus unter 0,83%. Lediglich bei der Gegenüberstellung von unbehandelten Alport-Mäusen (*Placebo*) und Monotherapierten Paricalcitol-Mäusen (*PC*) lässt sich kein signifikanter Unterschied erkennen ($p=0,083124$).

3.2 Proteingele

Um die Proteinurie und damit einen möglichen Verlaufsparemeter der Behandlung der zu untersuchenden Tiere zu kontrollieren, wurden Proteingele angefertigt.

Abhängig von molekularer Größe der Proteine wurden drei Proteinfractionen eingeteilt:

Die mit ca. 66 - 69kDa große Albuminfraktion und im Verhältnis dazu die Gesamtheit der Proteine >69kDa (hier als hochmolekulare Eiweiße bezeichnet) sowie die Gesamtheit der Proteine <66kDa (hier als niedermolekulare Eiweiße bezeichnet).

Nachfolgend ist ein Proteingel von dreien mit Paricalcitol behandelten Mäusen im zeitlichen Verlauf dargestellt.

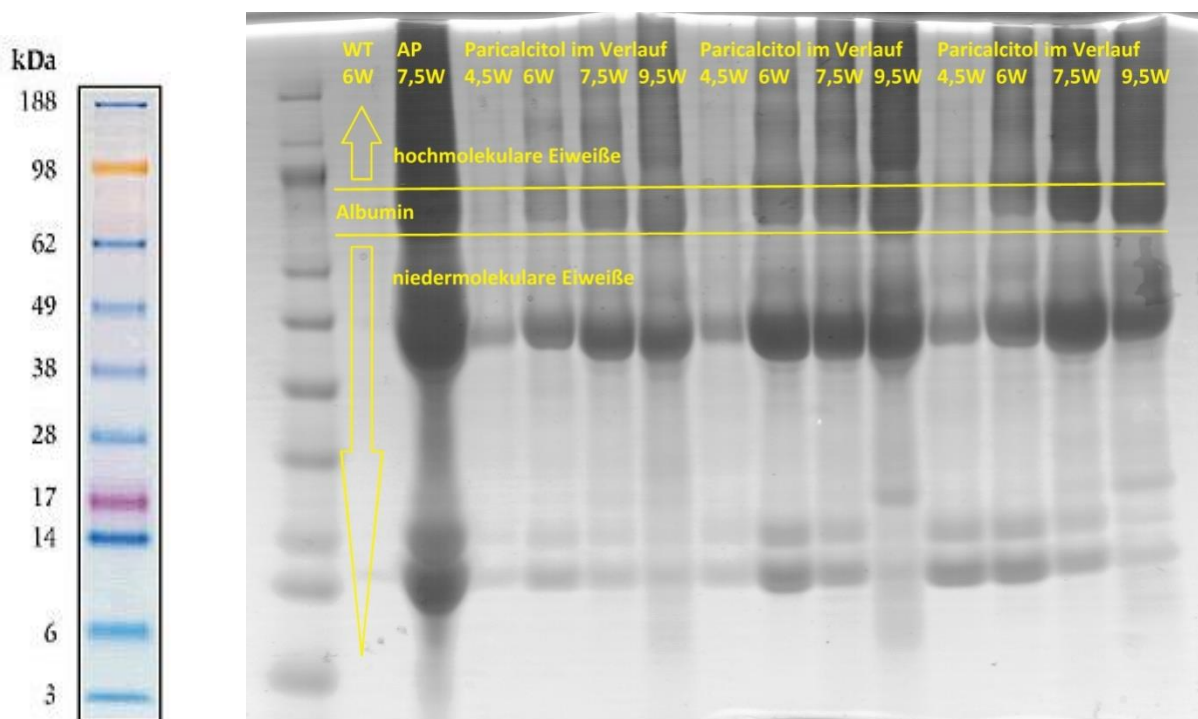


Abbildung 8: Proteingel Paricalcitol

Im Folgenden sind die densitometrischen Auswertungen der verschiedenen Proteinfractionen dargestellt.

Es handelt sich jeweils um die errechneten Mittelwerte zu den untersuchten Zeitpunkten, die auf der Abszisse abgebildet sind. Auf der Ordinate finden sich die densitometrischen Dichtewerte.

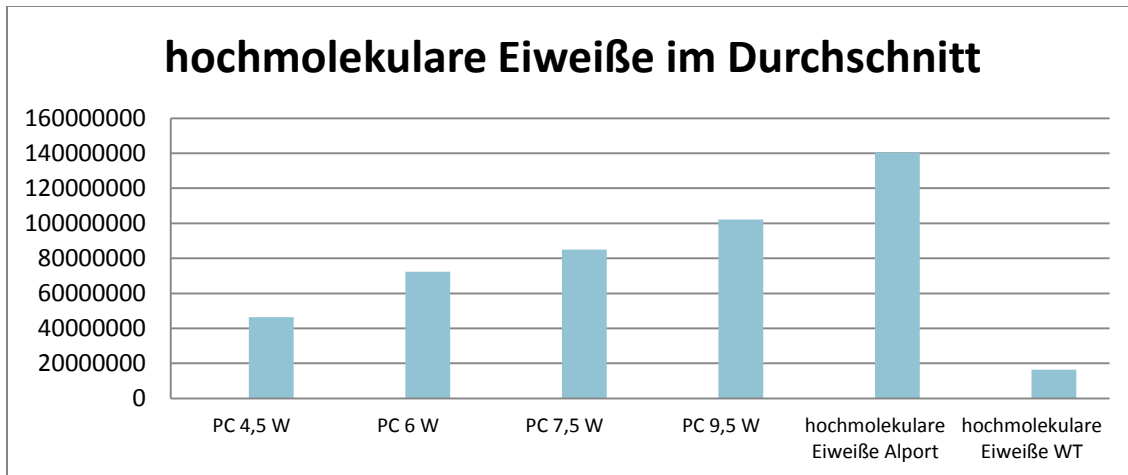


Abbildung 9: Proteingel Paricalcitol: hochmolekulare Eiweiße

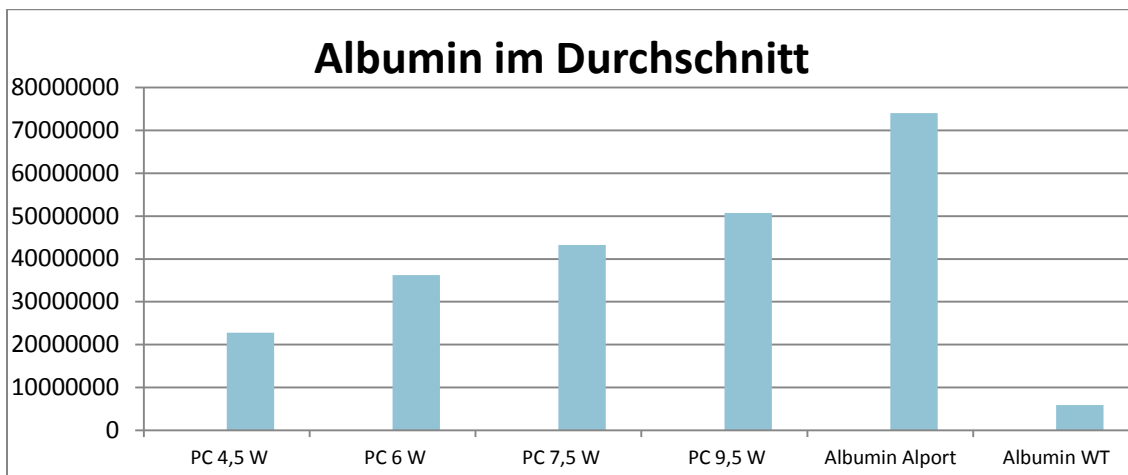


Abbildung 10: Proteingel Paricalcitol: Albumin

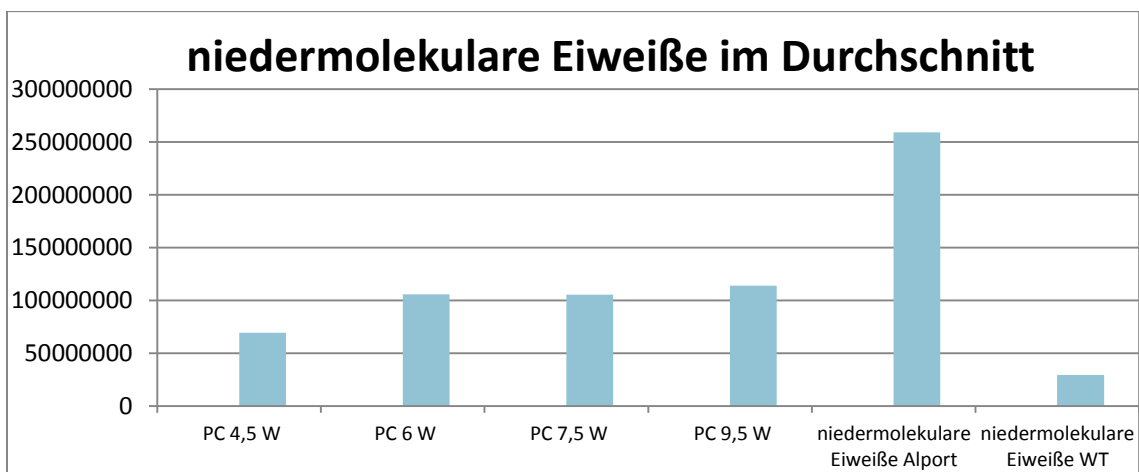


Abbildung 11: Proteingel Paricalcitol: niedermolekulare Eiweiße

Bei der Betrachtung der Fraktionen von hochmolekularen Eiweißen und Albumin lässt sich im zeitlichen Verlauf ein progredienter Anstieg der Proteine der mit Paricalcitol behandelten Mäuse feststellen. Auch bei den niedermolekularen Eiweißen findet sich ein leichter Anstieg

der densitometrischen Dichte zwischen Woche 4.5 und Woche 9.5, jedoch bleiben hier die Proteinwerte ab Woche 6 annähernd gleich.

Die Differenz der densitometrischen Dichtewerte zwischen behandelter Paricalcitol-Maus und unbehandelter Alport-Maus verhält sich in den einzelnen Proteinfractionen abweichend. Konkret bedeutet das, dass die Anteile von ausgeschiedenen hochmolekularen Eiweißen (Ratio 0,54) und Albuminurie (Ratio 0,51) relativ größer sind als der Anteil der niedermolekularen Eiweiße (Ratio 0,38).

Darüber hinaus fällt auf, dass zu jedem Zeitpunkt und in jeder Proteinfraction die Dichtewerte der Paricalcitol-Gruppe oberhalb jener der Wildtyp-Mäuse und unterhalb jener der unbehandelten Alport-Mäuse liegen.

Nachfolgend ist ein Proteingel von dreien mit Ramipril und Paricalcitol behandelten Mäusen im zeitlichen Verlauf dargestellt.

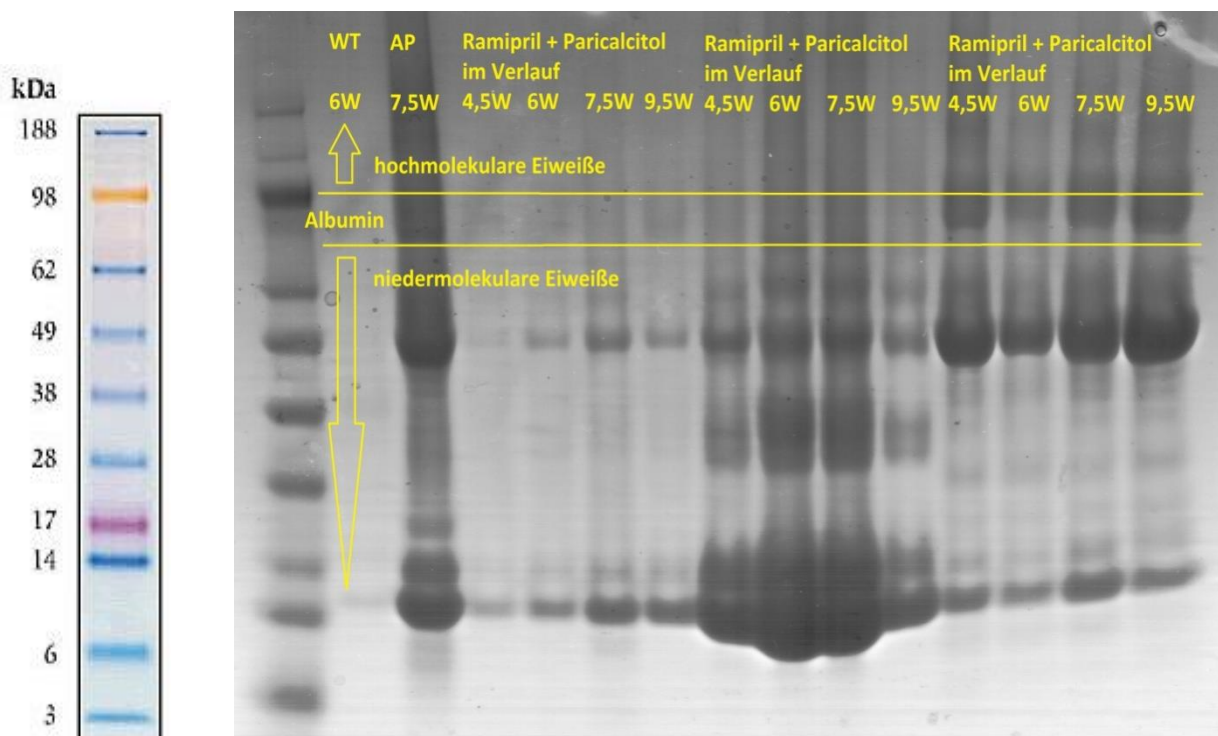


Abbildung 12: Proteingel Ramipril + Paricalcitol

Im Folgenden sind die densitometrischen Auswertungen der verschiedenen Proteinfractionen dargestellt.

Es handelt sich jeweils um die errechneten Mittelwerte zu den untersuchten Zeitpunkten, die auf der Abszisse abgebildet sind. Auf der Ordinate finden sich die densitometrischen Dichtewerte.

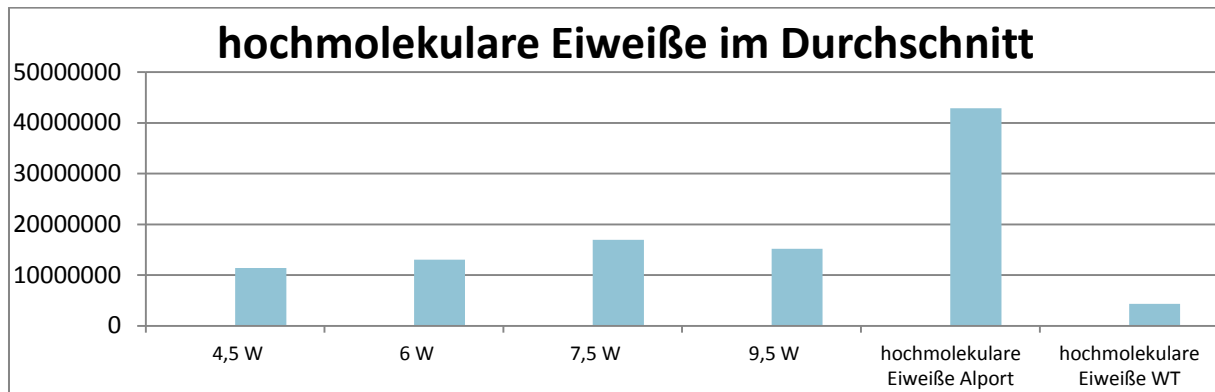


Abbildung 13: Proteingel Ramipril + Paricalcitol: hochmolekulare Eiweiße

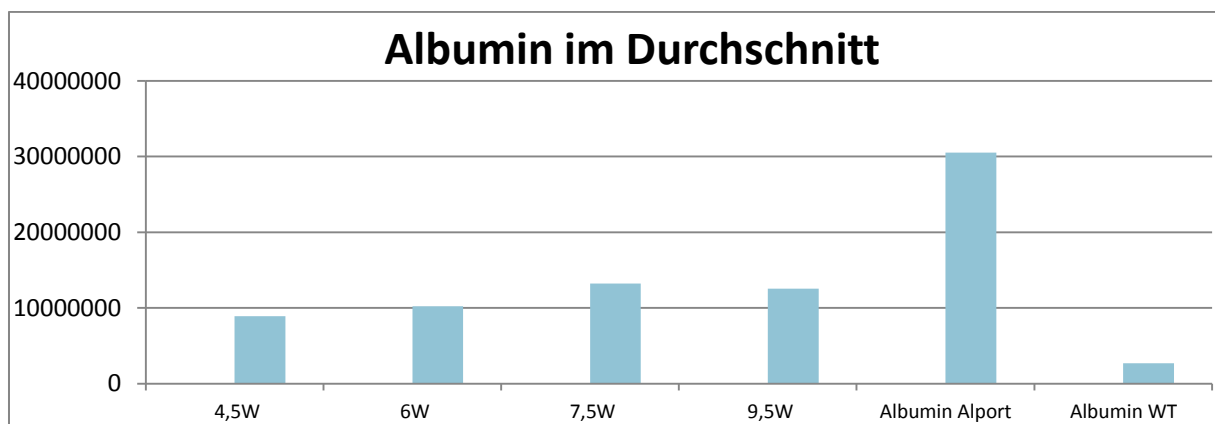


Abbildung 14: Proteingel Ramipril + Paricalcitol: Albumin

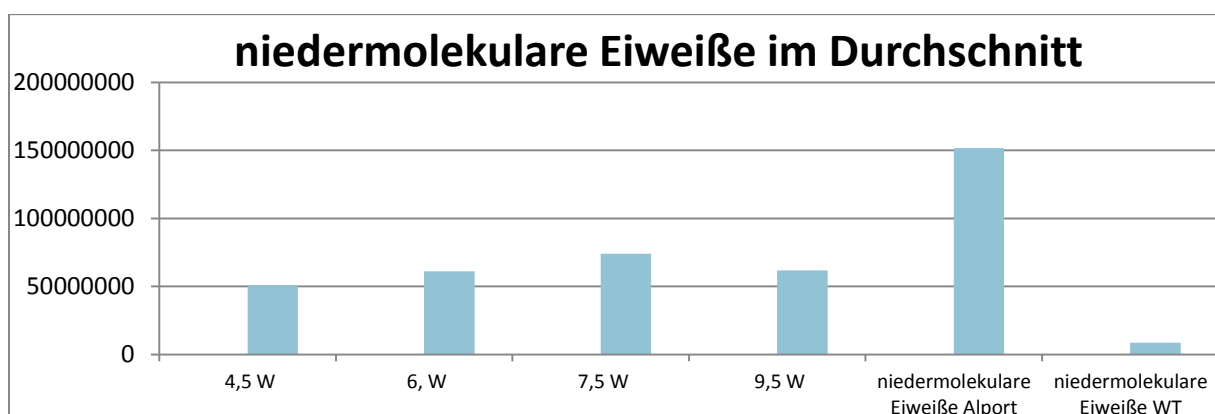


Abbildung 15: Proteingel Ramipril + Paricalcitol: niedermolekulare Eiweiße

Bei denen mit Ramipril und Paricalcitol doppelt behandelten Tieren (ACE + PC) ist ebenfalls ein Anstieg der gemittelten Proteindichtewerte im zeitlichen Verlauf und in allen Proteinfractionen zu verzeichnen. Auffallend ist jedoch, dass in Woche 7.5 höhere Werte vorliegen als in den späteren Stadien bei Woche 9.5.

