

Aus der Klinik für Nephrologie und Rheumatologie
(Prof. Dr. med. G. A. Müller)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Nierenschützende Wirkung von Calcitriol additiv zu Ramipril auf die
Nierenfibrose im Alport-Maus-Modell**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Ayse Ciner

aus

Hildesheim

Göttingen 2015

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

I. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. O. Gross

II. Berichterstatter/in: PD Dr. rer. nat. W. Krick

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. hum. biol. M. Schön

Tag der mündlichen Prüfung: 16.03.2016

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einleitung	8
1.1 Die Niere: Aufbau und physiologische Funktionen	8
1.2 Das Alport-Syndrom	9
1.2.1 Licht- und elektronenmikroskopische Veränderungen der GBM.....	10
1.2.2 Klinisches Bild und Diagnosekriterien.....	11
1.2.3 Extrarenale Manifestationen.....	12
1.3 Die extrazelluläre Matrix	14
1.3.1 Bestandteile der EZM.....	14
1.4 Die Nierenfibrose	17
1.5 Chronische Nierenerkrankungen	19
1.6 Vitamin D3	21
1.7 Das RAA-System und seine Auswirkungen auf die Niereninsuffizienz	25
2 Material und Methoden	28
2.1 Material	28
2.1.1 Geräte und Programme.....	28
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	29
2.1.3 Antikörper und Medikamente.....	30
2.1.4 Reagenzien, Lösungen und Chemikalien.....	31
2.1.5 Puffer.....	33
2.1.6 Versuchstiere.....	34
2.2 Methoden	34
2.2.1 DNA-Isolation aus Mäuseschwanzbiopsien.....	34
2.2.2 Genotypisierung/ COL4A3 PCR.....	35
2.2.3 Agarose – Gelelektrophorese.....	35
2.2.4 Chloroform-Methanol-Protein-Fällung.....	35
2.2.5 Urin – Elektrophorese.....	36
2.2.6 Nephrektomie.....	36
2.2.7 Herstellung der Lysate.....	36
2.2.8 Proteinbestimmung.....	37
2.2.9 Western Blot.....	37
2.2.10 Fixierung und Einbettung der Nieren.....	38
2.2.11 Immunhistochemie.....	38

2.2.12	Fibrose – Score.....	39
2.2.13	Harnstoffbestimmung	39
2.2.14	Statistik.....	39
3	Ergebnisse	41
3.1	Mausgruppen	41
3.2	Überlebenszeiten	42
3.2.1	Überleben nach Monotherapie	42
3.2.2	Kombinationstherapie mit Calcitriol und Ramipril	43
3.3	Urin - Elektrophorese.....	44
3.3.1	Proteinurie in Relation zum Wildtyp	44
3.3.2	Proteinurie im zeitlichen Verlauf	48
3.4	TGF- β und cTGF Expression im Western Blot.....	49
3.5	Immunhistochemische Darstellung chronisch glomerulärer und interstitieller Nierenfibrose	50
3.5.1	Glomeruläre Ablagerungen von Laminin und Fibronectin	50
3.5.2	Tubulointerstitielle Veränderungen.....	52
3.6	Harnstoff.....	53
4	Diskussion	56
4.1	Auswirkungen der Kombinationstherapie mit Ramipril und Calcitriol.....	56
4.2	Aktives Vitamin und seine Analoga senken die Mortalitätsrate bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung	58
4.3	Senkung der Proteinurie unter Vitamin D	59
4.4	Renale Fibrose und TGF- β	61
4.5	Vitamin D und seine Analoga: Wirkungsweisen, die der Progression der Niereninsuffizienz entgegenwirken.....	63
4.6	NF- κ B und die Nierenfibrose	65
4.7	Bedeutung für die künftige Forschung	65
5	Zusammenfassung.....	67
6	Anhang	69
6.1	Abbildungsverzeichnis.....	69
6.2	Tabellenverzeichnis	70
7	Literaturverzeichnis	71

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACE	<i>angiotensin converting enzyme</i>
AK	Antikörper
ARAS	autosomal-rezessives Alport-Syndrom
ADAS	autosomal-dominantes Alport-Syndrom
AS	Alport-Syndrom
AT I/II	Angiotensin
BM	Basalmembran
BSA	bovines Serum-Albumin
BUN	<i>blood urea nitrogen</i>
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
C	Calcitriol
COL	Kollagen
C+R	Calcitriol plus Ramipril
cTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dATP	2'-Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxy-Cytosin-5'-Triphosphat
dGTP	2'-Desoxy-Guanosin-5'-Triphosphat
dNTP	2'-Desoxy-Nucleosid-5'-Triphosphat
dTTP	2'-Desoxy-Thymidin-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMT	epithelial-mesenchymale Transdifferenzierung
et al.	et alii (lateinisch und andere)
evtl.	eventuell
EZM	extrazelluläre Matrix

GLDH	Glutamat-Dehydrogenase
GFR	glomeruläre Basalmembran
Gly	Glycin
h	Stunde
HD	Hämodialyse
IgG	Immunglobulin G
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
kDa	Kilodalton
mRNA	Boten-(Messenger)-Ribonukleinsäure
min.	Minute
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Plac	Placebo
pM	pico Molar
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	Ramipril
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase - PCR
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SEM	Standardabweichung
SMA	<i>smooth muscle actin</i>
Tab.	Tabelle
Taq-Polymerase	thermostabile DNA-Polymerase

TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBM	tubuläre Basalmembran
TBST	<i>tris-buffered saline tween 20</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
Tris	α,α,α -Tris(Hydroxymethyl)-Methylamine
U	unit
u.a.	unter anderem
V	Volt
WT	Wildtyp
XLAS	X-linked Alport Syndrome
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Die Niere: Aufbau und physiologische Funktionen

Die Niere ist ein retroperitoneal und paarig angelegtes Organ. Die hohe Leistung der Nieren spiegelt sich in dem hohen Blutfluss (1,2 l pro Minute) und einer Filtrationsrate von 120 ml Primärharn pro Minute wider. Pro Tag werden ca. 170 Liter Primärharn gebildet. Die Konzentrierung des Primärharns erfolgt im Tubulus-System. Hierbei werden für den Körper wichtige Substanzen rückresorbiert und harnpflichtige Stoffe sezerniert. Die Nieren produzieren somit ca. 1,5 Liter Harn pro Tag.

Die Niere ist durch die Fülle ihrer Funktionen, exokrin und endokrin, ein lebenswichtiges Organ. Zu den exokrinen Funktionen gehören die Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes, die Steuerung des Säure-Basenhaushaltes sowie die Ausscheidung von giftigen Stoffwechselprodukten mit dem Harn (z.B. Kreatinin, Arzneimittel, Harnsäure, Harnstoff). Die endokrinen Funktionen umfassen die Produktion von verschiedenen lokal wirksamen und systemisch zirkulierenden Hormonen und die Blutdruckregulation über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System. Die systemisch wirksamen Hormone sind Erythropoetin und 1,25-Dihydroxycholecalciferol-D₃ (1,25-(OH)₂-D₃). Das in der Nierenrinde gebildete Erythropoetin ist für die Reifung der Erythrozyten im Knochenmark essentiell. Durch die Hydroxylierung von Calcidiol zum biologisch aktiven 1,25-(OH)₂-D₃ spielt die Niere eine Schlüsselrolle im Vitamin D- und Calcium- Stoffwechsel (Speckmann *et al.* 2005).

Das Nephron und seine Bestandteile

Das Nephron, zusammengesetzt aus Nierenkörperchen und dem nachgeschalteten Tubulussystem, bildet die kleinste funktionelle Einheit der Niere. Zusammengerechnet besitzen menschliche Nieren ca. zwei Millionen dieser Einheiten. Im Nierenkörperchen findet die Ultrafiltration des Primärharns statt. Das Tubulussystem ist für die Konzentrierung des Primärharns und somit für die Zusammensetzung des Endharns zuständig. Die Glomeruli haben einen typischen Aufbau: die afferenten Arteriolen treten am Gefäßpol in das Nierenkörperchen ein, verzweigen sich und bilden ein Kapillarkonvolut und treten als efferente Arteriolen am Gefäßpol wieder aus. Dieses Konstrukt aus Kapillaren wird von der sogenannten Bowman-Kapsel umgeben. Die Bowman-Kapsel wiederum wird aus zwei Blättern gebildet, dem äußeren (parietalen) Blatt und dem inneren (viszeralen) Blatt. Das viszerale Blatt liegt an den glomerulären Kapillaren an und wird von den Podozyten gebildet.

Das äußere Blatt hingegen besteht aus einem einschichtigen Plattenepithel. Der Raum zwischen viszeralem und parietalem Blatt enthält den Primärharn, welcher am Harnpol in den proximalen Tubulus fließt. Podozyten, das Endothel der glomerulären Kapillaren und die glomeruläre Basalmembran (GBM), die sich zwischen den beiden befindet, bilden zusammen die Blut-Harn-Schranke. Alle drei Strukturen sind für die Aufrechterhaltung der Barriere von essentieller Bedeutung (Miner 2011, Speckmann *et al.* 2005).

Die Funktion der Blut-Harn-Schranke

Das Endothel der glomerulären Kapillaren besitzt einen gefensterten Aufbau. Die Poren sind ca. 25-50 nm klein. Dadurch werden zelluläre Bestandteile (Blutzellen und –Makromoleküle) zurückgehalten und können nicht ins Ultrafiltrat übertreten. Moleküle ab einer bestimmten Größe (70 kDa) sowie negativ geladene Moleküle (z.B. Plasmaproteine) bleiben an der GBM hängen und werden nicht durchgelassen (Größen- und Ladungsselektivität). Die von außen der Basallamina aufliegenden Podozyten bilden mit ihren Fortsätzen die Schlitzmembran. Diese stellt ebenfalls einen Filter dar, der Teilchen ab einem Molekulargewicht von 70 kDa nicht in den Primärharn übertreten lässt (Speckmann *et al.* 2005). Die GBM entsteht durch die Verschmelzung der Basallaminae von Endothelzellen und Podozyten. Durch die Fusion zweier Basallaminae während der embryonalen Genese ist die GBM im Gegensatz zu anderen Basalmembranen besonders dick (Miner 2011, Rassow *et al.* 2008).

1.2 Das Alport-Syndrom

Das Alport-Syndrom ist eine hereditäre Nierenerkrankung, die durch ein progressives Nierenversagen und Nierenfibrose charakterisiert ist (Koepeke *et al.* 2007). Aufgrund von Mutationen im Kollagen Typ IV kommt es bei Alport-Patienten zu einer Vielzahl von klinischen Symptomen. Die Hämaturie und Proteinurie sind die Leitsymptome (Gross *et al.* 2012, Gross *et al.* 2003b). Typische extrarenale Manifestationsformen sind Innenohrschwerhörigkeit und Augenveränderungen (Gross *et al.* 2003a).

Im Jahr 1927 wurde das Alport-Syndrom erstmals in einer Veröffentlichung im British Medical Journal beschrieben. Der Autor war Arthur Cecil Alport, ein südafrikanischer Arzt. Er beschrieb eine familiär gehäufte Erkrankung mit dem Leitsymptom einer Mikrohämaturie. Aus dem Fallbericht ging hervor, dass die Mikrohämaturie z.B. im Zusammenhang mit Infekten oder Stresssituationen wie einer Geburt oder nach dem Verzehr von schwarzen Johannisbeeren in eine Makrohämaturie umschlagen konnte. Betroffen waren hauptsächlich

männliche Familienmitglieder, die zwischen dem 15. - 30. Lebensjahr verstarben. Die Lebenserwartung der weiblichen Familienmitglieder war trotz derselben Symptomatik jedoch nicht eingeschränkt. Nebenbefundlich wurde bei fast allen Familienmitgliedern eine Innenohrschwerhörigkeit beobachtet (Alport 1927).