Die Differenz der densitometrischen Dichtewerte zwischen behandelter Ramipril-Paricalcitol-Maus und unbehandelter Alport-Maus verhält sich in den einzelnen Proteinfractionen abweichend. Im Fall der ACE + PC behandelten Mäuse bedeutet das, dass die Anteile von ausgeschiedenen niedermolekularen Eiweißen (Ratio 0,54) und Albuminurie (Ratio 0,51) relativ größer sind als der Anteil der hochmolekularen Eiweiße (Ratio 0,38).

Auch hier liegen zu jedem Zeitpunkt und in jeder Proteinfraction die Dichtewerte der ACE/PC-Gruppe oberhalb jener der Wildtyp-Mäuse und unterhalb jener der unbehandelten Alport-Mäuse.

Vergleich der Gele untereinander

Durch das Auftragen des Urins derselben unbehandelten Alport-Maus sowie das desselben unbehandelten Wildtyps war eine Gegenüberstellung der Proteingele untereinander möglich.

Dazu wurden die densitometrischen Dichtewerte der Proteinfractionen über die Alport-Kontrolle normiert und zum Vergleich gegenüber gestellt.

Nachfolgend sind auf der Abszisse beide Therapiegruppen im zeitlichen Verlauf sowie jeweils ein 6 Wochen alter zur Kontrolle dienender Wildtyp bzw. eine 7,5 Wochen alte unbehandelte Alport-Maus abgebildet. Das Alter der jeweiligen Versuchstiere (in Wochen) zu den unterschiedlichen Entnahmezeitpunkten findet sich am Fuß der jeweiligen Säule.

Auf der Ordinate sind die densitometrischen Dichtewerte dargestellt.

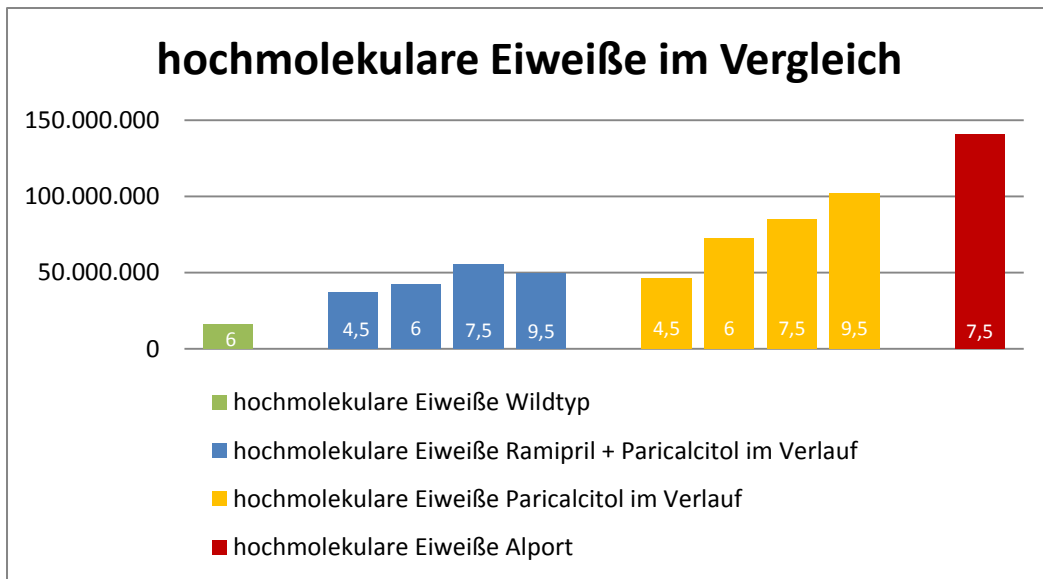


Abbildung 16: Vergleich der hochmolekularen Eiweißfraktionen beider Proteingele

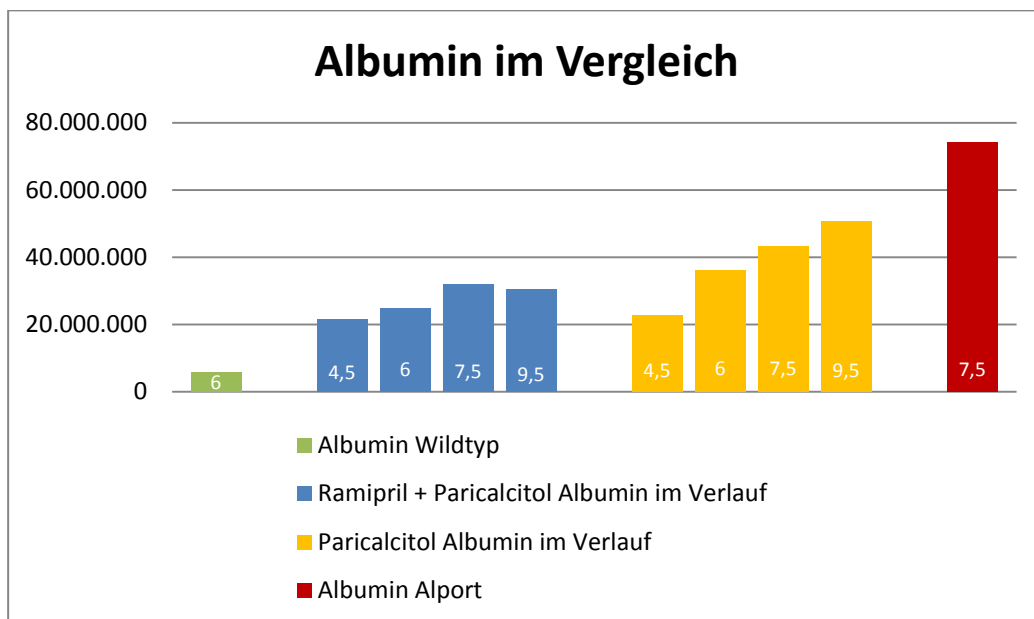


Abbildung 17: Vergleich der Albuminfraktionen beider Proteingele

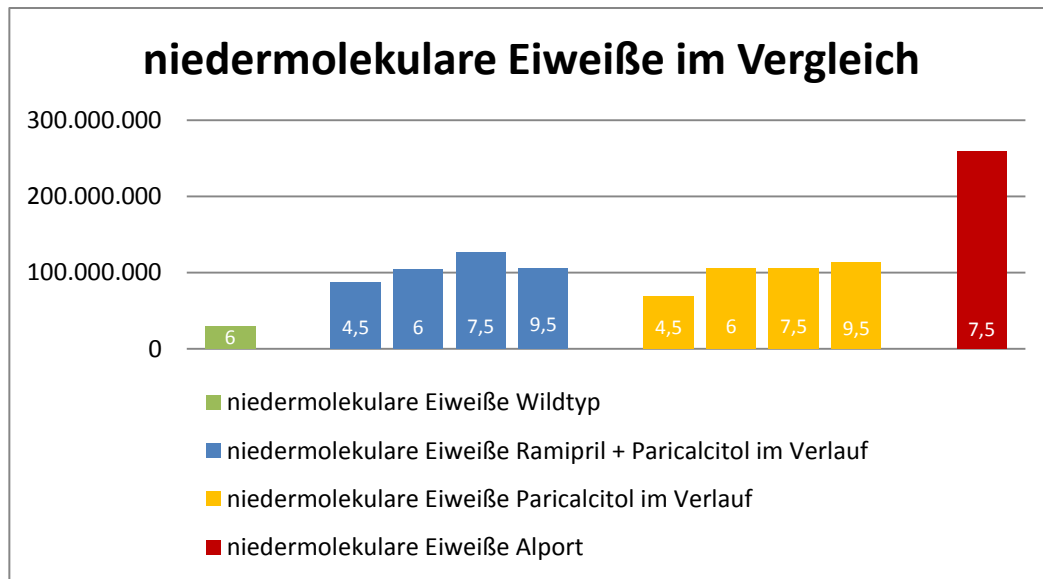


Abbildung 18: Vergleich der niedermolekularen Eiweißfraktionen beider Proteingele

In den Proteinfractionen der hochmolekularen Eiweiße sowie Albumin zeigen sich im Verlauf erhöhte Werte der Mäuse, die eine Paricalcitol Monotherapie erhielten gegenüber jenen, die von einer Doppelbehandlung mit Paricalcitol und Ramipril profitieren konnten. Während zu Beginn der Therapie die Proteinurien beider Behandlungsgruppen noch annähernd gleich groß sind (Woche 4,5), steigt diese im Verlauf (Woche 6 – 9,5) bei der Paricalcitol-Gruppe deutlich an, während bei der Ramipril + Paricalcitol-Gruppe nur ein geringer Anstieg zu verzeichnen ist.

Anders verhält es sich bei der niedermolekularen Eiweißfraktion. Hier verlaufen die Kurven beinahe gleich mit nur minimal größeren Werten der niedermolekularen Eiweiße bei der ACE/PC-Gruppe.

3.3 Westernblot / TGF- β und CTGF im Nierengewebe

Der Westernblot dient dem Nachweis entzündungsassoziierter Proteine im Nierenzellsat. Die in dieser Arbeit zu untersuchenden Proteine sind TGF- β und CTGF. Nach der densitometrischen Quantifizierung der beiden Proteinfractionen wurden diese über die entsprechenden Aktin-Kontrollen (siehe Abbildung 19) normiert.

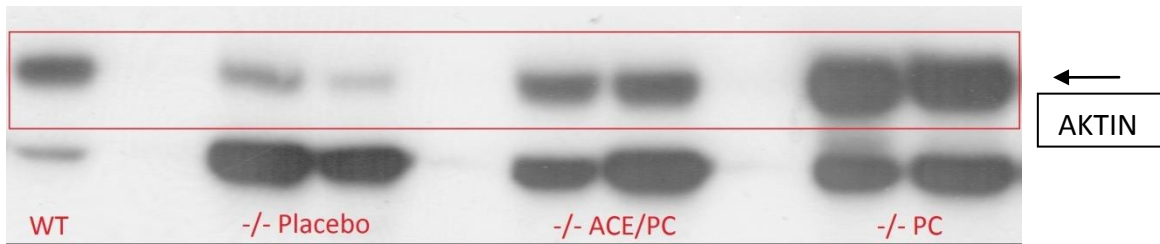
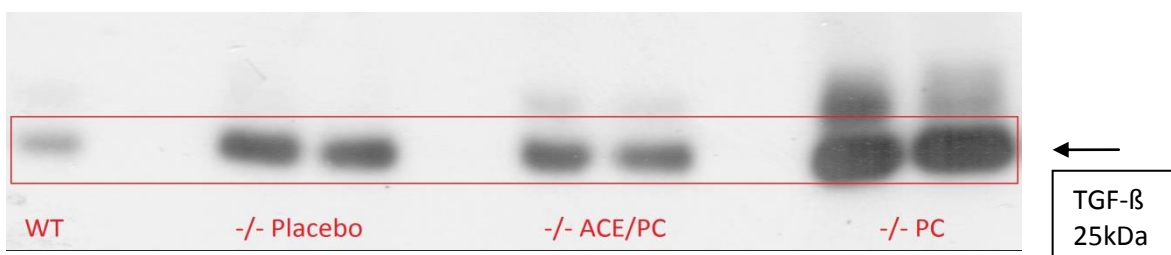
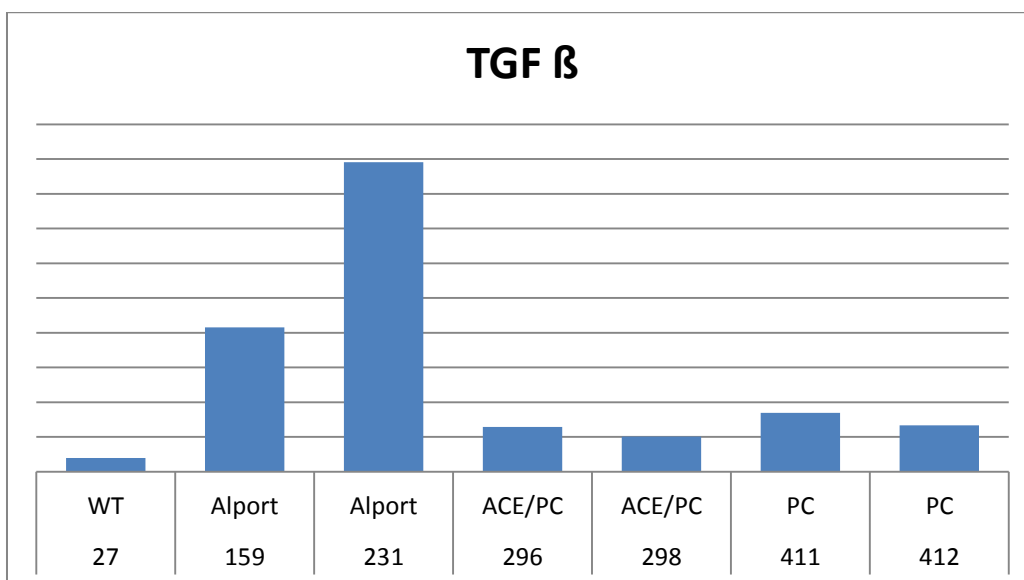


Abbildung 19: Westernblot Aktin

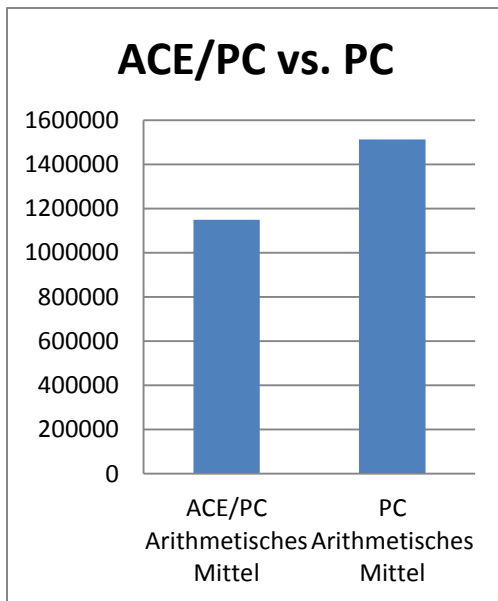
Die folgende Abbildung zeigt den entwickelten Röntgenfilm nach Immundetektion mit einem TGF- β spezifischen peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper.

Abbildung 20: Westernblot TGF- β

Nach der Normierung über die Aktin-Kontrolle zeigte sich die folgende quantitative Verteilung von TGF- β :

Abbildung 21: TGF- β normiert über Aktin

Es fällt auf, dass sich bei beiden Behandlungsgruppen ein deutlich niedrigerer TGF- β -Level im Vergleich zu den unbehandelten Mäusen zeigt.



Beim direkten Vergleich beider Therapiegruppen zeigt sich ein leicht erniedrigter TGF- β -Level bei den mit Ramipril + Paricalcitol behandelten Mäusen.

Abbildung 22: TGF- β -Level Behandlungsgruppen im Vergleich

Die folgende Abbildung zeigt den entwickelten Röntgenfilm nach Immundetektion mit einem CTGF spezifischen Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper.

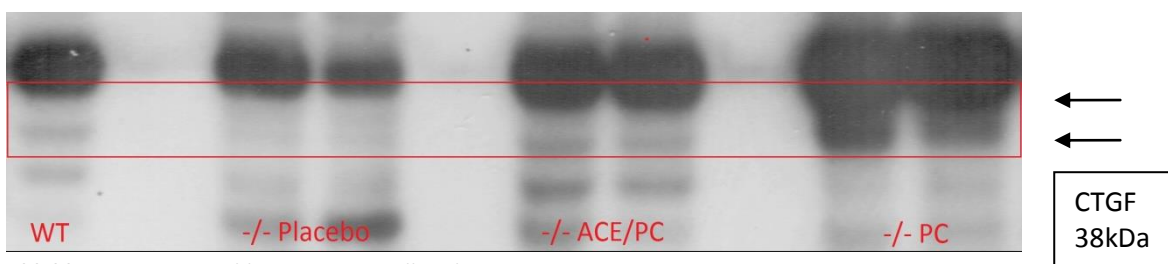


Abbildung 23: Western blot CTGF, Doppelbande

Nach der Normierung über die Aktin-Kontrolle zeigte sich die folgende quantitative Verteilung von CTGF:

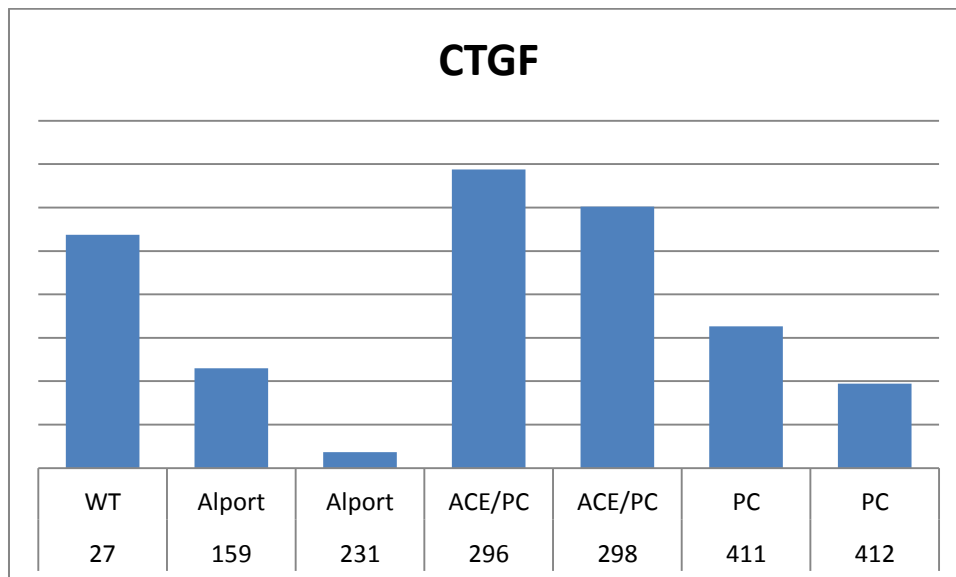


Abbildung 24: CTGF normiert über Aktin

Sowohl die gesunde Wildtyp-Maus als auch die Tiere aus den Behandlungsgruppen präsentieren deutlich erhöhte CTGF Werte im Vergleich zu den unbehandelten Alport-Mäusen.