Epidemiologie und Genetik

Das Vererbungsmuster des Alport-Syndroms ist sehr vielfältig. In mehr als 80 % der Fälle liegt ein X-chromosomales (XLAS), in 15 % ein autosomal-rezessives (ARAS) und zu 5 % ein autosomal-dominantes Vererbungsmuster vor (Flinter *et al.* 1988). Die Prävalenz der X-chromosomalen Form beträgt ca. 1:5000, die der autosomalen Form wird auf ca. 1:50.000 geschätzt. Neben homozygoten Betroffenen gibt es auch heterozygote Anlageträger, die in etwa 1 % der Bevölkerung ausmachen (Gross *et al.* 2003b). Insgesamt haben ca. 0,3 – 2,3 % der auf eine Nierenersatztherapie angewiesenen Patienten das Alport-Syndrom (Gubler 2008). Auf molekularbiologischer Ebene finden sich verschiedene Arten von Mutationen in den Kollagen-Genen, die zu einer defekten Kollagensynthese führen. Sie reichen von Missense- und Spleißmutationen über den vorzeitigen Einbau von Stop-Kodons bis hin zu Deletionen. Beispielsweise sind Mutationen im COL4A5-Gen mit XLAS und COL4A4 bzw. COL4A3-Mutationen mit der autosomal-rezessiven oder auch der dominanten Form assoziiert. Zusätzliche Mutationen im COL4A6-Gen werden mit Leiomyomatose in Verbindung gebracht. Alle diese Fehler verursachen letztendlich einen posttransitionellen Defekt in der Protomerzusammensetzung des Kollagen Typ IV. Je nachdem, ob die Betroffenen homozygot oder heterozygot sind, verläuft die Erkrankung leicht bis schwer. Das Geschlecht spielt dabei ebenfalls eine wichtige Rolle. Weibliche Träger der XLAS-Form haben z.B. im Gegensatz zu den männlichen Trägern eine sehr variable Penetranz. Sie ist stark von der Mutationsform, dem Vorhandensein eines Mosaiks und der Inaktivierung des X-Chromosoms abhängig (Hudson *et al.* 2003)

1.2.1 Licht- und elektronenmikroskopische Veränderungen der GBM

Elektronenmikroskopische Veränderungen sind im Vergleich zu den lichtmikroskopischen Umbauten der Basalmembran pathognomonisch für das Alport-Syndrom. Sie treten nicht immer alle gemeinsam auf und können unterschiedlich ausgeprägt sein.

Lichtmikroskopische Veränderungen

Bei sehr jungen Alport-Patienten ist die gesunde Nierenarchitektur noch weitgehend erhalten. Eine milde Hyperzellularität, Schaumzellen und glomeruläre Veränderungen in Form *fetal-like* Glomeruli können unter dem Lichtmikroskop vorhanden sein. Diese sind charakterisiert durch eine kranzartige Ansammlung von Epithelzellen mit auffallend großen Kernen sowie einer scheinbaren Verminderung an funktionellen Kapillaren (Antonovych *et al.* 1969).

Mit zunehmendem Alter kommt es dann zu schwerwiegenderen Veränderungen (Pirson 1999). Hierbei sind eine Hypertrophie der Podozyten, eine Verdickung der Kapillarwände und der tubulären Basalmembran sowie eine diffuse Erweiterung des Mesangiums zu beobachten (Heidet und Gubler 2009).

Interstitielle, meist in Gruppen liegende Schaumzellen sind in 40 % der Alport-Nieren zwischen dem 2. und 41. Lebensjahr zu finden. Besonders in Nierenbiopsien älterer Kinder und Erwachsener, die bereits chronische Nierenschäden aufweisen (glomeruläre Sklerose, tubuläre Atrophie und interstitielle Fibrose, Proteinurie), sind Schaumzellen häufiger anzutreffen (Haas 2009). Diese Schaumzellen sind nicht Alport-Syndrom-spezifisch, können aber wegweisend sein. Mittel- bis langfristig kommt es somit zu einer glomerulären und interstitiellen Fibrose (Flinter *et al.* 1988).

Elektronenmikroskopische Veränderungen

Die bei jungen Alport-Patienten zunächst dünne GBM nimmt an Durchmesser zu (verdickt sich) und es kommt zu einer Zerstörung der trilaminären (zentrale Lamina densa mit zwei Laminae rarae) Struktur (Hudson *et al.* 2003, Mazzucco *et al.* 1998). Die typischen Merkmale sind eine Lamellierung und eine Korbgeflecht-artige Auflockerung der Lamina densa, in der häufig elektronendichte Einschlusskörperchen zu finden sind (Kashtan 1993-2015). Neben den unregelmäßigen Verdickungen sind auffallend unregelmäßige Innen- und Außenkonturen zu beobachten (Heidet und Gubler 2009). Die normale GBM ist ca. 350 nm dick. Sie kann bis zu 1200 nm verdickt sein. Bei einem Querschnitt von ca. 100 nm spricht man von einer dünnen Basalmembran (Pirson 1999).

1.2.2 Klinisches Bild und Diagnosekriterien

Bei unterschiedlicher Penetranz ist das Alport-Syndrom phänotypisch sehr heterogen. Dennoch ist das erste Symptom bei allen Formen die Hämaturie. Andere Merkmale wie die

Proteinurie sind progredient und nehmen mit dem Alter zu. Die Geschwindigkeit der Progression bis zum terminalen Nierenversagen sowie das Vorhandensein extrarenaler Symptome variiert in Abhängigkeit von der Mutationsart und dem Geschlecht. Selbst innerhalb einer Alport-Familie kann das klinische Erscheinungsbild variabel und heterogen sein.