3.4 Harnstoffwerte im Serum

Bei allen Tieren, die sich in den „Tötungsgruppen“ befanden, wurde versucht im Rahmen der Nephrektomie eine Blutentnahme durchzuführen. Das gewonnene Blut wurde auf Serumharnstoff untersucht.

Bei den monotherapierten Paricalcitol-Mäusen konnte nicht genügend Blut gewonnen werden, sodass für diese Behandlungsgruppe keine Harnstoffwerte zur Verfügung stehen.

Mausnummer	Alter	Genotyp	Therapie	Harnstoff In BUN	Harnstoff in mg/dl
296	9,5 W	Col4A3 -/-	Paricalcitol + Ramipril	40,2	86,0
298	9,5W	Col4A3 -/-	Paricalcitol + Ramipril	38,6	82,6
566	9,5 W	Col4A3 -/-	Paricalcitol + Ramipril	39,6	84,7
340	9.5W	Col4A3 -/-	Ramipril	58,6	125,4
358	6 W	Col4A3 -/-	Ramipril	57,8	123,7
367	6 W	Col4A3 -/-	Ramipril	41,6	89,0
34	7,5 W	WT	Placebo	24,9	53,3
28	9,5 W	WT	Placebo	29,0	62,1
2841	7,5 W	Col4A3 -/-	Placebo	98,8	211,4
2842	7,5 W	Col4A3 -/-	Placebo	141,9	303,7
3217	7,5 W	Col4A3 -/-	Placebo	91,2	195,2

Tabelle 10: Harnstoffwerte im Serum in mg / dl

Bei der Wildtyp-Kontrollgruppe ließ sich ein mittlerer Harnstoffwert von 57,7 mg/dl (n=2) bestimmen, während sich bei den unbehandelten Alport-Mäusen mit einem Wert 236 mg/dl (n=3) viermal höhere Serumharnstoffwerte fanden.

In den Behandlungsgruppen zeigten sich erniedrigte Serumharnstoffwerte mit Ramipril 112,7 mg/dl sowie 84,43 mg/dl bei Ramipril + Paricalcitol (beide n=3).

Nachfolgend sind die Ergebnisse als Diagramm dargestellt.

Neben den mittleren Harnstoffwerten in mg/dl, die am Kopf der jeweiligen Säulen stehen, ist auch das mittlere Alter der untersuchten Tiere in Tagen (d) abgebildet.

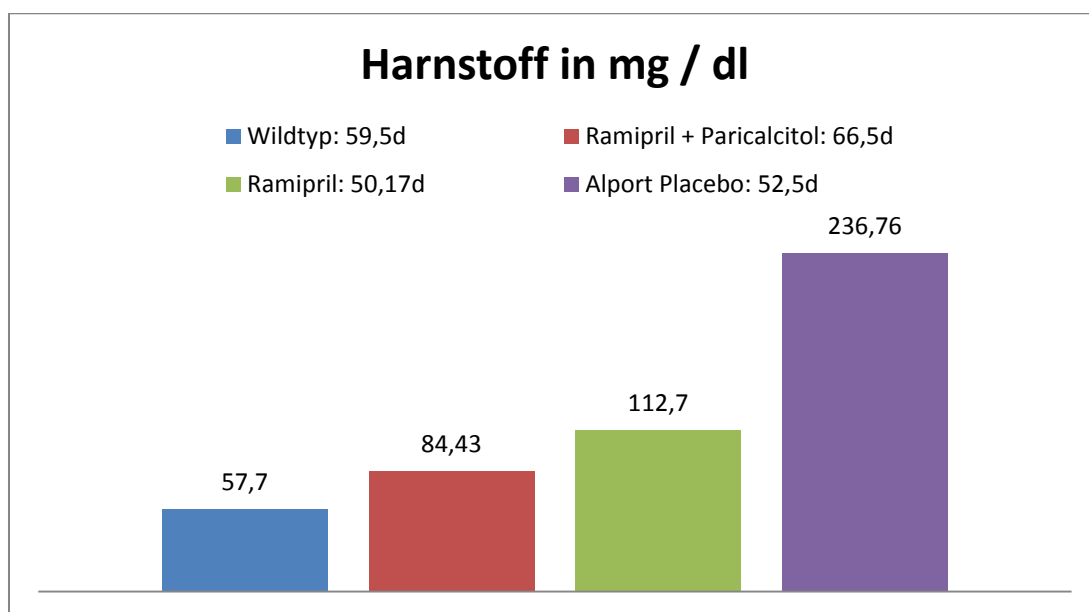


Abbildung 25: Harnstoffwerte im Serum in mg/dl

3.5 Immunhistochemie

Um ein histologisches bzw. morphologisches Korrelat zu den unter Therapie veränderten Überlebenszeiten und Entzündungsmarkern zu finden, wurden (wie in Punkt 2.5 beschrieben) 3 µm dicke Schnitte der Nieren angefertigt, immunhistochemisch mit Laminin bzw. Fibronectin markiert und anschließend unter einem Fluoreszenzmikroskop fotografiert.

Nachfolgend werden Normalbefund und Auffälligkeiten der Histomorphologie im mikroskopischen Bild der auf Laminin untersuchten Nieren dargestellt.

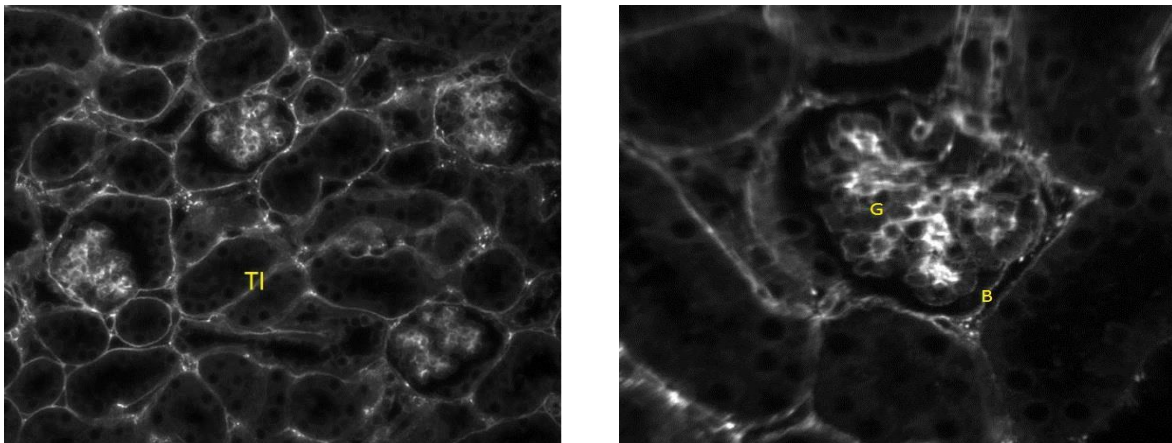


Abbildung 26:

Histologisches Bild einer gesunden 7.5 Wochen alten unbehandelten Wildtyp-Maus. Links 20fache, rechts 40fache Vergrößerung.

Es zeigt sich eine klar erkennbare, feine Struktur des Kapillarknäuels (G). Freies Lumen der Bowman-Kapsel (B). Klar erkennbare Struktur des Tubulointerstitiums (TI), schmales Interstitium ohne fibröse Verbreiterung, keine Fibroseinseln.

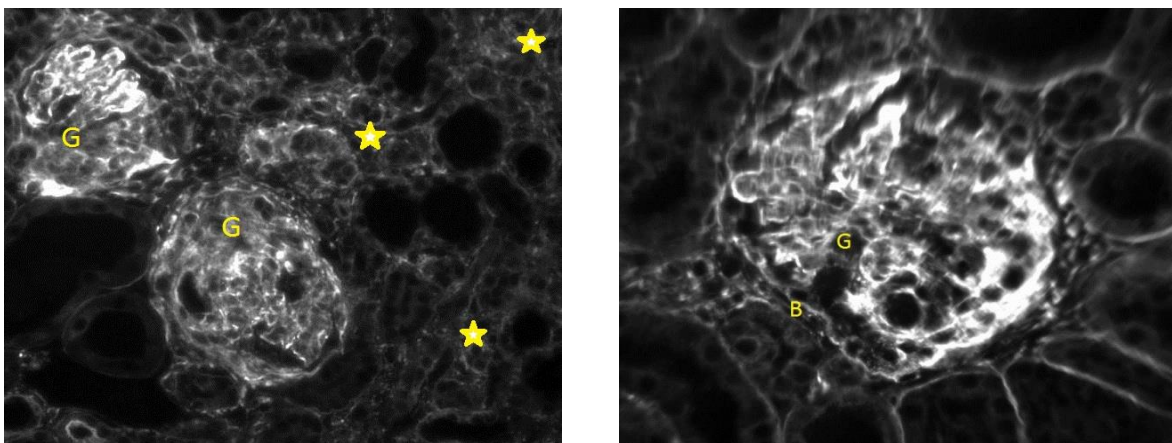


Abbildung 27:

Histologisches Bild einer 9.5 Wochen alten unbehandelten Alport-Maus. Links 20fache, rechts 40fache Vergrößerung. Struktur durch Fibrosierung aufgehoben, Hypertrophie der Glomeruli (G) mit glomerulärer Sklerose, Verschmelzung von Kapillarknäuel (G) und Bowman-Kapsel (B), breite bindegewebige Durchsetzung des Gewebes (☆).

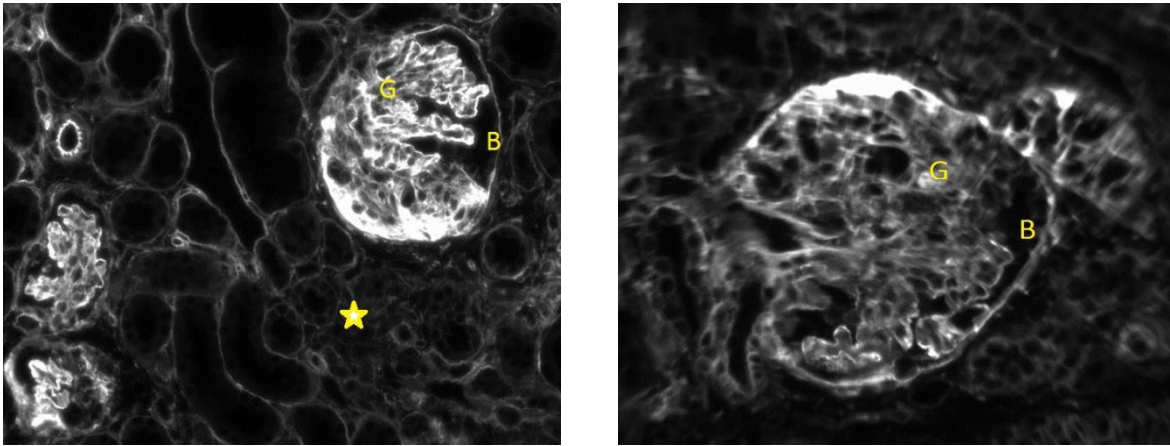


Abbildung 28:

Histologisches Bild einer 9.5 Wochen alten mit Paricalcitol behandelten Alport-Maus. Links 20fache, rechts 40fache Vergrößerung. Hypertrophie der Glomeruli (G) mit glomerulärer Sklerose, jedoch deutlichere Abgrenzung von Kapillarknäuel (G) und Bowman-Kapsel (B) sowie der glomerulären Struktur möglich als in Abbildung 9. Stellenweise große bindegewebige Durchsetzung des Tubulointerstitiums (☆).

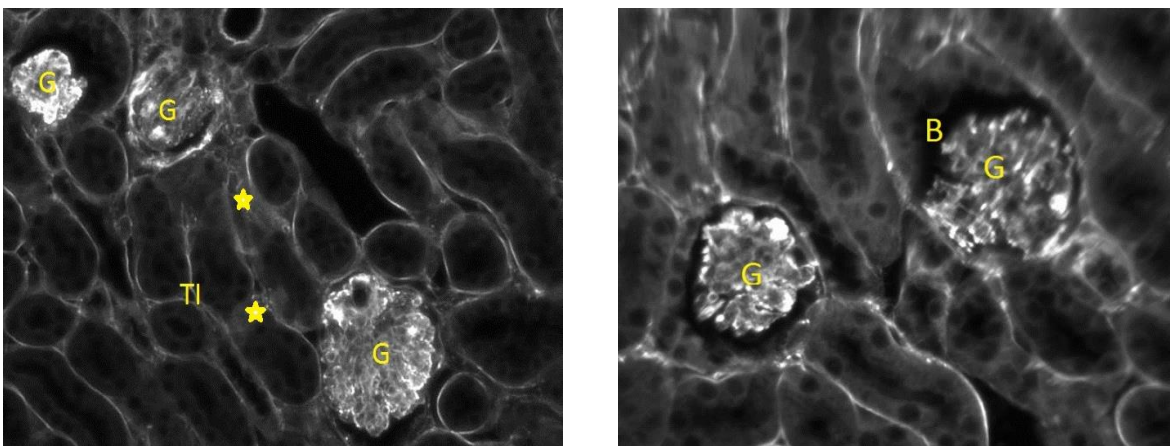


Abbildung 29:

Histologisches Bild einer 9.5 Wochen alten mit Paricalcitol und Ramipril behandelten Alport-Maus. Links 20fache, rechts 40fache Vergrößerung. Beginnende Hypertrophie und Sklerosierung der Glomeruli (G), mit noch deutlicher Abgrenzung von Kapillarknäuel (G) und Bowman-Kapsel (B). Das Tubulointerstitium ist noch klar strukturiert (TI). Zarte, beginnende bindegewebige Umbildung des tubulointerstiellen Gewebes (☆).

Um eine objektivere Beurteilung der Fotografien (insgesamt 187 Bilder) hinsichtlich des glomerulären Sklerose- und des tubulointerstitiellen Fibrosegrades zu erreichen, wurden die Bilder in 10facher und 40facher Vergrößerung von je vier Mäusen der Behandlungsgruppen *PC* und *ACE/PC* sowie von den unbehandelten Alport-Mäusen (Genotyp - / -) und je drei Mäusen der *Wildtyp-Placebo* Kontrolle (Genotyp + / +) randomisiert und im Sinne einer einfach Blindstudie fünf unabhängigen Personen zum Beurteilen bzw. „scoren“ vorgelegt (Siehe Punkt 2.5.1).

Die Einteilung erfolgte unter Berücksichtigung festgelegter Bewertungskriterien in vier Gruppen (0 bis 3).

Nachfolgend sind die Mittelwerte der *Scorerpunkte (SP)* der Laminin markierten Nierenschnitte aufgelistet.

Mausnummer	21	34	41	152	159	296	298	306
Genotyp	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Behandlung	Placebo	Placebo	Placebo	Placebo	Placebo	ACE/PC	ACE/PC	Placebo
Score (SP)	0.4	0.45	0.21	1.5	2.13	0.94	1.06	2.44

Tabelle 11: Immunhistochemie-Score (a): Laminin x10

Mausnummer	308	394	395	411	412	564	566
Genotyp	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Behandlung	Placebo	PC	PC	PC	PC	ACE/PC	ACE/PC
Score (SP)	2.08	1.89	2.35	1.53	1.55	1.44	1.16

Tabelle 12: Immunhistochemie-Score (b): Laminin x10

Mausnummer	21	34	41	152	159	296	298	306
Genotyp	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Behandlung	Placebo	Placebo	Placebo	Placebo	Placebo	ACE/PC	ACE/PC	Placebo
Score (SP)	0.25	0.2	0.04	1.65	2.18	1.07	1.38	2.23

Tabelle 13: Immunhistochemie-Score (a): Laminin x40

Mausnummer	308	394	395	411	412	564	566
Genotyp	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Behandlung	Placebo	PC	PC	PC	PC	ACE/PC	ACE/PC
Score (SP)	2.37	1.75	1.92	1.47	1.43	1.1	0.98

Tabelle 14: Immunhistochemie-Score (b): Laminin x40

Die Auswertung der Scores zeigt bei Betrachtung der Wertetabellen, dass sowohl bei der 10fachen als auch bei der 40fachen Vergrößerung ein Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen hinsichtlich des Fibrosegrades festgestellt wurde.

Zur besseren Veranschaulichung sind die Mittelwerte im Folgenden als Diagramm aufgeführt.

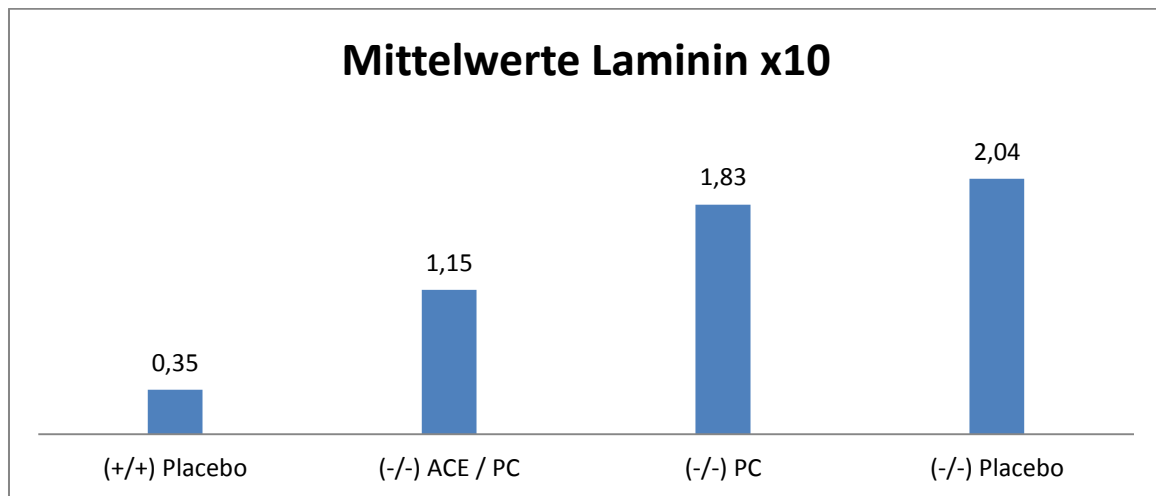


Abbildung 30: Immunhistochemie-Score: Mittelwerte Laminin x 10

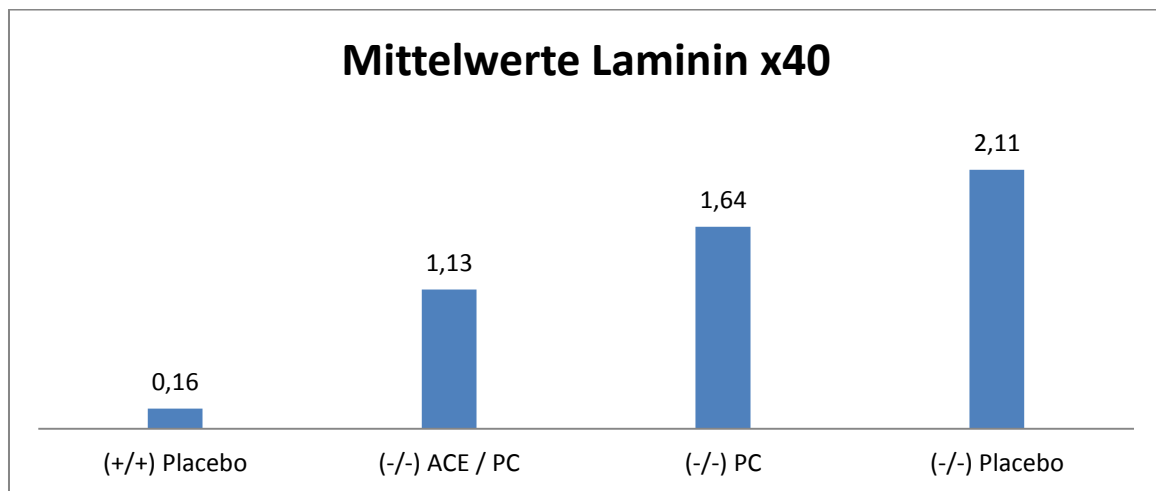


Abbildung 31: Immunhistochemie-Score: Mittelwerte Laminin x 40

Nachfolgend werden Normalbefund und Auffälligkeiten der Histomorphologie im mikroskopischen Bild der auf Fibronektin untersuchten Nieren dargestellt.

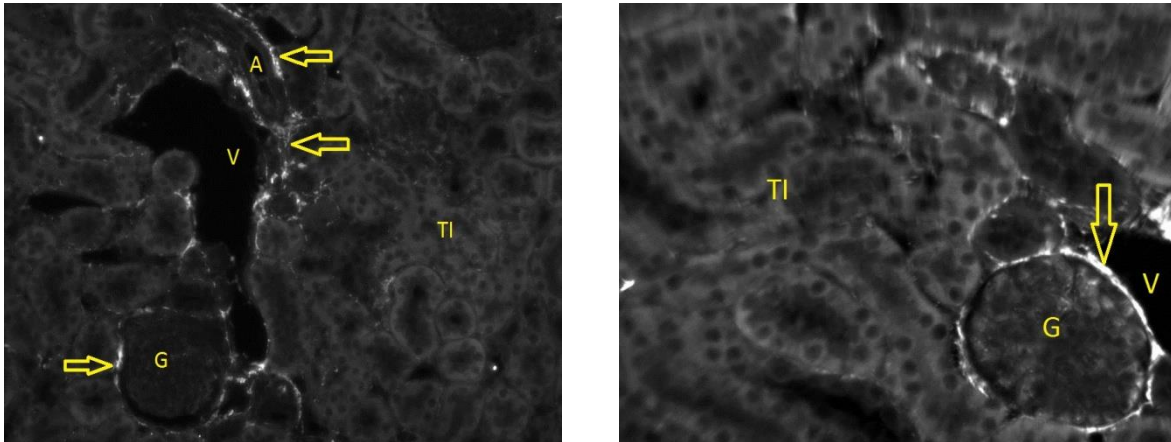


Abbildung 32:

Histologisches Bild einer gesunden 9.5 Wochen alten unbehandelten Wildtyp-Maus. Links 20fache, rechts 40fache Vergrößerung. Es finden sich vereinzelt, zarte Signalanreicherungen (Pfeile) um Glomeruli (G) und Gefäße (A, V). Im Tubulointerstitium (TI) finden sich keine Fibrosestraßen. Normalbefund.

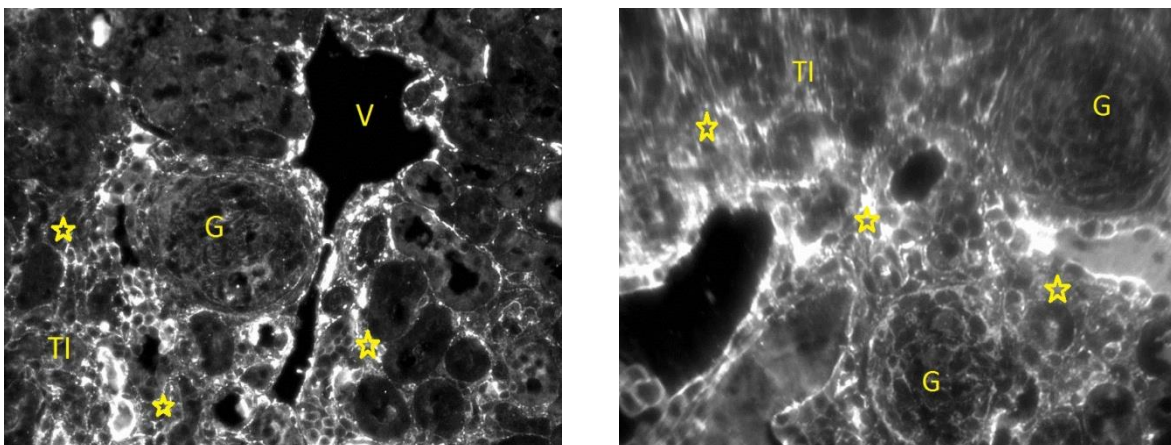


Abbildung 33:

Histologisches Bild einer 7.5 Wochen alten unbehandelten Alport-Maus. Links 20fache, rechts 40fache Vergrößerung. Breite, narbig-fibrotische Umbauten des Gewebes (☆), mit starker Signalanreicherung unter Aufhebung der tubulointerstitiellen Architektur (TI). Glomeruli (G), venöses Gefäß (V)

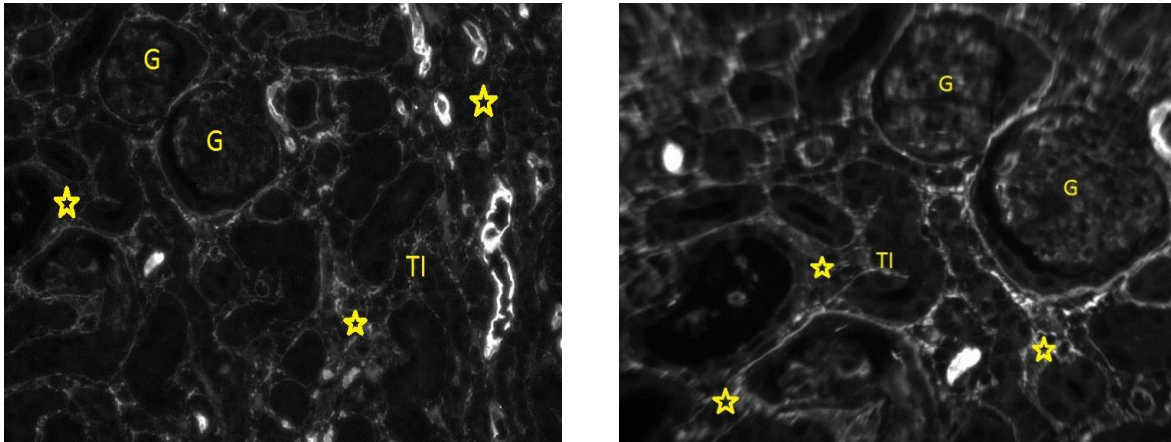


Abbildung 34:

Histologisches Bild einer 9.5 Wochen alten mit Paricalcitol behandelten Alport-Maus. Links 20fache, rechts 40fache Vergrößerung. Deutliche Fibrosestraßen (☆) im Interstitium (TI) mit beginnender Verdrängung des Nierengewebes. Noch vorhandene, gut erkennbare tubulointerstitielle Strukturen. Glomeruli (G).

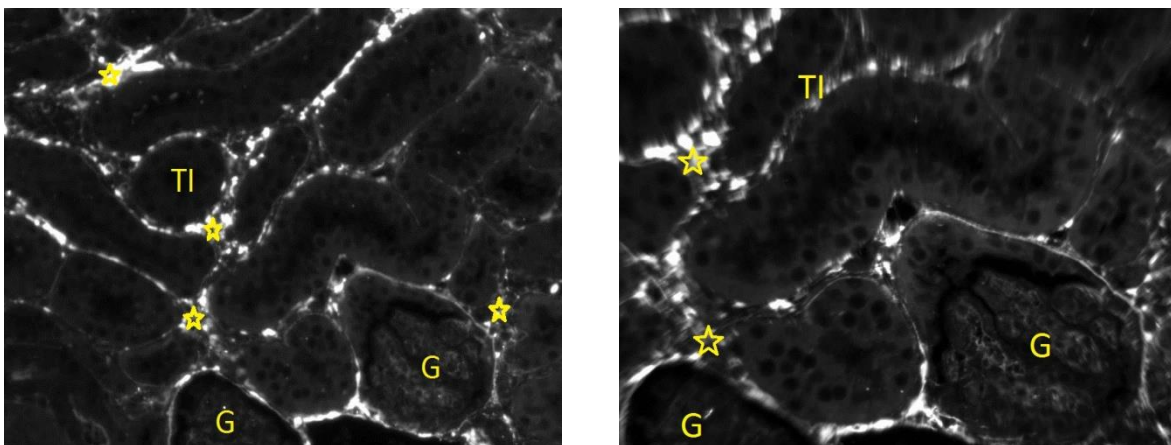


Abbildung 35:

Histologisches Bild einer 9.5 Wochen alten mit Paricalcitol und Ramipril behandelten Alport-Maus. Links 20fache, rechts 40fache Vergrößerung. Zarte, peritubuläre Signalanreicherungen (☆). Keine Fibrosestraßen. Klare Struktur des Tubulointerstitium (TI). Glomeruli (G).

Nachfolgend sind die Mittelwerte der Scorerpunkte (SP) der fibronektinmarkierten Nierenschnitte aufgelistet.

Mausnummer	21	22	34	152	159	288	296	298
Genotyp	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Behandlung	Placebo	Placebo	Placebo	Placebo	Placebo	Placebo	ACE/PC	ACE/PC
Score (SP)	0.21	0.06	0.09	1.8	2.33	2.13	0.39	1.08

Tabelle 15: Immunhistochemie-Score (a): Fibronektin x10

Mausnummer	306	394	395	411	412	564	566
Genotyp	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Behandlung	Placebo	PC	PC	PC	PC	ACE/PC	ACE/PC
Score (SP)	2.48	1.8	2.03	2.14	2.07	0.96	1.19

Tabelle 16: Immunhistochemie-Score (b): Fibronektin x10

Mausnummer	21	22	34	152	159	288	296	298
Genotyp	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Behandlung	Placebo	Placebo	Placebo	Placebo	Placebo	Placebo	ACE/PC	ACE/PC
Score (SP)	0.32	0.32	0.3	1.87	1.98	1.97	1.3	1.17

Tabelle 17: Immunhistochemie-Score (a): Fibronektin x40

Mausnummer	306	394	395	411	412	564	566
Genotyp	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Behandlung	Placebo	PC	PC	PC	PC	ACE/PC	ACE/PC
Score (SP)	2.47	1.76	1.67	1.8	1.72	1.76	1.5

Tabelle 18: Immunhistochemie-Score (b): Fibronektin x40

Die Auswertung der Scores zeigt hier ebenfalls bei Betrachtung der Wertetabellen, dass sowohl bei der 10fachen als auch bei der 40fachen Vergrößerung ein Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen hinsichtlich des Fibrosegrades festgestellt wurde.

Jedoch besteht – insbesondere bei der 10fachen Vergrößerung – nur ein geringer Unterschied zwischen paricalcitolbehandelter und unbehandelter Alport-Maus.

Die Differenz zwischen ACE/PC-Gruppe und der unbehandelten Alport-Kontroll-Gruppe ist jedoch dafür umso ausgeprägter.

Im Nachfolgenden sind die Mittelwerte zur besseren Veranschaulichung als Diagramm aufgeführt.

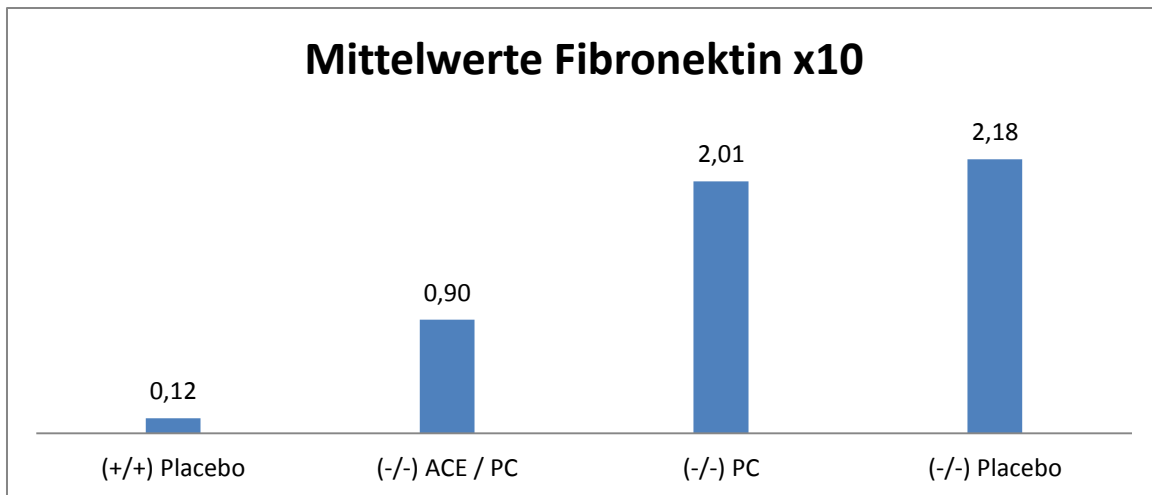


Abbildung 36: Immunhistochemie-Score: Mittelwerte Fibronektin x10

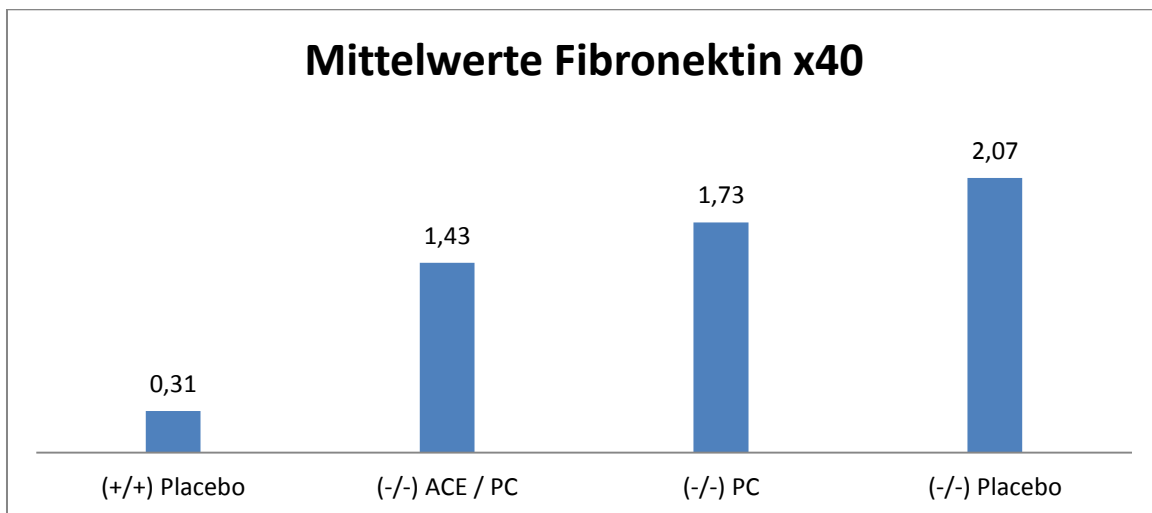


Abbildung 37: Immunhistochemie-Score: Mittelwerte Fibronektin x40

Die unbehandelten Alport-Mäuse zeigten sowohl bei der Untersuchung der lamininmarkierten Glomeruli (2.04 sp - 2.11 sp) als auch im fibronektinmarkierten Bindegewebe (2.18 sp – 2.07 sp) Umbauten im mikrostrukturellen Bereich mit periglomerulärer und tubulointerstitieller Fibrose bei einer deutlichen Zunahme der extrazellulären Matrix (Abb. 27 + Abb. 33). Bei den Wildtyp-Mäusen fanden sich hingegen keine Veränderungen (0.35 sp - 0.16 sp Laminin / 0.12 sp - 0.31 sp Fibronektin).

(Abb. 26 + Abb. 32)

Bei Dualtherapie zeigte sich ein eindeutiger antifibrotischer Effekt (1.15 sp - 1.13 sp Laminin / 0.90 sp - 1.43 sp Fibronektin) mit Aufrechterhaltung der glomerulären Architektur (Abb. 29 + Abb. 35).

Unter Paricalcitol-Monotherapie war der Effekt geringer ausgeprägt (Abb. 28 + Abb. 34) (1.83 sp – 1.64 sp Laminin / 2.01 sp – 1.73 sp Fibronektin).

4. Diskussion

4.1 Zielsetzungen

Das Alport-Syndrom ist weltweit eine relativ häufige Ursache für terminales Nierenversagen bei Kindern mit einer geschätzten Prävalenz von 1 : 5.000 (GROSS und WEBER 2005).