Das klassische Bild des AS ist definiert über Hämaturie, Proteinurie, progrediente Nephropathie und eine Innenohrschwerhörigkeit (Heidet und Gubler 2009, Hudson *et al.* 2003). In der folgenden Tabelle sind die Diagnosekriterien und die Häufigkeit der Symptome tabellarisch zusammengefasst.

Tabelle 1: Diagnosekriterien Alport-Syndrom, übernommen aus Risler und Kühn, p. 725-741

Diagnosekriterien des Alport-Syndroms:		Häufigkeit der Symptome:	
1	Positive Familienanamnese (Hämaturie) mit/ ohne Progression zum terminalen Nierenversagen	Familienanamnese	85 %
		Hämaturie	100 %
2	Progrediente Innenohrschwerhörigkeit		75 %
3	Augenveränderungen (Lentikonus, Fundus albipunctatus)		20 - 45 %
4	Charakteristische ultrastrukturelle Veränderungen der GBM (Aufsplitterung/ Lamellierung, Verdickung, Verdünnung)		100 %
5	Diffuse Leiomyomatose		1 – 2 %
6	COL4A5-, COL4A3- Mutationen	nachweisbar in	40 - 70 %

1.2.3 Extrarenale Manifestationen

Augenveränderungen

Die klassischen Augenveränderungen wurden erstmals von E. Sohar im Jahr 1954 beschrieben (Flinter 1997). Die mit dem Ophthalmoskop sichtbaren Veränderungen sind der Lentikonus anterior, eine Makulopathie (weißliche oder gelbliche perimakuläre Flecken) sowie rezidivierende Hornhauterosionen und die hintere polymorphe Hornhautdystrophie. Der Lentikonus anterior, eine konische Vorwölbung des mittleren vorderen Anteils der Linse in die vordere Augenkammer, welche zu Kurzsichtigkeit und einem verzerrten Sehen führt, ist

pathognomonisch für das Alport-Syndrom und tritt zu 75 % bilateral auf. Die Inzidenz beträgt 15 - 20 % in XLAS- sowie ARAS-Patienten. Das Manifestationsalter liegt zwischen dem 20.-30. Lebensjahr (Kashtan 1993-2015).

Die Patienten können alle oder auch nur eine der oben beschriebenen Augenveränderungen aufweisen. Eine chronisch progrediente Niereninsuffizienz mit Augenveränderungen in Abwesenheit einer Innenohrschwerhörigkeit ist selten, da Hörprobleme i.d.R. Augenveränderungen vorausgehen (Flinter 1997).

Innenohrschwerhörigkeit

Ein weiteres Symptom des Alport-Syndroms ist die Innenohrschwerhörigkeit. Sie tritt häufig bilateral auf und hat einen progredienten Verlauf (Flinter 1997). Die Audiometrie ermöglicht bereits in frühen Stadien die Messung einer Hörminderung um -30 dB im Frequenzbereich von 2000 - 8000 Hz. Im Verlauf sind Hörverluste von -50 bis -70 dB messbar die auch tiefere Frequenzen sowie Frequenzen der Umgangssprache betreffen (Pirson 1999).

Die Hörminderung ist nie von Geburt an vorhanden und wird bei männlichen XLAS-Patienten in der Kindheit oder im frühen Erwachsenenalter symptomatisch. Bei Frauen ist der Hörverlust eher selten und tritt meist später auf (Kashtan 1993-2015). Das Risiko, vor dem 40. Lebensjahr an einer Innenohrschwerhörigkeit zu erkranken, liegt bei männlichen XLAS-Patienten bei 80 % und bei XLAS-Frauen bei ca. 10 % (Jais *et al.* 2003).

Bei der autosomal-rezessiv vererbten Form des AS beginnen die Hörprobleme bereits im Kindesalter, und es existiert kein Unterscheid zwischen weiblichen und männlichen Patienten (Kashtan 1993-2015).

Seltene Manifestationsformen

Die juvenile Form des X-chromosomalen Alport-Syndroms ist in 1 - 2 % der Fälle mit der Leiomyomatose assoziiert. Die Leiomyomatose (ein benigner Tumor ausgehend von glatten Muskelzellen) befällt den Ösophagus, das Tracheobronchialsystem und den weiblichen Genitaltrakt mit einer 100 % - igen Penetranz und Expressivität (Gubler 2008).

Der zugrundeliegende Defekt ist eine terminale Deletion am 5'-Ende der Kopf an Kopf gelegenen Gene COL4A5 und COL4A6. Bei Männern ist die diffuse-Leiomyomatose ein negativ-prädiktiver Faktor für eine frühe terminale Niereninsuffizienz (Mothes *et al.* 2002).

1.3 Die extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix (EZM) ist eine Substanz, die den Zellzwischenraum ausfüllt. Die wesentlichen Bestandteile der EZM werden von Bindegewebszellen, den Fibroblasten bzw. Fibrozyten synthetisiert und sezerniert. Auch Epithel- und Endothelzellen sowie glatte Muskelzellen produzieren Basalmembranbestandteile.

Die Proteine der extrazellulären Matrix werden in vier verschiedene Gruppen unterteilt: Kollagene, Elastin, Proteoglykane und nichtkollagene Glykoproteine. Zu den nichtkollagenen Glykoproteinen gehören Laminin und Fibronectin (Rassow *et al.* 2008).

1.3.1 Bestandteile der EZM

Kollagen und Kollagen Typ IV

Kollagene sind nicht nur die wichtigsten strukturellen Hauptbestandteile der EZM, sie haben außerdem eine wichtige Bedeutung in der Organisation der Gewebearchitektur und bei zellulären Prozessen wie Adhäsion und Migration. Die Wechselwirkungen von Kollagenen mit Proteinen der extrazellulären Matrix sowie mit Zelloberflächen-Rezeptoren sind bei Entwicklungs- und Wachstumsprozessen, Gewebeumbau und bei der Entstehung von Krankheiten von großer Bedeutung.