Ferner sind in den westlichen Industrieländern 2,3% aller im Kindesalter vorgenommenen Nierentransplantationen sowie 1,9% aller durchgeführten Dialyseverfahren bei pädiatrischen Patienten auf die Erkrankung mit dem AS zurückzuführen (RHEAULT 2012).

Das Etablieren neuer Therapieansätze ist daher nicht nur für am AS erkrankte Patienten, sondern auch aus sozioökonomischer Sicht erstrebenswert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden der ACE-Hemmer Ramipril sowie der selektive Vitamin-D-Rezeptor-Aktivator Paricalcitol in Mono- und Dualtherapie hinsichtlich ihrer nephroprotektorisches bzw. antifibrotischen Potentiale untersucht.

Die Studie wurde an SVJ129-Mäusen durchgeführt, die durch einen Knockout des COL4A3-Gens am Alport-Syndrom erkranken und unbehandelt innerhalb von 10 Wochen am terminalen Nierenversagen versterben.

Im Fokus der Untersuchung stand die Frage, ob sich mit Paricalcitol ein Wirkstoff finden lässt, der in Mono- bzw. Dualtherapie (mit Ramipril) das Überleben der erkrankten Tiere verlängert und das Voranschreiten der progredienten Nierenfibrose verlangsamt.

4.2 Wirkung von Ramipril und Paricalcitol auf die Proteinurie

Durch die semiquantitative Bestimmung der Proteinurie durch Protein-Uringele soll ein Verlaufparameter der Behandlung bzw. der Nierenfunktionen der zu untersuchenden Tiere geschaffen werden.

Wie Abbate et al. (2006) zeigen konnten, spielen Proteine wie Albumin, IgG oder Transferrin, die aufgrund einer geschädigten kapillär-glomerulären Barriere in den Primärharn filtriert werden eine wichtige Rolle beim Voranschreiten tubulointerstitieller Schäden.

Dies kann entweder direkt – durch eine Aktivierung des Komplementsystems – oder indirekt über eine monozytär vermittelte interstitielle Fibrose geschehen (ABBATE et al. 2006).

Die Proteinurie ist damit also nicht nur als Symptom einer progredienten Nephropathie, sondern vielmehr auch als Auslöser für weitere tubulointerstitielle Schäden zu verstehen.

Abhängig von molekularer Größe bzw. Gewicht der Proteine wurden drei Proteinfractionen eingeteilt: hochmolekulare Eiweiße (>69kDa), Albumin (=66 – 69 kDa) und niedermolekulare Eiweiße (<66kDa).

Die Werte der gemessenen Proteinfractionen werden im Folgenden einzeln diskutiert.

Bei den mit Paricalcitol behandelten Mäusen zeigt sich eine im Verlauf stetig zunehmende Proteinurie aller Proteinfractionen. Die maximalen densitometrischen Dichtewerte liegen jedoch auch im Alter von 9.5 Wochen unter jenen der 7.5 Wochen alten unbehandelten Alport-Maus.

Es kann also von einer abgeschwächten Proteinurie unter Paricalcitoltherapie ausgegangen werden.

Der gleiche Effekt wurde bereits in einer retrospektiven klinischen Studie beobachtet, bei der eine Abnahme der Proteinurie unter Paricalcitoltherapie bei 220 Patienten mit chronischem Nierenversagen im Stadium 3-4 belegt werden konnte (AGARWAL et al. 2005). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Paricalcitol – durch Effekte, die im Folgenden noch zu diskutieren sind – in Monotherapie zu einer mildereren Proteinurie führt und einen positiven Effekt auf das Voranschreiten der chronischen Niereninsuffizienz hat.

Die genauere Betrachtung der einzelnen Proteinfractionen der mit Paricalcitol behandelten Mäuse zeigt, dass im Vergleich zu den jeweiligen Fraktionen der Alport-Maus qualitative und quantitative Unterschiede bestehen. Der über den Urin ausgeschiedene Anteil an hochmolekularen Eiweißen (Ratio 0,54) sowie von Albumin (Ratio 0,52) ist relativ größer als jener der niedermolekularen Eiweiße (Ratio 0,38).

Dies könnte darauf hindeuten, dass die nephroprotektiven Eigenschaften des Paricalcitols im tubulointerstitiellen System ausgeprägter sind als am Glomerulum und somit weiterhin eine Rückresorption jener Proteine, die in ihrer Molekülmasse kleiner 66kDa sind stattfinden kann.

Die prolongierte Erhaltung des zumindest partiell noch funktionstüchtigen tubulointerstitiellen Parenchyms lässt sich durch verminderte fibrotische Läsionen sowie durch eine geringere Ablagerung von interstitiellen Matrixkomponenten als Folge einer Paricalcitoltherapie unter fortschreitender Nierenfibrose im Rahmen des AS erklären (TAN et al. 2007).

Das Vorkommen von VDR sowohl im Tubulointerstitium als auch im Glomerulum legt eine direkte VDR vermittelte Wirkung des Paricalcitols nahe (ANDRESS 2007).

Bei den Tieren aus der Behandlungsgruppe Ramipril + Paricalcitol stellen sich ebenfalls im zeitlichen Verlauf ansteigende densitometrische Dichtewerte in den unterschiedlichen Proteinfractionen dar.

Der Anstieg und gleichzeitige Gipfel der Proteinuriewerte in Woche 7.5 ist am ehesten auf einen Fehler in der Methodik beim Anfertigen der Proteingele zurückzuführen.

Als mögliche Schwachstellen sind an dieser Stelle Verunreinigungen der Urinproben (beispielsweise durch Futterrückstände), eine lange Kühl- und Lagerdauer sowie das mehrmalige Auf- und Abtauen der Proben in Erwägung zu ziehen.

Aufgrund einer limitierten Anzahl an Versuchstieren und damit auch einer begrenzten Menge an Urin, konnte der Versuch nicht wiederholt werden.

Dennoch zeigt sich eine deutlich geringere Proteinurie im Vergleich zur unbehandelten Alport Maus.

Dies ist wenig überraschend, konnte doch bereits in vorausgegangenen Studien nachgewiesen werden, dass schon die alleinige Therapie mit einem ACE-Hemmer beim AS die Proteinurie reduziert (GROSS et al. 2004, GROSS und WEBER 2005).

Die genauere Betrachtung der einzelnen Proteinfractionen der mit Ramipril + Paricalcitol behandelten Mäuse zeigt, dass im Vergleich mit den jeweiligen Fraktionen der Alport-Maus quantitative und qualitative Unterschiede bestehen. Der über den Urin ausgeschiedene Anteil an niedermolekularen Eiweißen (Ratio 0,54) sowie von Albumin (Ratio 0,51) ist relativ größer als jener der hochmolekularen Eiweiße (Ratio 0,38).

Zwar lässt sich aus diesen Werten eine Nephroprotektion unter Ramipril-Paricalcitol-Therapie für das gesamte Nephron ableiten, jedoch waren die Proteine der hochmolekularen Eiweißfraktion mit einem Molekulargewicht größer 69kDa deutlich seltener in den Proteingelen zu finden.

Dies spricht dafür, dass die Barrierefunktion des Glomerulums länger aufrechterhalten und die Filtration großer Proteine verhindert werden konnte.

Die Tatsache, dass ACE-Hemmer einer glomerulären Hypertrophie bzw. einer Glomerulosklerose vorbeugen, wurde bereits in einer Vielzahl von Studien beschrieben (AMANN et al. 1993, AMANN et al. 1996). In einer Studie von Abbate et al. wird die Stabilisierung von Podocyten-Podocyten-Kontakten durch eine Angiotensin-II-Blockade als Hauptgrund für die Limitierung der abnormen Passage von Plasmaproteinen beschrieben (ABBATE et al. 2006).

Auch die Rückresorption von Albumin im proximalen Tubulus wird durch Angiotensin II beeinflusst.

In einer an Ratten mit diabetischer Nephropathie durchgeführten Studie konnte nachgewiesen werden, dass durch eine Hemmung bzw. Blockade von Angiotensin II mittels ACE-Inhibitoren oder Angiotensin II Typ I Rezeptorblocker (ARB) die im proximalen Tubulus stattfindende Endozytose von Albumin wieder induziert wird. Ursache ist eine durch Angiotensin II ausgelöste intrazelluläre Passagestörung der Endozytose sowie einer Herunterregulierung von Megalin, einem endozytotischen Rezeptor für Albumin (TOJO und KINUGASA 2012).

Beim Vergleich der Proteingele untereinander kann bereits ab Woche 6 ein erhöhtes Auftreten von Proteinen größer 66kDa (Albumin + hochmolekulare Eiweiße) im Urin der mit Paricalcitol behandelten Mäuse festgestellt werden, die in Woche 9.5 sogar doppelt so hoch ist wie bei den gleichaltrigen Mäusen aus der Ramipril-Paricalcitol-Gruppe.

Bei den niedermolekularen Eiweißen hingegen stellen sich über alle Messzeitpunkte annähernd gleich große Proteinmengen in beiden Behandlungsgruppen dar.

Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass die Paricalcitol-Therapie in beiden Gruppen das tubulointerstitielle Parenchym schützt und eine Rückresorption kleiner

Proteine weiterhin stattfinden kann. Diese Wirkung scheint unabhängig von einer gleichzeitigen Ramipril-Therapie zu sein.

Beim Schutz der glomerulären Filtrationsbarriere hingegen ist die Paricalcitol-Wirkung eher von untergeordneter Rolle. Die hier beobachteten Effekte lassen vielmehr auf eine Ramipril vermittelte Wirkung schließen.

4.3 Wirkung von Ramipril und Paricalcitol auf TGF- β und CTGF im Nierengewebe

Das Zytokin TGF- β ist multifunktionell und weist multiple Eigenschaften auf. Unter physiologischen Rahmenbedingungen kann es als eine Art Auto-Reparatur-Antwort des Körpers auf Verletzungen des Nierenparenchyms verstanden werden.

In Nephropathien kommt es hingegen zu einer überschießenden Exprimierung des profibrotischen TGF- β und dadurch zu einer Verschärfung des Krankheitsprozesses durch Fibrose.

TGF- β unterliegt einem äußerst komplexen Regulationsmechanismus und die Expression dieses Zytokins kann durch unterschiedliche Trigger hoch- oder runterreguliert werden.

Im Folgenden sollen die Ergebnisse im Einzelnen diskutiert werden:

In dieser Arbeit zeigten sich beim Auswerten des Western-Blots stark erhöhte TGF- β -Level im Nierenparenchym der unbehandelten Alport-Mäuse, während in beiden Therapiegruppen nur eine dezente Erhöhung im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe nachgewiesen werden konnte.

Die TGF- β -Werte waren bei der Alport-Gruppe um das 10 – 22fache höher als beim gesunden Wildtypen, während in der Ramipril-Paricalcitol-Gruppe eine 2 – 2,5fache Erhöhung bzw. eine 3,5 – 4,5fachen Erhöhung bei der Paricalcitol-Gruppe vorlagen.

In einer Studie von GROSS et al. (2005) konnte an einem Mausmodell für progressive Nierenfibrose bereits gezeigt werden, dass durch eine Ramipril-Therapie eine Herunterregulierung von TGF- β und damit ein verlangsamtes Fortschreiten der Nierenfibrose erreicht werden kann.

Der ACE-Hemmer Ramipril blockt über das Angiotensin-Converting-Enzyme die Umwandlung von Angiotensin I zu Angiotensin II, welches eine Expression von TGF- β vermittelt (MEZZANO et al. 2001).

Darüber hinaus spielt auch die unter Punkt 4.2 beschriebene Proteinurie eine Rolle bei der TGF- β -Bildung. In einer Arbeit, die die Rolle von TGF- β beim Alport-Syndrom untersuchte zeigte sich, dass zeitgleich mit dem Auftreten der Proteinurie auch die Gene für TGF- β hochreguliert wurden (SAYERS et al. 1999).

Den Beweis, dass diese Genexpression von TGF- β nicht nur in einem zufälligen zeitlichen Zusammenhang mit der Proteinurie steht sondern durch diese ausgelöst wird, konnten ABBATE et al. (2006) erbringen.

Dementsprechend könnte man darauf schließen, dass eine Reduktion der Proteinurie auch zu einer verminderten Produktion von TGF- β führt. Allerdings ist noch nicht abschließend geklärt, ob die Hochregulierung von TGF- β bei Proteinurie auf eine direkte Rezeptor-Ligand-Reaktion zurückzuführen ist.

Es gilt zwar als bewiesen, dass Albumin ligandenbindende TGF- β -Rezeptoren an kultivierten proximalen Tubuluszellen hochreguliert, jedoch scheint dieser Effekt am ehesten durch eine Albumin-induzierte lokale Angiotensin II Produktion ausgelöst zu werden (WOLF et al. 2004). Ein Großteil der TGF- β -supprimierenden Eigenschaften lässt sich also auf die Angiotensin-II-Blockade zurückführen und erklärt gleichzeitig, weshalb ACE-Hemmer anderen Antihypertensiva in der Therapie der chronischen Niereninsuffizienz überlegen sind.

Auch bei den Mäusen, die eine Monotherapie mit Paricalcitol erhielten, fanden sich erniedrigte TGF- β -Werte.

In einem Mausmodell für tubulointerstitielle Fibrose konnten Tan et al. (2006) nachweisen, dass sich unter Paricalcitoltherapie Zellproliferation und Apoptose verringern, die Fibroserate zurückging und sowohl TGF- β selber als auch die Expression seines Typ I Rezeptors herunter reguliert wird.

Desweiteren kamen TAN et al. zu dem Schluss, dass der TGF- β -Rezeptor überwiegend im Tubulointerstitium lokalisiert ist und dort somit der Hauptangriffspunkt für das profibrotische Zytokin liegt.

Die biologischen Effekte und Aktivitäten von Vitamin D werden durch den spezifischen Vitamin-D-Rezeptor vermittelt, dessen (Neu-)Bildung durch Paricalcitol induziert wird. Nach Aktivierung durch seinen Liganden formt der VDR einen heterodimeren Komplex mit dem Retinoid-X-Rezeptor und bindet an das so genannte *vitamin-D-response-element* (VDRE), welches an der Promoterregion seiner Zielgene lokalisiert ist. Somit wird eine Vielzahl von Genen induziert, die die diskutierten Effekte in der fibrosierten Niere auslösen.

TAN et al. konnten jedoch nicht abschließend klären, ob die TGF- β -Inhibition Ursache oder Konsequenz der reduzierten Fibrose durch Paricalcitol ist.

CTGF (*connective tissue growth factor*) wird bei fibroseassoziierten pathologischen Vorgängen (z.B. Atherosklerose, Lungen- oder Nierenfibrose) gebildet und spielt bei dabei ablaufenden biologischen Prozessen wie Zellzyklusregulationen, Apoptose oder Angiogenese eine wichtige Rolle. Die Bildung und Sezernierung von CTGF findet in den jeweiligen Zielgeweben durch spezialisierte Zelltypen statt und unterliegt einem äußerst komplexen Regulationsmechanismus (PHANISH et al. 2010, SANCHEZ-LOPEZ et al. 2009).

Die CTGF-Werte, die in dieser Arbeit bei den Mäusen aller Behandlungsgruppen bestimmt wurden, sind untypisch verteilt.

Die niedrigsten Werte finden sich bei den nicht therapierten Alport-Mäusen, die klinisch das auffälligste Krankheitsbild aufweisen. Im Gegensatz dazu präsentieren sich bei gesunden Wildtyp-Mäusen (2,5 – 14,5fache Erhöhung) und den Rampril+Paricalcitol-Mäusen (2,8 – 17,8fache Erhöhung) im Vergleich zu den Alport-Mäusen die höchsten CTGF-Spiegel. Die Paricalcitol-Mäuse zeigen eine 1,3 – 7 fache Erhöhung.

Die Verteilung der CTGF-Werte verläuft somit annähernd reziprok zu denen der TGF- β -Werte und zu dem klinischen Krankheitsverlauf. Auch nach mehrmaliger Neudurchführung des Western-Blots für CTGF blieben die Ergebnisse gleich.

Untersucht man diese Ergebnisse mit Hilfe der jüngsten sich mit CTGF befassenden Literatur und im Hinblick auf den aktuellen Stand der Forschung (PHANISH et al. 2010, SANCHEZ-LOPEZ et al. 2009), so muss man konstatieren, dass diese Ergebnisse am ehesten auf einen Fehler in der Methodik beim Durchführen des Western-Blots zurückzuführen sind.

Als mögliche Ursachen sind Verunreinigungen der Nierenbiopsien bzw. des Zelllysats, Fehler beim Anlegen der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese oder bei der Immundetektion denkbar.

4.4 Wirkung von Ramipril und Paricalcitol auf die Harnstoffwerte im Serum

Bei Harnstoff handelt es sich um ein Molekül, das als Endprodukt des Proteinkatabolismus anfällt, in der Leber aus Ammoniak synthetisiert und über die Niere ausgeschieden wird.

Durch den steten Verlust von funktionstüchtigem Nierenparenchym im Rahmen des AS kommt es zu einer Einschränkung der GFR und damit der Kapazität der Niere, das Blut von potentiell toxischen Komponenten zu befreien.

Zwar wirkt Harnstoff erst bei hohen Konzentrationen toxisch, ein Anstieg des Serumparameters geht aber mit einer gleichzeitigen Akkumulation potentieller biologisch aktiver Substanzen einher (sog. urämische Toxine), die organschädigend wirken können (VANHOLDER et al. 2008), sodass ansteigende Harnstoffwerte ein Maß für das voranschreitende Nierenversagen darstellen.

Erwartungsgemäß zeigten die gesunden Wildtyp-Mäuse in der vorliegenden Arbeit mit im Schnitt 57,7 mg/dl den niedrigsten, die unbehandelten Alport-Mäuse mit durchschnittlich 236,8 mg/dl einen etwa viermal so hohen und damit gleichzeitig auch den höchsten Harnstoffserumwert.

In den Behandlungsgruppen wiesen ACE/PC (84,4 mg/dl) behandelte Mäuse einen um 33% niedrigeren Serumharnstoff auf als jene Mäuse, die eine alleinige ACE-Therapie (112,7 mg/dl) erhielten (siehe Abb. 25).

Aus diesen Werten lässt sich ein Behandlungsvorteil aus der Kombination zwischen Ramipril und Paricalcitol gegenüber der Ramipril-Monotherapie erkennen.

Demnach führen Ramipril und Paricalcitol über ihre nephroprotektiven Effekte zu einer verlängerten Aufrechterhaltung der Nierenfunktion und somit auch zu niedrigeren Harnstoffwerten als sie bei den unbehandelten Alport-Mäusen zu beobachten sind.