Charakteristisch für alle Kollagene ist die Tripelhelikale Konformation, die von drei Polypeptidketten (α -Ketten) gebildet wird. Diese drei α -Ketten werden wiederum durch Wasserstoffbrücken zusammengehalten und bestehen aus den repetitiven Einheiten Glycin-X-Y. An Position X steht meistens Prolin und an der Position Y Hydroxyprolin, Lysin oder Hydroxylysin. Der Glycin-Rest ist das entscheidende Molekül in Bezug auf die Bildung der Tripelhelix des Kollagens und ist Angriffspunkt von vielen Mutationen (Myllyharju und Kivirikko 2004).

Derzeit sind 40 verschiedene Kollagenketten bekannt, die sich zu 27 differenzierbaren trimeren Kollagentypen zusammensetzen können. Diese Kollagene werden außerdem in fibrilläre und nicht- fibrilläre Kollagene unterteilt. Hierbei unterscheiden sie sich in der Länge der tripelhelikalen Abschnitte, durch kurze Unterbrechungen in der Trippelhelix und/oder durch das Vorhandensein zusätzlicher globulärer Domänen. Die fibrillären Kollagene kommen überwiegend in Haut, Knochen, Knorpel Sehnen und Bändern vor und besitzen eine charakteristische Faserstruktur, durch die sie extrem druck- und zugbelastbar sind. Zu der

Untergruppe der nicht-fibrillären Kollagene gehören transmembranäre Kollagene und das Kollagen Typ IV.

Kollagen Typ IV ist die häufigste strukturelle Basalmembran-Komponente bei Säugetieren. Zurzeit sind sechs unterschiedliche α -IV-Ketten bekannt, die durch die Gene COL4A1-COL4A6 codiert werden. Trotz der 56 möglichen Kombinationen sind nur drei verschiedene Netzwerke ($\alpha 1/\alpha 1/\alpha 2$ -IV, $\alpha 3/\alpha 4/\alpha 5$ -IV und $\alpha 5/\alpha 5/\alpha 6$ -IV) identifiziert. Jede α -Kette besteht aus einem langen Kollagenschwanz (>1000 Gly-XY-Wiederholungen) sowie einer evolutionär hochkonservierten globulären NC1-Domäne am C-terminalen Ende. Die Unterbrechungen in der Tripelhelix des Kollagen Typ IV verleihen dem Molekül ein hohes Maß an Flexibilität.

Die Organverteilung der Typ IV-Kollagennetzwerke ist sehr unterschiedlich. Das $\alpha 1/\alpha 1/\alpha 2$ -IV-Trimer kommt in fast allen Basalmembranen vor, während das $\alpha 3/\alpha 4/\alpha 5$ -IV-Netzwerk in der GBM, Lunge, Auge und der Linse lokalisiert ist. Letztere sind nicht durch $\alpha 1$ - oder $\alpha 2$ -Ketten ersetzbar. In der Bowmanschen Kapsel und in der Speiseröhre ist das $\alpha 5/\alpha 5/\alpha 6$ (IV) Trimer vertreten. Im Verlauf der embryonalen Entwicklung der GBM und des Hodens findet ein Austausch des $\alpha 1/\alpha 1/\alpha 2$ (IV)-Netzwerks durch das $\alpha 3/\alpha 4/\alpha 5$ (IV)-Netzwerk statt. Dieser Prozess wird als sogenannter „Isotypwechsel“ bezeichnet. Somit erfolgt die Bildung der $\alpha 3/\alpha 4/\alpha 5$ -IV- und $\alpha 5/\alpha 5/\alpha 6$ -IV-Ketten erst in der späteren Entwicklung (Gross 2008, Harvey *et al.* 2006, Kalluri *et al.* 1997, Van Agtmael und Bruckner-Tuderman 2010). Auch wenn das Kollagen den Hauptbestandteil der Basalmembranen darstellt, ist Kollagen Typ IV nicht für Basalmembranbildung, sondern auch für deren Homöostase von essentieller Bedeutung (Poschl *et al.* 2004). Desweiteren vermittelt Kollagen Typ IV die Zelladhäsion an der Basalmembran durch Bindung an Integrin- und Nicht-Integrin-Rezeptoren. Dabei interagiert das Kollagen hauptsächlich mit den $\beta 1$ -Integrin-Rezeptoren (Leitinger und Hohenester 2007). Durch die klinischen Folgen von Mutationen wird die Rolle des Kollagens im menschlichen Körper erst deutlich. Die Mutationen, die zu dem Alport-Syndrom führen, betreffen die $\alpha 3$ -, $\alpha 4$ - oder $\alpha 5$ -IV-Ketten, die von den Genen COL4A3, COL4A4 oder COL4A5 codiert werden (Gross 2008).

Die $\alpha 1$ -(IV)- und $\alpha 2$ -(IV)-Ketten sind in einer ausgereiften und gesunden GBM auf den subendothelialen Bereich beschränkt. In Alport-Nieren dagegen sind sie in der gesamten Breite der GBM zu finden. Die Intensität der GBM-Färbung für diese Ketten steigt mit

zunehmender Dauer der Erkrankung, obwohl die $\alpha 1$ (IV) und $\alpha 2$ (IV)-Ketten im Endstadium der Erkrankung verschwinden und durch Narbenkollagen I und II ersetzt werden. Weitere pathologische Ansammlungen betreffen Typ V- und Typ VI- Kollagen in der Alport-GBM. Sie verbleiben nicht in ihrer physiologischen Position (Mesangium, subendothelial), sondern nehmen wie $\alpha 1$ -(IV) und $\alpha 2$ -(IV) Ketten die gesamte Breite der GBM ein.