Ergänzend dazu scheint die Doppeltherapie mit Ramipril und Paricalcitol bezüglich einer Urämie effektiver als eine reine Ramipriltherapie.

Allerdings ist die Höhe des Serumharnstoffes in der Regel nicht direkt proportional zum Grad der Nierenschädigung. Zum einen unterliegt Harnstoff nach freier Filtration im proximalen Tubulus einer passiven Rückresorption und gelangt so zurück in die Blutbahn (KLINKE und SILBERNAGL 2004). Zum anderen hängen die Harnstoffwerte im Blut stark von der Proteinaufnahme über die Nahrung ab. Auch Trinkmenge und Diurese sowie katabole oder anabole Stoffwechselforgänge sind von Bedeutung.

Da alle Versuchstiere unter gleichen Bedingungen gehalten und dementsprechend auch gleich ernährt wurden, spielen diese Faktoren jedoch eine untergeordnete Rolle.

4.5 Wirkung von Ramipril und Paricalcitol auf die mikrostrukturelle Nierenmorphologie

Die Lichtmikroskopie der gegen Laminin und Fibronectin immunhistochemisch markierten Nierenschnitte mit Darstellung und Beurteilung des Fibrosegrades, ist zusammen mit der Überlebenszeitanalyse die aussagekräftigste Untersuchung hinsichtlich des Therapieerfolges einer medikamentösen Therapie.

Typische mikrostrukturelle Veränderungen beim Alport-Syndrom sind Podozytenhypertrophie, Rigidität, Verdickung und Aufsplitterung der GBM sowie segmentale, glomeruläre Sklerose (HEIDET und GUBLER 2009). Ferner kommt es zu einer tubulointerstitiellen Fibrose (GROSS und WEBER 2005).

Die mikroskopische Untersuchung der Nierenpräparate zeigte eine periglomeruläre und interstitielle Fibrose bei den unbehandelten COL4A3-Knockout-Tieren mit glomerulärer Hypercellularität sowie einer Verdickung der Bowman-Kapsel (Abb. 27).

Diese zur Glomerulosklerose und –fibrose führenden Veränderungen gehen mit einem kompletten Nephronverlust einher und enden bei den Versuchstieren durchschnittlich nach 10 Wochen im terminalen Nierenversagen.

Bei den mit Ramipril und Paricalcitol doppelt behandelten Mäusen war die glomeruläre Architektur nach 10 Wochen noch gut erhalten (Abb. 29) und auch im Tubulointerstitium konnte zu diesem Zeitpunkt keine erwähnenswerte Fibrosierung und Ablagerung von Extrazellulärmatrix nachgewiesen werden (Abb. 35).

Zur objektiveren Beurteilbarkeit und besseren Vergleichbarkeit wurden Glomeruli und Tubulointerstitium von drei bzw. vier Tieren aller Behandlungsgruppen durch fünf

Untersucher im Sinne einer einfach-Blindstudie auf Glomerulosklerose und tubulointerstielle Fibrose untersucht.

Diese Ergebnisse bestätigten die lichtmikroskopischen Beobachtungen (siehe Punkt 3.5).

In Anbetracht dieser Resultate erscheint eine frühzeitig eingeleitete und lebenslange ACE-Hemmer-Therapie in Verbindung mit Paricalcitol zur Nephroprotektion beim AS als sinnvoll. Vergleichbare Studien stützen diese Vermutung (GROSS et al. 2003).

Mögliche Ursachen für den nephroprotektorisches Effekt des Ramiprils beim Alport-Syndrom wurden schon in den vorangegangenen Teilen dieser Arbeit diskutiert (siehe Punkt 4.2). Am ehesten ist dieser in einer Angiotensin-II-Blockade und der Aufrechterhaltung der glomerulären Filtrationsbarriere – beispielsweise durch Stabilisierung von Podozyten-Podozyten-Kontakten sowie einer mildereren Proteinurie – zu suchen (ABBATE et al. 2006).

Bei den mit Paricalcitol monotherapierten Mäusen konnte zwar im Vergleich zu den unbehandelten Alport-Mäusen ebenfalls eine partiell besser erhaltene glomeruläre Architektur sowie eine geringere Signalanreicherung im Tubulointerstitium dargestellt werden (Abb.28 + 34), jedoch war diese weniger deutlich als in der ACE/PC-Gruppe.

Vermittelt werden könnten die protektiven Effekte unter anderem durch einen Mechanismus, den TAN et al. in einer 2006 veröffentlichten Studie nachwies: In einem tierexperimentellen Modell für obstruktive Nephropathie konnte unter Paricalcitolbehandlung eine signifikante Inhibition der mRNA von Fibronectin sowie Kollagen I und III erzielt werden.

Diese extrazellulären Matrixkomponenten finden sich überwiegend im Tubulointerstitium und werden bei fibrotischen Umbauprozessen verstärkt gebildet.

Die Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen der Proteinbestimmung dieser Arbeit, bei der eine nephroprotektorisches stärkere Wirkung des Paricalcitol zugunsten des Tubulointerstitiums auffiel (vgl. Punkt 4.2).

Auch wenn sich in einzelnen Aufnahmen Hinweise finden lassen, die diese Arbeitshypothese stützten, konnte mittels des Laminin- und Fibronectin-Scores die stärkere Wirksamkeit von Paricalcitol im Tubulointerstitium nicht belegt werden (vgl. Abb. 30,31,36,37).

Eine mögliche Erklärung für die schwächere Wirksamkeit von Paricalcitol gegenüber einer Doppelbehandlung mit Ramipril findet man bei Betrachtung der Ätiologie des Alport-Syndroms.

Durch das Fehlen des Kollagen IV und den falschen Aufbau der GBM kommt es primär zu einer Schädigung des Glomerulums.

Proteinurie und tubulointerstielle Fibrose sind somit Folgen und nicht Ursachen der Erkrankung, weshalb eine Therapie, die der Aufrechterhaltung der GBM gilt effektiver als jene Therapie ist, welche lediglich die Folgeproblematik behandelt.

4.6 Wirkung von Ramipril und Paricalcitol auf die Überlebenszeiten

In früheren tierexperimentellen COL4A3-Knockout Studien konnte bereits gezeigt werden, dass eine ACE-Hemmer-Therapie das Überleben der Tiere signifikant verlängert (GROSS et al. 2003).

Ferner konnten vergleichbare Behandlungserfolge auch an pädiatrischen Alport-Patienten demonstriert, die Manifestation eines terminalen Nierenversagens verzögert werden (GROSS et al. 2012b).

Auch in dieser Arbeit zeigen die mit Ramipril behandelten COL4A3-Knockout-Mäuse ($98,9 \text{ d} \pm 13,5$) gegenüber den unbehandelten COL4A3-Knockout-Mäusen ($70,4 \text{ d} \pm 13,1$) eine signifikante Überlebenszeitverlängerung von durchschnittlich 40,47% (28,48 d), $p=0.000939$. Da die SVJ129-Mäuse des tierexperimentellen Modells dieser Arbeit eine nicht hypertensive progrediente Nierenfibrose ausbilden, sind die antihypertensiven Eigenschaften des Ramiprils als Erklärung für die verlängerte Überlebenszeit zu vernachlässigen. Die antifibrotische Wirkung scheint in Bezug auf die Nephroprotektion des Ramiprils von primärer Bedeutung zu sein.

Im Vergleich hierzu wiesen die mit Paricalcitol monotherapierten Tiere ($75,1 \text{ d} \pm 5$) gegenüber den unbehandelten Alport-Mäusen einen nicht signifikanten Überlebenszeitvorteil von im Durchschnitt 4,75 Tagen (6,75%) auf ($p=0.083124$).

In einer Studie von TENG et al. konnten höhere und statistisch signifikante Überlebenszeitvorteile von 20% bei chronisch haemodialysepflichtigen Patienten, die einer intravenösen VDRA-Therapie unterzogen wurden, bewiesen werden (TENG et al. 2005). Allerdings schränken sowohl die Unterschiede zwischen einem tierexperimentellen Ansatz und einer klinischen Studie, als auch die Abweichung in den Patientenzahlen ($n=8$ vs. $n=51.037$) die Vergleichbarkeit beider Studien ein.

Zudem sind in diesem Zusammenhang die voneinander abweichenden Pathomechanismen in Betracht zu ziehen, die zum haemodialysepflichtigen Nierenversagen führen können, sodass – abhängig vom Entstehungsort der Nierenschädigung – eine Paricalcitoltherapie unterschiedliche Therapieerfolge erzielen kann (vgl. Punkt 4.5).

Jene Tiere, die einer kombinierten Therapie aus Paricalcitol und Ramipril unterzogen wurden, wiesen den größten Überlebenszeitvorteil auf ($120 \text{ d} \pm 8,435$). Dies machte sich mit einer um durchschnittlich 70,5% (49,62d) verlängerten Überlebenszeit im Vergleich zu den unbehandelten Tieren bemerkbar.

In der Gegenüberstellung mit den Ramipril monotherapierten Mäusen wird ebenfalls eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit um 21,38% (21,14d $P=0,004575$) ersichtlich. Diese Daten bestätigen, dass eine kombinierte Therapie aus ACE-Hemmer und Vitamin-D-Rezeptor-Aktivator einer alleinigen Ramipriltherapie überlegen ist.

Unklar bleibt, weshalb Paricalcitol in Monotherapie nicht ausreichend nephroprotektiv wirksam ist, in Kombination mit Ramipril jedoch eine zusätzlich um 21,38% verlängerte Überlebenszeit bewirkt.

Die Möglichkeit einer Interaktion der Medikamente untereinander ist nach aktuellem Wissensstand unwahrscheinlich. Es finden sich weder Hinweise in der aktuellen wissenschaftlichen Literatur, noch ist eine Interaktion der Stoffwechselwege beider Präparate bekannt.

Dennoch bietet die Wirkungsweise des Paricalcitol Ansatz für verschiedene Arbeitshypothesen: Alle biologischen Aktivitäten des Vitamin D werden durch seinen spezifischen Vitamin-D-Rezeptor vermittelt. Solche Rezeptoren befinden sich im menschlichen Körper beispielsweise an Niere, Skelettmuskel, Gehirn, Prostata, Brust und Colon (ANDRESS 2007).

Nach der Aktivierung des VDR durch seinen Liganden (Vitamin D) beginnt eine Signalkaskade, die zur Transkription bestimmter Gene führt.

In der fibrotischen Niere kommt es zur massiven Herunterregulierung von VDR, sodass auch bei noch adäquat hohem Vitamin-D-Spiegel homöostatische und regulatorische Effekte nicht mehr ausreichend vermittelt werden. Unter Paricalcitoltherapie werden die VDR wiederhergestellt (TAN et al. 2006).

Da die Transkriptionswege im einzelnen noch weiter erforscht werden müssen und nicht vollends bekannt sind, besteht die Möglichkeit, dass durch diesen Mechanismus auch Gene aktiviert oder deaktiviert werden, die Metabolismus und Pharmakodynamik des Ramiprils beeinflussen.

Bekannt ist allerdings, dass Paricalcitol und Ramipril über verschiedene Mechanismen zur Senkung des TGF- β -Levels im Nierenparenchym führen. Auf Seiten des Ramiprils ist dies vornehmlich durch Hemmung des Angiotensin II zu erklären, während Paricalcitol zu einer verminderten Expression des TGF- β -Rezeptors führt.

Durch die unterschiedlichen Ansätze im TGF- β -Regelkreis können beide Medikamente zeitgleich hemmend auf das profibrotische Zytokin wirken, was sich günstig auf fibrotische Läsionen im Nierenparenchym auswirken und somit die synergistische Wirkung erklären würde.

Einen vielversprechenden Ansatz bietet darüber hinaus die Betrachtung der verschiedenen Angriffspunkte beider Medikamente. Während Ramipril stärker schützend auf das Glomerulum wirkt, scheint Paricalcitol eine gute Wirksamkeit im Bereich des Tubulointerstitiums zu besitzen (vgl. Punkt 4.2 und 4.5).

Da es sich beim Alport-Syndrom um eine glomeruläre Nephropathie handelt ist ein Behandlungsansatz, der primär am Glomerulum angreift, effektiver.

Bei alleiniger Paricalcitolgabe waren zwar Therapieerfolge bei Proteinurie, TGF- β -Level und Immunhistochemie sichtbar, jedoch führten diese nicht zu einem signifikant verlängerten

Überleben der Versuchstiere. Als Grund hierfür ist der ausgeprägte glomeruläre Schaden anzunehmen.

Bei Doppeltherapie führt Ramipril über eine Angiotensin-II-Blockade jedoch zur längeren Aufrechterhaltung der glomerulären Funktion, sodass sich die überwiegend im Tubulointerstitium stattfindenden Effekte des Paricalcitol besser manifestieren können.

4.7 Fazit, Ausblick und aktueller Stand der Forschung

Ziel der vorliegenden Studie war es, mit Hilfe eines tierexperimentellen Modells neue Therapieansätze für das Alport-Syndrom zu prüfen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten unter Paricalcitoltherapie protektive Effekte im Nierenparenchym bei den untersuchten COL4A3-Knockout-Mäusen demonstriert werden. Allerdings spiegelten sich diese Effekte nicht in einem signifikant verlängerten Überleben der Tiere wider.

Die Kombination beider Präparate hingegen verlängerte das Überleben der untersuchten Tiere um 70,5% und war der alleinigen Ramipriltherapie, die zurzeit bei Alportpatienten der medikamentösen Standardtherapie entspricht, überlegen.

Indes kommen Forschungsgruppen, die sich ebenfalls mit der Wirkung von Vitamin D bei chronischen Nierenerkrankungen beschäftigen, zu ungleichen Bewertungen hinsichtlich des Nutzens bzw. Risikos Vitamin-D-assoziierten Therapien.

Während einige Autoren kurative Effekte und positives Kosten-Nutzen-Potential von Paricalcitol und anderen Vitamin-D-Rezeptoraktivatoren bei Therapie des chronischen Nierenversagens hervorheben (DE ZEEUW et al. 2010, GAL-MOSCOVICI und SPRAGUE 2007, HOLICK 2005, NUIJTEN et al. 2010, TAN et al. 2006), weisen andere Arbeitsgruppen in Metaanalysen auch auf erhöhte Risiken für Hyperkalzämie und Hyperphosphatämie hin (PALMER et al. 2007, XU et al. 2013).

In Anbetracht der Ergebnisse dieser Arbeit und unter Einbeziehung des aktuellen Standes der Forschung, ist eine reine Paricalcitoltherapie beim Alport-Syndrom zurzeit trotz der beobachteten nephroprotektiven Effekte nicht sinnvoll.

Paricalcitol in Kombination mit Ramipril bietet hingegen einen vielversprechenden Ansatz für weitere klinische Studien.

In Zukunft sollten dementsprechend Nachforschungen bezüglich des genauen Wirkungs- bzw. Nebenwirkungsprofil von Paricalcitol im Nierenparenchym erfolgen.

Die verlängerten Überlebenszeiten gestatten allerdings schon jetzt eine erfolgsversprechende Aussicht auf neue medikamentöse Therapieansätze beim Alport-Syndrom.

5. Zusammenfassung

Das Alport-Syndrom ist eine bei Kindern auftretende hereditäre, progrediente, glomeruläre Nephropathie, die auf einer Kollagenbildungsstörung beruht und weltweit einen häufigen Grund für terminales Nierenversagen bei pädiatrischen Patienten darstellt (RHEAULT 2012). Die Erforschung und Etablierung neuer Behandlungsansätze ist sowohl für die betroffenen Familien als auch aus sozioökonomischer Sicht wünschenswert.

In dieser Studie wurde die svj129-Maus mit einem Knockout des COL4A3-Gens als Modell für am AS erkrankte Patienten gewählt.

An den COL4A3-Knockout-Mäusen, die unbehandelt innerhalb von 10 Wochen an Nierenversagen versterben, sollten die nephroprotektiven Effekte der Substanzen Ramipril und Paricalcitol untersucht werden.

Insgesamt wurden 116 Mäuse vom Typ svj129 behandelt und untersucht.

Davon hatten 32 Mäuse den Genotyp eines Wildtypen und 84 wiesen als Genotyp einen homozygoten COL4A3 Knockout auf. Die Knockout-Mäuse wurden in 4 Behandlungsgruppen unterteilt (Placebo, Ramipril, Paricalcitol, Ramipril + Paricalcitol). Die Ramipriltherapie wurde nach 4,5 Wochen begonnen und bis zum Lebensende durchgeführt, während die Paricalcitoltherapie in Woche 6 eingeleitet und in Woche 12 beendet wurde.

Der Urin der Tiere aus den Behandlungsgruppen *Paricalcitol* und *Ramipril + Paricalcitol* wurde auf den Proteingehalt semi-quantitativ untersucht.

In beiden Gruppen zeigte sich eine mildere Proteinurie im Vergleich zu den unbehandelten COL4A3 $-/-$ Mäusen. Bei der Gegenüberstellung beider Therapiegruppen fand sich eine geringer ausgeprägte Proteinurie der doppelt behandelten Mäuse. Darüber hinaus wirkte Paricalcitol relativ betrachtet stärker protektiv auf das Tubulointerstitium, während bei einer Kombination mit Ramipril das Glomerulum besser geschützt wurde.

Der TGF- β -Spiegel im Nierengewebe der untersuchten Tiere wurde mittels Western-Blot bestimmt. Das profibrotische Zytokin war in beiden Therapiegruppen im Vergleich zur nicht therapierten Alport-Maus erniedrigt. Auch hier war die Kombinationstherapie der alleinigen Paricalcitol-Therapie überlegen.

Bei Ramiprilgabe ist die Blockade von Angiotensin II für den erniedrigten TGF- β Level ursächlich. Paricalcitol hingegen bringt über die Hochregulierung von VDR eine intrazelluläre Kaskade in Gang, die über eine forcierte Transkription bestimmter Gene die TGF- β vermittelten Wirkungen im Tubulointerstitium inhibiert.

Die Auswertung der CTGF-Spiegel erbrachte widersprüchliche Ergebnisse. Die ermittelten Werte verliefen in allen Behandlungsgruppen reziprok zu den TGF- β -Leveln wie auch zum klinischen Krankheitsverlauf bzw. zu den Überlebenszeiten.

Bei der Harnstoffbestimmung wurden Ramipril/Paricalcitol behandelte Mäuse mit Ramipril Mäusen verglichen.