Im Gegensatz zu den $\alpha 1$ (IV)- und $\alpha 2$ (IV)- Ketten, bleiben Kollagen Typ V und VI auch im Endstadium des Alport-Syndroms in der GBM bestehen (Kashtan *et al.* 2001).

Laminin

Laminin ist ein wichtiges Zelladhäsionsmolekül in den Basalmembranen und stellt die nicht-kollagene Hauptkomponente aller Basalmembranen dar. Durch Wechselwirkungen mit Rezeptoren an der Zelloberfläche verbindet Laminin die BM mit der Zelloberfläche, wodurch die Zell-Zell Kommunikation ermöglicht wird. Die Expression der Laminine ist stark entwicklungs- und organspezifisch, wobei einzelne Isoformen sich gegenseitig nicht ersetzen können. Ein Ausfall einer Kette würde bereits embryonal letal verlaufen. Laminine sind heterotrimere Glykoproteine bestehend aus einer α -, β - und γ -Kette. Die bisher bekannten 5α -, 4β - und 3γ - Ketten können sich zu zahlreichen Laminin Varianten zusammensetzen. Kodiert werden sie durch die Gene LAMA1-5, LAMB1-3 und LAMC1-3 (Durbeej 2010, Rassow *et al.* 2008). Laminin ist außerdem für die anfängliche BM-Bildung und frühe Entwicklung erforderlich (Miner *et al.* 2004, Smyth *et al.* 1999).

Fibronectin

Fibronectin ist ein Heterodimer, welches aus zwei etwa 230 kDa großen Polypeptidketten besteht. Alternatives Spleißen am Fibronectin-Gen bewirkt die Produktion von Molekülen mit verschiedenen Eigenschaften. Das lösliche Plasma-Fibronectin wird in der Leber synthetisiert und spielt eine wichtige Rolle bei der Wundheilung und der Blutgerinnung. Das unlösliche Fibronectin wird in den Fibroblasten gebildet und die entstandenen unlöslichen Fibrillen werden in die EZM eingelagert. Einerseits bildet es eine Brückenfunktion zwischen den Kollagenfibrillen und anderen EZM-Molekülen, andererseits fungiert es als Adhäsionsmolekül für zahlreiche Zellen und dient somit zur Regulation von Wanderung und Differenzierung (Rassow *et al.* 2008).

1.4 Die Nierenfibrose

Die gemeinsame Endstrecke chronisch progredienter Nierenerkrankungen ist die tubulointerstitielle Fibrose. Fibrose ist definiert durch quantitative und qualitative Veränderungen in der EZM. Das Ausmaß der renalen Fibrose korreliert sehr eng mit dem Fortschreiten einer chronischen Niereninsuffizienz. Daher ist eine Quantifizierung des Fibrosegrades in renalen Biopsien ein wichtiger Bestandteil der histologischen Einschätzung und der pathologischen Klassifizierung der Nierenfibrose (Zeisberg und Neilson 2010). Trotz der vielfältigen Ursachen gibt es morphologische Ähnlichkeiten im Fibrosierungsprozess zwischen der renalen Fibrose und der in anderen Organen wie Leber, Herz und Lunge (Wynn 2008). Das Histomorphologische Bild speziell der Nierenfibrose ist gekennzeichnet durch eine vermehrte Fibroblasten-Akkumulation, eine pathologische Ablagerung von EZM-Proteinen im Interstitium, eine Infiltration durch mononukleäre Zellen mit gleichzeitiger Atrophie und eine Rarefizierung der Tubuli und Kapillaren. Die Folgen sind eine zunehmende Verhärtung und Vernarbung des Organs mit kontinuierlichem Funktionsverlust über einen Zeitraum von mehreren Jahren (Zeisberg und Neilson 2010).

Glomeruläre Hypertension, systemischer und introglomerulärer Bluthochdruck, glomeruläre/tubuläre Hypertrophie und tubulointerstitielle Veränderungen sind sekundäre Faktoren, welche die Progression der Nierenfibrose trotz Beseitigung des primären Auslösers fördern (Strutz und Muller 1999).

Die Fibrogenese ist mit der normalen Wundheilung vergleichbar. Eine Matrixakkumulation ist unter physiologischen Bedingungen ein Reparaturversuch des verletzten Gewebes und lokal auf den Ort der Schädigung begrenzt. Im gesunden Interstitium besteht ein Gleichgewicht zwischen Matrixakkumulation und Matrixdegradation (Strutz und Muller 1999). Das heißt, zur Rekonstruktion der ursprünglichen Gewebearchitektur ist nicht nur eine Wiederbesiedelung mit Parenchymzellen, sondern auch ein Umbau der EZM erforderlich. Hierfür sind bestimmte Proteasen (Plasminogen-/ Plasmin- und Matrix-Metalloproteinasen) erforderlich, die durch renale Myofibroblasten produziert werden (Meran und Steadman 2011).

Das Ziel der regenerativen Wundheilung ist also der Erhalt und die Normalisierung der Organfunktion. Bei chronischen Nierenerkrankungen sind diese Vorgänge gestört. Der ständige Schädigungsreiz führt letztendlich zur Chronifizierung und dem Verlust der Organfunktion (Strutz und Muller 1999).