Bei dieser Gegenüberstellung konnte erstmals ein Nutzen der Kombination beider Medikamente gegenüber einer reinen Ramipriltherapie dargestellt werden, da die Ramipril/Paricalcitol Mäuse einen erniedrigten Harnstoffspiegel aufwiesen.

Bei der lichtmikroskopischen Auswertung der immunhistochemisch markierten Nierenschnitte konnte die Therapie auf mikrostruktureller Ebene überprüft werden.

Hinsichtlich einer abgeschwächten tubulointerstitiellen und glomerulären Fibrose waren beide Behandlungsgruppen (Ramipril/Paricalcitol und Paricalcitol) den unbehandelten Tieren (Placebo) überlegen.

Mit Auswertung der „Scores“, wurden die Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen herausgearbeitet und objektiviert. Es zeigten sich deutliche Vorteile bezüglich der Nephroprotektion bei doppelt behandelten Mäusen im Vergleich zur Monotherapie mit Paricalcitol.

Durch die Analyse der Überlebenszeiten, wurden die Therapieerfolge bestätigt.

In der Behandlungsgruppe Ramipril/Paricalcitol fanden sich signifikante Überlebenszeitvorteile gegenüber den unbehandelten sowie den allein mit Ramipril oder Paricalcitol therapierten Mäusen.

Bei letzteren konnte kein signifikanter Überlebenszeitvorteil gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe herausgearbeitet werden.

In Anbetracht der Ergebnisse dieser Arbeit und unter Einbeziehung des aktuellen Standes der Forschung bietet eine alleinige Paricalcitoltherapie derzeit keine erfolgsversprechende Behandlungsoption beim Alport-Syndrom.

Die erzielten Behandlungserfolge unter Kombinationstherapie mit Ramipril und Paricalcitol lassen hingegen einen vielversprechenden Ansatz für neue Therapien beim Alport-Syndrom erkennen, sodass hier in Zukunft weitere Studien folgen sollten.

6. Anhang Material und Methoden

Neben der Standardausstattung des Labors wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Reagenzien und Geräte verwendet:

Genotypisierung

Reagenz/Gerät	Bezeichnung
DNA-Extraktion	Qiagen DNeasy® Blood & Tissue Kit (Hilden, Deutschland)
DNA-Polymerase	Finnzymes F-100L (Vantaa, Finland)
Nukleotide	Invitrogen™ dATP, dCTP, dGTP, dTTP (je 100mM) (Darmstadt, Deutschland)
Col4A3 forward Primer	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) (Sequenz: 5'- CCT-GCT-AAT-ATA-GGG-TTC-GAG-A- 3')
Col4A3 reverse Primer	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) (Sequenz: 5'-CCA-GGC-TTA-AAG-GGA-AAT-CC-3')
Col4A3 mutant Primer	Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) (Sequenz: 5'-AAT-CGC-CAA-TGA-CAA-GAC-G-3')
Thermocycler	Biometra TProfessional (Goettingen, Deutschland)
Probenpuffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,03% Bromophenolblau, 60% Glycerol, 60 mM EDTA
Agarose	Biozym LE Agarose (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
TAE-Puffer	50x, 2 M Tris, 50 mM EDTA, 1 M Essigsäure
Ethidiumbromid	0,06%, Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Marker DNA-Bandengröße	Fermentas GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder (St.Leon-Rot, Deutschland)
UV-Analyzer	BioDoc Analyze (Hannover, Deutschland)

Proteinuriegele

Reagenz / Gerät	Bezeichnung
Chloroform	Sigma, 99+%
Methanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Zentrifuge	Hettich Mikro 200 R (Tuttlingen, Deutschland)
Reaktionsgefäße	Biozym, 1,5 mL (Hess. Oldendorf, Deutschland)

Pipetten	Eppendorf Research® (Hamburg, Deutschland)
Probenpuffer	Invitrogen™ NuPage® LDS Sample Buffer, 2x (Darmstadt, Deutschland)
Polyacrylamid-Fertiggel	Invitrogen™ 4-12% Tris-Glycine Gel, 1,5mm x 10 oder 15 well (Darmstadt, Deutschland)
Molekulargewichtsmarker	Invitrogen™ SeeBlue® Plus 2 Prestained Standard (Darmstadt, Deutschland)
Elektrophoresekammer	X Cell SureLock™, Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Laufpuffer	Invitrogen™ NuPage® MOPS SDS Running Buffer (Darmstadt, Deutschland)
Coomassie-Färbelösung	Roth, Roti Blue 5x (Karlsruhe, Deutschland)
Heizblock	Liebisch TR-L 288 (Bielefeld, Deutschland)
Elektrophorese-Netzteil	Consort E 741 (Turnhout, Belgien)
Scanner	Hewlett Packard Office Jet R 45
Programm zur densitometrischen Auswertung	Image J

Standards:

Als Molekulargewichtsmarker für Western Blot und Proteingele diente See Blue Plus 2 Pre-Stained Standard, Invitrogen (Darmstadt, Deutschland).

Apparent molecular weights of SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard on a NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris Gel w/MES

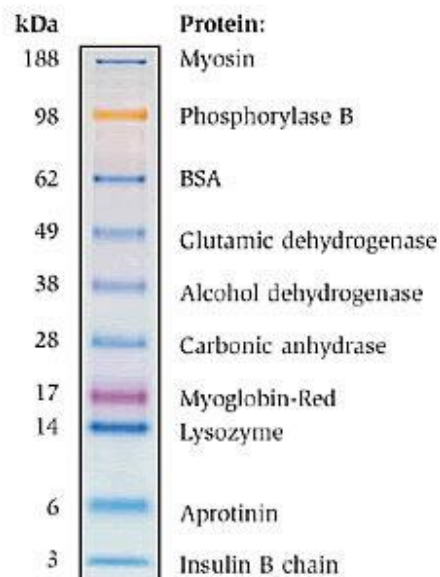


Abbildung 38: Bandenstruktur und Molekulargewichte des See Blue Plus 2 Pre-Stained Standards. Abbildungen und Angaben übernommen von Invitrogen (Darmstadt, Deutschland), (<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/LC5925?ICID=search-product>)

Western Blot

Gerät/Material	Bezeichnung
Homogenisator	Ultra-Turrax® T25, Jahnke und Kunkel (Staufen im Breisgau, Deutschland)
Lysepuffer	10 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,0), 10 mM EDTA, 5 mM EGTA, 10 mM MgCl ₂ , 50 mM β-Glycerolphosphat, 1 mM Natriumvanadat, 0,5 % NP-40, 0,1 % Brij-35, 1 mM PMSF, 10 μM Pepstatin, 10 μM Leupeptin
Glasröhrchen	Sarstedt Röhren 55.466 (Nümbrecht, Deutschland)
Reaktionsgefäße	Biozym, 1,5 mL (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Zentrifuge	Hettich Mikro 200 R (Tuttlingen, Deutschland)
BSA	PAA
Bradford-Reagenz	Bio Rad Protein Assay (München, Deutschland)
ELISA-Platte	Greiner bio-one, 96 well (Frickenhausen, Deutschland)
Photometer	BioTek Synergy™ HAT (Bad Friedrichshall, Deutschland)
Programm Extinktionsbestimmung	BioTek KC 4™ (Bad Friedrichshall, Deutschland)
Rechnerische Proteinkonzentrationsbestimmung	Microsoft Excel© 2007
Reduktionspuffer	Invitrogen™ NuPAGE® Sample Reducing Agent (10x) (Darmstadt, Deutschland)
Probenpuffer	Invitrogen™ NuPAGE® LDS Sample Buffer (2x) (Darmstadt, Deutschland)
Heizblock	Liebisch TR-L 288 (Bielefeld, Deutschland)
Molekulargewichtsmarker	Invitrogen™ SeeBlue® Plus 2 Prestained Standard (Darmstadt, Deutschland)
Polyacrylamid-Fertiggel	Invitrogen™ 4-12% Tris-Glycine Gel 1,5mm x 10 oder 15 well (Darmstadt, Deutschland)
Elektrophoresekammer	X Cell SureLock™ Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Elektrophorese-Netzteil	Consort E 741 (Turnhout, Belgien)
Blotting-Kammer	Bio-Rad Mini Protean™ (München, Deutschland)
Blotting-Netzteil	Bio-Rad Power Pac 1000™ (München, Deutschland)
Whatman-Papier	Bio-Rad Filter Paper™ (München, Deutschland)
Transferpuffer	Invitrogen™ NuPAGE® Transfer Buffer (Darmstadt, Deutschland)
PVDF-Membran	Bio-Rad Immun-Blot PVDF Membrane™ (München, Deutschland)

6. Anhang Material und Methoden

Methanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
TBST	10x, 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20, + HCl bis pH 7,6
Magermilchpulver	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Wippe	Heidolph Duomax 1030 (Schwabach, Deutschland)
TGF-Primärantikörper	Monoklonaler Antikörper aus Maus, R&D Systems, MAB240 (Minneapolis, MN)
CTGF-Primärantikörper	Polyklonaler rabbit-anti-mouse-Antikörper, Biovision, 5553R (Cambridge, UK)
Aktin-Primärantikörper	Polyklonaler rabbit-anti-mouse-Antikörper, Sigma-Aldrich, A2103 (Steinheim, Deutschland)
TGF-Sekundärantikörper	HRP-rabbit-anti-mouse, DAKO P0161 (Glostrup, Dänemark)
CTGF-Sekundärantikörper	HRP-goat-anti-rabbit, DAKO P0448 (Glostrup, Dänemark)
Aktin-Sekundärantikörper	HRP-goat-anti-rabbit, DAKO P0448 (Glostrup, Dänemark)
Chemolumineszenz-Reagenz, Lösung A	PerkinElmer, Western Lightning [®] Enhanced Luminol Reagent Plus (Massachusetts, USA)
Chemolumineszenz-Reagenz, Lösung B	PerkinElmer, Western Lightning [®] Oxidizing Reagent Plus (Massachusetts, USA)
Röntgenkassette	Fuji (Düsseldorf, Deutschland)
Röntgenfilm	Fuji Safelight Glass No. 8U (Düsseldorf, Deutschland)
Entwickler	Konica SRX 101 A (Langenhagen, Deutschland)
Scanner	Hewlett Packard Office Jet R 45 (Palo Alto, USA)
Programm Densitometrie	ImageJ
Stripping-Puffer	Thermo Scientific, Restore Western Blot Stripping Buffer (Waltham, Massachusetts)

Immunhistochemie

Reagenz / Gerät	Bezeichnung
Einbettkassetten	Kabe Labortechnik (Nümbrecht, Deutschland)
Formaldehyd	4% PFA in PBS
Entwässerung	Leica TP 1020 (Wetzlar, Deutschland)
Paraffinguss	Meditate Tissue Block Dispenser PAG 12
Wasserbad	Vieth, Mikrotome GmbH (Wiesmoor, Deutschland)

6. Anhang Material und Methoden

Mikrotom	Reichert Jung, AutoCut 2040 (Nussloch, Deutschland)
Objektträger	Menzel Superfrost 75x25 mm (Braunschweig, Deutschland)
Thermoplatte	Schütt, Göttingen
Trockenofen	Sanyo Convection Oven (Moriguchi, Japan)
Proteinase K	Qiagen, >600 mAU/mL (Hilden, Deutschland)
Tris-Puffer	50 mM, pH 7,4
Citrat-Puffer	Lsg. A: 4,2 g Citronensäuremonohydrat ad 200 mL dH ₂ O, Lsg. B: 14,7 g Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat ad 500 mL dH ₂ O; 9 mL Lsg. A + 41 mL Lsg. B + 450 mL dH ₂ O (pH 6,0)
TBS	10x, 50 mM Tris, 150 mM NaCl
BSA	PAA
Primärantikörper Laminin	Abcam, Rabbit-IgG, 11575v (Cambridge, England)
Primärantikörper Fibronectin	Acris, Mouse-IgG, BM 422 (Herford, Deutschland)
Normalserum	Invitrogen™, Goat-Serum (Darmstadt, Deutschland)
Sekundärantikörper Laminin	Jackson IR, Goat-anti-Rabbit-Cy3 (West Grove, PA)
Sekundärantikörper Fibronectin	Jackson IR, Goat-anti-Mouse-Cy3 (West Grove, PA)
Einbettungsmedium	DAKO Fluorescent Mounting Medium (Glostrup, Dänemark)
Deckgläser	Menzel, 24x24 mm (Braunschweig, Deutschland)
Mikroskop	Zeiss Axiovert S100 TV (Oberkochen, Deutschland)
Programm Mikroskopie	Olympus Cell^D (Tokyo, Japan)

Serumharnstoffanalyse

Reagenz/Gerät	Bezeichnung
Zentrifuge	Hettich Mikro 200 R (Tuttlingen, Deutschland)
Analyseautomat	Roche/Hitachi 917 (Basel, Schweiz)

Tiermodell

Reagenz / Gerät	Hersteller bzw. Produktname
Maus	Stamm SVJ129
Paricalcitol	Abbott (Chicago, Illinois, USA)
Ramipril Batch N205; MW: 416,51	Sanofi-Aventis (Paris, Frankreich)
Ethanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Injektionsspritzen	B-Braun Omnifix® 40-Solo (Sempach, Schweiz)
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Alle Strukturformeln in dieser Arbeit wurden angefertigt mittels Ketcher, Copyright © 2010-2013 GGA Software Services LLC (<http://ggasoftware.com/ketcher-demo/ketcher.html>)
- Alle Tabellen und Diagramme in dieser Arbeit wurden angefertigt mittels Microsoft Office®, Microsoft Corporation, Redmond, USA
- Die Abbildungen 2, 4, 8, 12, 19, 20, 23 sowie 26 – 35 wurden mittels Microsoft Paint®, Microsoft Corporation, Redmond, USA, erstellt oder modifiziert
- Abbildung 6 wurde mittels Statistica®, StatSoft, Tulsa, USA angefertigt
- Abbildung 7 wurde mittels GraphPad Prism®, GraphPad Software, Inc., San Diego, USA angefertigt

Abbildung 1: Strukturformel von Ramipril (li) und Ramiprilat (re)	11
Abbildung 2: Vitamin-D-Stoffwechsel	12
Abbildung 3: Strukturformel von Calcitriol (li) und Paricalcitol (re) im Vergleich	13
Abbildung 4: Bandenmuster bei Genotypisierung	21
Abbildung 5: Beispielbilder	28
Abbildung 6: Boxplot der Überlebenszeiten, Statistica ©	34
Abbildung 7: Kaplan-Meier-Kurve zur Darstellung der Überlebenszeiten, Graph-Pad Prism©	35
Abbildung 8: Proteingel Paricalcitol	37
Abbildung 9: Proteingel Paricalcitol: hochmolekulare Eiweiße	38
Abbildung 10: Proteingel Paricalcitol: Albumin	38
Abbildung 11: Proteingel Paricalcitol: niedermolekulare Eiweiße.....	38
Abbildung 12: Proteingel Ramipril + Paricalcitol.....	39
Abbildung 13: Proteingel Ramipril + Paricalcitol: hochmolekulare Eiweiße.....	40
Abbildung 14: Proteingel Ramipril + Paricalcitol: Albumin	40
Abbildung 15: Proteingel Ramipril + Paricalcitol: niedermolekulare Eiweiße	40
Abbildung 16: Vergleich der hochmolekularen Eiweißfraktionen beider Proteingele	42
Abbildung 17: Vergleich der Albuminfraktionen beider Proteingele	42
Abbildung 18: Vergleich der niedermolekularen Eiweißfraktionen beider Proteingele	43
Abbildung 19: Westernblot Aktin.....	44
Abbildung 20: Westernblot TGF-β	44
Abbildung 21: TGF-β normiert über Aktin.....	44
Abbildung 22: TGF-β-Level beider Behandlungsgruppen im Vergleich	45
Abbildung 23: Westernblot CTGF, Doppelbande	45
Abbildung 24: CTGF normiert über Aktin.....	46
Abbildung 25: Harnstoffwerte im Serum in mg/dl.....	47
Abbildung 26: Aktinmarkiertes histologisches Bild einer gesunden 7.5 Wochen alten unbehandelten Wildtyp-Maus	48

Abbildung 27: Aktinmarkiertes histologisches Bild einer 9.5 Wochen alten unbehandelten Alport-Maus.....	48
Abbildung 28: Aktinmarkiertes histologisches Bild einer 9.5 Wochen alten mit Paricalcitol behandelten Alport-Maus.....	49
Abbildung 29: Aktinmarkiertes histologisches Bild einer 9.5 Wochen alten mit Paricalcitol und Ramipril behandelten Alport-Maus	49
Abbildung 30: Immunhistochemie-Score: Mittelwerte Laminin x 10.....	51
Abbildung 31: Immunhistochemie-Score: Mittelwerte Laminin x 40.....	51
Abbildung 32: Fibronektinmarkiertes histologisches Bild einer gesunden 9.5 Wochen alten unbehandelten Wildtyp-Maus	52
Abbildung 33: Fibronektinmarkiertes histologisches Bild einer 7.5 Wochen alten unbehandelten Alport-Maus.....	52
Abbildung 34: Fibronektinmarkiertes histologisches Bild 9.5 Wochen alten mit Paricalcitol behandelten Alport-Maus.....	53
Abbildung 35: Fibronektinmarkiertes histologisches Bild einer 9.5 Wochen alten mit Ramipril und Paricalcitol behandelten Alport-Maus	53
Abbildung 36: Immunhistochemie-Score: Mittelwerte Fibronektin x10.....	55
Abbildung 37: Immunhistochemie-Score: Mittelwerte Fibronektin x40.....	55
Abbildung 38: Bandenstruktur und Molekulargewichte des See Blue Plus 2 Pre-Stained Standards.....	71
Tabelle 1: Gruppeneinteilung.....	17
Tabelle 2: Einteilung der Überlebensgruppen	17
Tabelle 3: Überlebenszeiten bei Ramipriltherapie.....	32
Tabelle 4: Überlebenszeiten ohne Therapie	32
Tabelle 5: Überlebenszeiten bei Doppeltherapie mit Ramipril und Paricalcitol.....	33
Tabelle 6: Überlebenszeiten bei Paricalcitoltherapie	33
Tabelle 7: statistische Auftrennung der Überlebenszeiten	33
Tabelle 8: Kruskal-Wallis-Test	36
Tabelle 9: Paarvergleiche nach Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test.....	36
Tabelle 10: Harnstoffwerte im Serum in mg / dl.....	47
Tabelle 11: Immunhistochemie-Score (a): Laminin x10.....	50
Tabelle 12: Immunhistochemie-Score (b): Laminin x10.....	50
Tabelle 13: Immunhistochemie-Score (a): Laminin x40.....	50
Tabelle 14: Immunhistochemie-Score (b): Laminin x40.....	50
Tabelle 15: Immunhistochemie-Score (a): Fibronektin x10.....	54
Tabelle 16: Immunhistochemie-Score (b): Fibronektin x10.....	54
Tabelle 17: Immunhistochemie-Score (a): Fibronektin x40.....	54
Tabelle 18: Immunhistochemie-Score (b): Fibronektin x40.....	54

8. Literaturverzeichnis

- Abbate M, Zoja C, Remuzzi G (2006): How does proteinuria cause progressive renal damage? *JASN* 17, 2974-2984
- Agarwal R, Acharya M, Tian J, Hippensteel RL, Melnick JZ, Qiu P, Williams L, Battle D (2005): Antiproteinuric effect of oral paricalcitol in chronic kidney disease. *Kidney Int* 68, 2823-2828
- Amann K, Irzyniec T, Mall G, Ritz E (1993): The effect of enalapril on glomerular growth and glomerular lesions after subtotal nephrectomy in the rat: a stereological analysis. *J Hypertens* 11, 969-975
- Amann K, Nichols C, Tornig J, Schwarz U, Zeier M, Mall G, Ritz E (1996): Effect of ramipril, nifedipine, and moxonidine on glomerular morphology and podocyte structure in experimental renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 11, 1003-1011
- Andress D (2007): Nonclassical aspects of differential vitamin D receptor activation: implications for survival in patients with chronic kidney disease. *Drugs* 67, 1999-2012
- Anker SD, von Haehling S (2012): Vitamin D in chronic kidney disease: more questions than answers. *JAMA* 307, 722-723
- Bohle A, Christ H, Grund KE, Mackensen S (1979): The role of the interstitium of the renal cortex in renal disease. *Contribns Nephrol* 16, 109-114
- Boor P, Ostendorf T, Floege J (2010): Renal fibrosis: novel insights into mechanisms and therapeutic targets. *Nat Rev Nephrol* 6, 643-656
- Bortz J, Lienert GA: *Kurzgefasste Statistik für die klinische Forschung*. 3. Auflage; Springer Verlag, Heidelberg 2008.
- Bulger, RE (1986): Kidney morphology: update 1985. *Toxicol Pathol* 14, 13-25
- Chen HC, Chen CA, Guh JY, Chang JM, Shin SJ, Lai YH (2000): Altering expression of alpha3beta1 integrin on podocytes of human and rats with diabetes. *Life Sci* 67, 2345-2353
- Chonchol M, Kendrick J, Targher G (2011): Extra-skeletal effects of vitamin D deficiency in chronic kidney disease. *Ann Med* 43, 273-282
- 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* 10, 2981-2992
- de Zeeuw D, Agarwal R, Amdahl M, Audhya P, Coyne D, Garimella T, Parving HH, Pritchett Y, Remuzzi G, Ritz E et al. (2010): Selective vitamin D receptor activation with paricalcitol for reduction of albuminuria in patients with type 2 diabetes (VITAL study): a randomised controlled trial. *Lancet* 376, 1543-1551

- Eddy AA (1996): Molecular insights into renal interstitial fibrosis. *JASN* 7, 2495-2508
- Finch JL, Brown AJ, Slatopolsky E (1999): Differential effects of 1,25-dihydroxy-vitamin D3 and 19-nor-1,25-dihydroxy-vitamin D2 on calcium and phosphorus resorption in bone. *JASN* 10, 980-985
- Gal-Moscovici A, Sprague SM (2007): Comparative cost-benefit analyses of paricalcitol and calcitriol in stage 4 chronic kidney disease from the perspective of a health plan. *Clin Drug Investig* 27, 105-113
- Garcia-Sanchez O, Lopez-Hernandez FJ, Lopez-Novoa JM (2010): An integrative view on the role of TGF-beta in the progressive tubular deletion associated with chronic kidney disease. *Kidney Int* 77, 950-955
- Griensven JM van, Schoemaker RC, Cohen AF, Luus HG, Seibert-Grafe M, Rothig HJ (1995): Pharmacokinetics, pharmacodynamics and bioavailability of the ACE inhibitor ramipril. *Eur J Clin Pharmacol* 47, 513-518
- Gross O, Weber M (2005): From the molecular genetics of Alport's syndrome to principles of organo-protection in chronic renal diseases. *Med Klin (Munich)* 100, 826-831
- Gross O, Netzer KO, Lambrecht R, Seibold S, Weber M (2002): Meta-analysis of genotype-phenotype correlation in X-linked Alport-Syndrome: impact on clinical counselling. *Nephrol Dial Transplant* 17, 1218-1227
- 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* 63, 438-446
- Gross O, Schulze-Lohoff E, Koepke ML, Beirowski B, Addicks K, Bloch W, Smyth N, Weber M (2004): Antifibrotic, nephroprotective potential of ACE inhibitor vs AT1 antagonist in a murine model of renal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant* 19, 1716-1723
- Gross O, Friede T, Hilgers R, Gorlitz A, Gavenis K, Ahmed R, Durr U (2012a): Safety and Efficacy of the ACE-Inhibitor Ramipril in Alport-Syndrome: The Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled, Multicenter Phase III EARLY PRO-TECT Alport Trial in Pediatric Patients. *ISRN Pediatr* 2012, 436046
- Gross O, Licht C, Anders HJ, Hoppe B, Beck B, Tonshoff B, Hocker B, Wygoda S, Ehrich JH, Pape L et al. (2012b): Early angiotensin-converting enzyme inhibition in Alport-Syndrome delays renal failure and improves life expectancy *Kidney Int* 81, 494-501
- Gruden G, Zonca S, Hayward A, Thomas S, Maestrini S, Gnudi L, Viberti GC (2000): Mechanical stretch-induced Fibronectin and transforming growth factor-beta1 production in human mesangial cells is p38 mitogen-activated protein kinase-dependent. *Diabetes* 49, 655-661
- Harahap Y SL, Prasaja B, Lusthom W, Setiawan EC (2009): Comparative Bioavailability Study of Two Ramipril Tablet Formulations in Indonesian Healthy Volunteers. *J Bioanal Biomed* 1: 017-021,
- Heidet L, Gubler MC (2009): The renal lesions of Alport-Syndrome. *JASN* 20, 1210-1215
- Herdegen T: *Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie*. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2008
- Hinz B (2010): The myofibroblast: paradigm for a mechanically active cell. *J Biomech* 43, 146-155

Hirata M, Makibayashi K, Katsumata K, Kusano K, Watanabe T, Fukushima N, Doi T (2002): 22-Oxalcalcitriol prevents progressive glomerulosclerosis without adversely affecting calcium and phosphorus metabolism in subtotaly nephrectomized rats. *Nephrol Dial Transplant* 17, 2132-2137

Holick MF (2005): Vitamin D for health and in chronic kidney disease. *Semin Dial* 18, 266-275

Hricik DE, Chung-Park M, Sedor JR (1998): Glomerulonephritis. *N Engl J Med* 339, 888-899

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, 26033-26036

Jais JP, Knebelmann B, Giatras I, De Marchi M, Rizzoni G, Renieri A, Weber M, Gross O, Netzer KO, Flinter F et al. (2003): X-linked Alport-Syndrome: natural history and genotype-phenotype correlations in girls and women belonging to 195 families: a "European Community Alport-Syndrome Concerted Action" study. *JASN* 14, 2603-2610

Kashtan CE: Alport-Syndrome and Thin Basement Membrane Nephropathy. In: *GeneReviews*™. Edited by Pagon RA, Adam MP, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Stephens K. Seattle (WA); 1998 - 2013.

Klahr S, Schreiner G, Ichikawa I (1988): The progression of renal disease. *N Engl J Med* 318, 1657-1666

Klinke R, Silbernagl S: *Lehrbuch der Physiologie*, 4. korrigierte Auflage; Georg Thieme Verlag Stuttgart 2004

Kopp JB, Factor VM, Mozes M, Nagy P, Sanderson N, Bottinger EP, Klotman PE, Thorgeirsson SS (1996): Transgenic mice with increased plasma levels of TGF-beta 1 develop progressive renal disease. *Lab Invest* 74, 991-1003

Kuhlmann A, Haas CS, Gross ML, Reulbach U, Holzinger M, Schwarz U, Ritz E, Amann K (2004): 1,25-Dihydroxyvitamin D3 decreases podocyte loss and podocyte hypertrophy in the subtotaly nephrectomized rat. *Am J Physiol Ren Physiol* 286, F526-533

Kuncio GS, Neilson EG, Haverty T (1991): Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *Kidney Int* 39, 550-556

Lebrin F, Deckers M, Bertolino P, Ten Dijke P (2005): TGF-beta receptor function in the endothelium. *Cardiovasc Res* 65, 599-608

Lee CI, Guh JY, Chen HC, Lin KH, Yang YL, Hung WC, Lai YH, Chuang LY (2004): Leptin and connective tissue growth factor in advanced glycation end-product-induced effects in NRK-49F cells. *J Cell Biochem* 93, 940-950

Liabeuf S, Druke TB, Massy ZA (2011): Protein-bound uremic toxins: new insight from clinical studies. *Toxins* 3, 911-919

Lopez-Hernandez FJ, Lopez-Novoa JM (2011): Role of TGF-beta in chronic kidney disease: an integration of tubular, glomerular and vascular effects. *Cell Tissue Res* 347, 141-154

- Lopez-Novoa JM, Rodriguez-Pena AB, Ortiz A, Martinez-Salgado C, Lopez Hernandez FJ (2011): Etiopathology of chronic tubular, glomerular and renovascular nephropathies: clinical implications. *J Transl Med* 9, 13
- Lüllmann-Rauch R: Histologie. 2. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2003
- Lund RJ, Andress DL, Amdahl M, Williams LA, Heaney RP (2010): Differential effects of paricalcitol and calcitriol on intestinal calcium absorption in hemodialysis patients. *Am J Nephrol* 31, 165-170
- Madaio MP, Harrington JT (2001): The diagnosis of glomerular diseases: acute glomerulonephritis and the nephrotic syndrome. *Arch Intern Med* 161, 25-34
- Massague J (1990): The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* 6, 597-641
- Massague J (1998): TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67, 753-791
- Mezzano SA, Ruiz-Ortega M, Egido J (2001): Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension* 38, 635-638
- Miner JH (1999): Renal basement membrane components. *Kidney Int* 56, 2016-2024
- Mozes MM, Bottinger EP, Jacot TA, Kopp JB (1999): Renal expression of fibrotic matrix proteins and of transforming growth factor-beta (TGF-beta) isoforms in TGF-beta transgenic mice. *JASN* 10, 271-280
- Nuijten M, Andress DL, Marx SE, Curry AS, Sterz R (2010): Cost Effectiveness of Paricalcitol versus a non-selective vitamin D receptor activator for secondary hyperparathyroidism in the UK: a chronic kidney disease markov model. *Clin Drug Investig* 30, 545-557
- Palmer SC, McGregor DO, Macaskill P, Craig JC, Elder GJ, Strippoli GF (2007): Meta-analysis: vitamin D compounds in chronic kidney disease. *Ann Intern Med* 147, 840-853
- Pavelka M, Roth J: Funktionelle Ultrastruktur: Atlas der Biologie und Pathologie von Geweben Springer-Verlag; Wien, New York 2005, 334
- Patel TV, Singh AK (2009): Role of vitamin D in chronic kidney disease. *Semin Nephrol* 29, 113-121
- Phanish MK, Winn SK, Dockrell ME (2010): Connective tissue growth factor-(CTGF, CCN2)--a marker, mediator and therapeutic target for renal fibrosis. *Nephron Exp Nephrol* 114, e83-92
- Regoli M, Bendayan M (1997): Alterations in the expression of the alpha 3 beta 1 integrin in certain membrane domains of the glomerular epithelial cells (podocytes) in diabetes mellitus. *Diabetologia* 40, 15-22
- Rheault MN (2012): Women and Alport-Syndrome. *Pediatr Nephrol* 27, 41-46
- Roberts AB, Anzano MA, Lamb LC, Smith JM, Sporn MB (1981): New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 5339-5343

Rodriguez-Barbero A, Dorado F, Velasco S, Pandiella A, Banas B, Lopez-Novoa JM (2006): TGF-beta1 induces COX-2 expression and PGE2 synthesis through MAPK and PI3K pathways in human mesangial cells. *Kidney Int* 70, 901-909

Ronco C, Bellomo R, Kellum J: *Critical Care Nephrology*. 2. Auflage; Saunders Elsevier, Philadelphia 2009

Sanchez-Lopez E, Rodrigues Diez R, Rodriguez Vita J, Rayego Mateos S, Rodrigues Diez RR, Rodriguez Garcia E, Lavoiz Barria C, Mezzano S, Egido J, Ortiz A et al. (2009): Connective tissue growth factor (CTGF): a key factor in the onset and progression of kidney damage. *Nefrologia* 29, 382-391

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* 56, 1662-1673

Schiffer M, Bitzer M, Roberts IS, Kopp JB, ten Dijke P, Mundel P, Bottinger EP (2001): Apoptosis in podocytes induced by TGF-beta and Smad7. *Journal Clin Invest* 108, 807-816

Schnaper HW, Jandeska S, Runyan CE, Hubchak SC, Basu RK, Curley JF, Smith RD, Hayashida T (2009): TGF-beta signal transduction in chronic kidney disease. *Front Biosci* 14, 2448-2465

Schrier RW: *Diseases of the Kidney and Urinary Tract*. 1. Auflage; Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2007

Schwarz U, Amann K, Orth SR, Simonaviciene A, Wessels S, Ritz E (1998): Effect of 1,25 (OH)₂ vitamin D₃ on glomerulosclerosis in subtotaly nephrectomized rats. *Kidney Int* 53, 1696-1705

Siegenthaler W, Blum HE: *Klinische Pathophysiologie*. 9. Auflage; Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart 2006

Siragy HM, Carey RM (2010): Role of the intrarenal renin-angiotensin-aldosterone system in chronic kidney disease. *Am J Nephrol* 31, 541-550

Slatopolsky E, Cozzolino M, Finch JL (2002): Differential effects of 19-nor-1,25-(OH)₂D₂ and 1alpha-hydroxyvitamin D₂ on calcium and phosphorus in normal and uremic rats. *Kidney Int* 62, 1277-1284

Sprague SM, Llach F, Amdahl M, Taccetta C, Batlle D (2003): Paricalcitol versus calcitriol in the treatment of secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int* 63, 1483-1490

Strutz F, Neilson EG (2003): New insights into mechanisms of fibrosis in immune renal injury. *Springer Semin Immunopathol* 24, 459-476

Tamaki K, Okuda S (2003): Role of TGF-beta in the progression of renal fibrosis. *Contrib Nephrol* 139, 44-65

Tan X, Li Y, Liu Y (2006): Paricalcitol attenuates renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *JASN* 17, 3382-3393

Tan X, Li Y, Liu Y (2007): Therapeutic role and potential mechanisms of active Vitamin D in renal interstitial fibrosis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103, 491-496

Teng M, Wolf M, Ofsthun MN, Lazarus JM, Hernan MA, Camargo CA Jr., Thadhani R (2005): Activated injectable vitamin D and hemodialysis survival: a historical cohort study. *JASN* 16, 1115-1125

Tojo A, Endou H (1992): Intrarenal handling of proteins in rats using fractional micropuncture technique. *Am J Physiol* 263, F601-606

Tojo A, Kinugasa S (2012): Mechanisms of glomerular albumin filtration and tubular reabsorption. *Int J Nephrol* 2012, 481520

Vanholder R, Van Laecke S, Glorieux G (2008): What is new in uremic toxicity? *Pediatr Nephrol* 23, 1211-1221

Victor A, Elsässer A, Hommel G, Blettner M. (2010): Wie bewertet man die p-Wert-Flut? *Dtsch Arztebl Int* 2010 107, 50-56

Wester DC, Atkin CL, Gregory MC (1995): Alport-Syndrome: clinical update. *J Am Acad Audiol* 6, 73-79

Wolf G, Schroeder R, Ziyadeh FN, Stahl RA (2004): Albumin up-regulates the type II transforming growth factor-beta receptor in cultured proximal tubular cells. *Kidney Int* 66, 1849-1858

Xu L, Wan X, Huang Z, Zeng F, Wei G, Fang D, Deng W, Li Y (2013): Impact of vitamin D on chronic kidney diseases in non-dialysis patients: a meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS One* 8, e61387

Yang B, Bankir L (2005): Urea and urine concentrating ability: new insights from studies in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 288, F881-896

Ziegler A, Lange S, Bender R. (2007 a): Überlebenszeitanalyse: Der Log-Rank-Test. *Dtsch Med Wochenschr* 132, e39-e41

Ziegler A, Lange S, Bender R (2007 b): Überlebenszeitanalyse: Eigenschaften und Kaplan-Meier-Methode. *Dtsch Med Wochenschr* 132, e36-e38

Lebenslauf

Mein Name ist Henrik Robert Hiller. Ich wurde am 18.07.1985 in Marburg an der Lahn geboren. Ich bin unverheiratet und habe keine Kinder.

Meine Schulausbildung absolvierte ich von 1992 bis 2005 in Kirchhain. Abgeschlossen habe ich diese Ausbildung mit dem Erwerb des Abiturs auf der gymnasialen Oberstufe der Alfred Wegener Schule.

Nach dem Abitur durchlief ich ein Freiwilliges Soziales Jahr (FSJ) als Zivildienstersatz im Rettungsdienst des Deutschen Roten Kreuzes.

Das FSJ schloss ich mit der Ausbildung zum Rettungssanitäter ab.

Zum Wintersemester 2006 nahm ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen auf.

Nach dem bestandenen ersten Staatsexamen verbrachte ich ein Auslandssemester an der „Université 2 de Droit et Santé“ in Lille, Frankreich.

Mit meiner Rückkehr nach Göttingen nahm ich im Frühjahr 2010 – unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Oliver Gross – die Arbeit an meiner Dissertation in der Klinik für Nephrologie und Rheumatologie auf.

Im Mai 2013 legte ich den Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung erfolgreich ab.

Teile dieser Studie wurden in Abstract-Form beim europäischen Nephrologenkongress (Paris, 2012) sowie beim deutschen Nephrologenkongress (Hamburg, 2012) veröffentlicht. Zudem wurden die Ergebnisse dieser Arbeit zur Publikation beim „Nephrology Dialysis Transplantation Journal“ (Nephrol Dial Transplant, 2013) eingereicht.