Pathogenese der Nierenfibrose

Das normale Interstitium besteht aus Kollagenen (Typ I und III), Proteoglykanen und verschiedenen interstitiellen Zellen wie z.B. ortsständige Fibroblasten, Makrophagen und Endothelzellen (Strutz und Muller 1999). Ein wichtiger Schritt in der Entstehung der Nierenfibrose ist die Infiltration des Parenchyms durch mononukleäre Entzündungszellen wie Lymphozyten und Makrophagen (Zeisberg und Kalluri 2013). Diese Zellen setzen Fibrose fördernde Zytokine wie TGF- β frei, die wiederum zur Aktivierung und Proliferation der ortsständigen Fibroblasten führt. Aktivierte Fibroblasten sind verantwortlich für die vermehrte Ablagerung von EZM-Proteinen im Interstitium. Die überproportionale Ablagerung von Kollagen Typ- I/III/VI sowie Kollagen Typ IV- und Fibronectin führt zur Erweiterung der intratubulären Zwischenräume und zerstört die renale Mikroarchitektur (Strutz und Muller 1999). Neben profibrotischen Metaboliten, wie beispielsweise radikale Sauerstoffspezies, regeln Parenchymzellen die Fibrogenese durch Sekretion von Chemokinen und Wachstumsfaktoren, wie z.B. TGF- β (Zeisberg und Kalluri 2013). Aber auch mechanischer Stress begünstigt die Umwandlung der Fibroblasten in kontraktile Myofibroblasten (Meran und Steadman 2011).

TGF- β

Die Familie der TGF- β -Zytokine (*transforming growth factor*) wurde erstmals in den frühen 1980er Jahren beschrieben. Seither wurden zahlreiche Isoformen entdeckt (Löffler *et al.* 2007).

Die TGF- β -Isoformen regulieren eine Vielzahl biologischer Prozesse. Sie kontrollieren die epitheliale und mesenchymale Zellproliferation und Differenzierung. Somit sind sie auch essentiell für die Embryonalentwicklung. Eine abnormale Regulation im TGF- β -Signalweg kann beispielsweise zu entzündlichen Erkrankungen, Nieren- und pulmonale Fibrose, Leberzirrhose, Glomerulonephritis und zu diabetischer Nephropathie führen. TGF- β ist ein entscheidender Regulator der Fibrogenese. Die Fibrose ist durch eine erhöhte Produktion von ECM-Komponenten, wie z.B. Fibronectin, Kollagen und Laminin, sowie durch die Proliferation, Migration und Akkumulation von mesenchymalen Zellen gekennzeichnet (Differenzierung der aktivierten lokalen Fibroblasten in Myofibroblasten). Ein wichtiger Effektor der TGF- β -induzierten Fibrose ist der sogenannte *connective tissue growth factor* (cTGF). Er bindet direkt an TGF- β , was zur Steigerung der Aktivität führt. TGF- β induziert die cTGF-

Expression in Fibroblasten, die Kollagen-Synthese und Myofibroblastendifferenzierung (Santibanez *et al.* 2011).

1.5 Chronische Nierenerkrankungen

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts zählten Infektionskrankheiten noch zu den Haupttodesursachen. Heute sind diese längst von den chronischen Erkrankungen abgelöst worden. Die weltweit steigende Prävalenz der chronischen Nierenerkrankungen und die daraus resultierende terminale Niereninsuffizienz spiegelt diese Veränderung wider (Atkins 2005). Weltweit wird die Anzahl an CKD betroffenen auf 50 Millionen eingeschätzt (Li 2010).

Die zwei wichtigsten Ursachen für die Entstehung einer CKD sind die arterielle Hypertonie und der Diabetes mellitus. Der Lebensstil in den Industrieländern, gekennzeichnet durch Überernährung und Bewegungsmangel, ist die fördernde Hauptursache dieser Erkrankungen (Bakris und Ritz 2009). Tubulointerstitielle und glomeruläre Schäden durch Infektionen, Toxine und Medikamentenmissbrauch können als weitere Ursachen aufgeführt werden (Levey und Coresh 2012). Das kardiovaskuläre Risiko chronisch Nierenkranker ist zusätzlich erhöht und konnte durch zahlreiche Studien belegt (Eckardt *et al.* 2012, Khosla und Bakris 2006).

Die stetige Zunahme an chronisch Nierenkranken stellt eine enorme finanzielle Belastung für das Gesundheitssystem dar. Aus medizinischer und ökonomischer Sicht ist es daher notwendig, die Risikofaktoren für die Entstehung einer chronischen Nierenerkrankung früh zu erkennen, um dagegen vorzugehen (Atkins 2005).

Die chronische Nierenkrankheit ist definiert durch einen langsamen, über Monate bis Jahre progredienten Verlust der Nierenfunktion sowie das Vorhandensein struktureller Nierenschäden. Die Klassifikation erfolgt nach der Grunderkrankung, der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und Albuminurie. Zur Stadien-Einteilung wird die GFR herangezogen. Stadium I ist definiert durch eine GFR von $> 90 \text{ ml/min/1.73m}^2$, Stadium II mit $60 - 89 \text{ ml/min/1.73m}^2$, Stadium III mit einer GFR von $30 - 59 \text{ ml/min/1.73m}^2$ und Stadium IV mit $15 - 29 \text{ ml/min/1.73m}^2$. Im Stadium V ist die terminale Niereninsuffizienz erreicht. Hierbei kann es durch eine stark vermehrte Ansammlung von harnpflichtigen Substanzen über den Normwert hinaus zur einer Urämie kommen. Spätestens hier ist hier der Beginn einer Nierenersatztherapie in Form von Dialyse oder Nierentransplantation überlebenswichtig (Coresh *et al.* 2007, Levey und Coresh 2012).

Ursachen

Der Begriff der „chronischen Nierenkrankheit“ ist eine zusammenfassende Bezeichnung für eine äußerst heterogene Gruppe von Erkrankungen, die Struktur und Funktion von Nieren negativ beeinflussen. Eine der Hauptursachen der chronischen Niereninsuffizienz ist der Diabetes mellitus Typ 2 und die daraus resultierende diabetische Nephropathie. Sie ist charakterisiert durch eine progrediente Proteinurie (vorwiegend Albumin), Bluthochdruck und eine stetige Abnahme der glomerulären Filtrationsrate. Die Anzahl an Diabetes-Patienten wird weltweit auf über 240 Millionen geschätzt, mit steigender Tendenz. Ein weiterer Risikofaktor, sowohl bei der Entstehung der nichtdiabetischen als auch der diabetischen Nephropathie ist die arterielle Hypertonie (RR >140/90 mmHg). Patienten mit einer hypertensiven Nephrosklerose können bei reduzierter GFR eine Albuminurie aufweisen (Levey und Coresh 2012). Niereninsuffizienz und ein erhöhter Blutdruck bewegen sich dabei in einem Teufelskreis: Die verminderte Nierenfunktion ist eine der Hauptursachen für den erhöhten Blutdruck, während die Hypertonie wiederum ein Hauptfaktor für die Entstehung einer Niereninsuffizienz ist. Mit zunehmendem Alter steigt auch das Risiko, an Bluthochdruck und Diabetes mellitus zu erkranken. Die Anzahl der Patienten mit arterieller Hypertonie wird weltweit auf ca. 1 Billion geschätzt (Bakris und Ritz 2009).

Epidemiologie

Im Jahresbericht der Quasi-Niere wurden für Deutschland für das Jahr 2006 insgesamt 91.718 Patienten gemeldet die eine Nierenersatztherapie erhalten haben. Davon waren 66.508 dialysepflichtig und 25.210 befanden sich in der Nachsorge nach einer Nierentransplantation. Daraus ergibt sich eine Gesamtprävalenz von 1.114 pro Million Einwohner. Im Vergleich dazu betrug die Prävalenz im Jahr 1996 noch 713 pro Million Einwohner. Es zeigt sich also auch eine deutliche Zunahme der Gesamtprävalenz für Deutschland (Coresh *et al.* 2007, Frei und Schober-Halstenberg 2006).

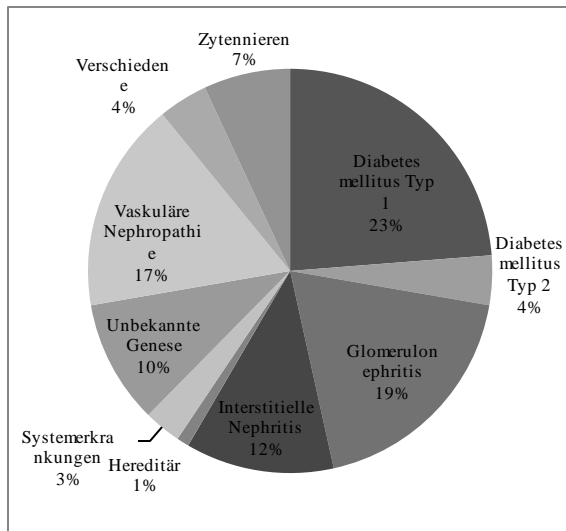


Abbildung 1: Diagnoseverteilung bei lebenden Dialysepatienten in Nierenersatztherapie (Prävalenz) im Jahr 2006 (Frei und Schober-Halstenberg 2006)

1.6 Vitamin D₃

Schon in den frühen 20er Jahren des 20. Jahrhunderts war Vitamin D als Anti-Rachitis-Faktor im Lebertran bekannt. Die chemische Struktur wurde in den 30er Jahren aufgeklärt und wieder 30 Jahre später gelang die erste Synthese des Vitamins.

Der tägliche Vitamin-D-Bedarf eines Erwachsenen beträgt ca. 2,5 µg/d. Kinder, Schwangere und stillende Mütter haben mit 10 µg/d einen erhöhten Bedarf. Zum größten Teil wird der Vitamin-D-Bedarf durch photochemische Eigensynthese gedeckt. In den meisten Lebensmitteln (Eier, Butter, Milch, Fleisch) ist nur wenig bis gar kein Vitamin D enthalten, mit Ausnahme von Fischleberölen. Die Fähigkeit des Organismus, den Vitamin-D₃-Bedarf bei ausreichender Sonneneinstrahlung zu decken, zeigt, dass Vitamin D eigentlich kein Vitamin ist. Vielmehr ist es ein Prohormon, das im Körper durch diverse Zwischenschritte zum biologisch aktiven Calcitriol umgewandelt wird (Nuhn 2009).

Calcitriol-Synthese und Calcitriol-Regulation

Das körpereigene Vitamin D₃ wird auch als Cholecalciferol bezeichnet und ist zunächst biologisch inaktiv. Aus dem in der Leber gebildeten 7-Dehydrocholesterol entsteht mittels UVB-Bestrahlung in den Keratinozyten der Haut zunächst Provitamin D und anschließend durch Isomerisation Vitamin D₃ (Holick 2007). Um den Transport zur Leber zu ermöglichen und Photoisomerisierungen zu toxischen Produkten zu verhindern wird Cholecalciferol an DBP (Vitamin D-Bindeprotein) gekoppelt. In der Leber erfolgt anschließend durch diverse Cytochrom-P-450-Enzyme die Hydroxylierung zum 25-Hydroxycholecalciferol (Calcidiol).

Calcidiol ist die Speicherform des Vitamin D₃. Seine Halbwertszeit beträgt ca. ein bis zwei Monate. So kann in Zeiten mit weniger Sonneneinstrahlung die Vitamin D₃-Konzentration im Blut weitgehend konstant gehalten werden. In der Niere wird schließlich im letzten Schritt mittels der 1 α -Hydroxylase die Bildung zur biologisch aktiven Form des Vitamin D₃, dem Calcitriol katalysiert. Diese Funktion ist bei chronischen Nierenerkrankungen beeinträchtigt (Dusso *et al.* 2005, Nuhn 2009).

Die Regulation der 1 α -Hydroxylase in der Niere unterliegt einem komplexen Regelkreis. Die Aktivierung erfolgt über einen erhöhten Parathormon-Spiegel sowie Östrogen und Calcitonin bei einem gleichzeitig erniedrigten Calcium- und Phosphatspiegel (Johal und Levin 2009). Calcitriol wiederum hemmt durch negative Rückkopplung die 1 α -Hydroxylase und aktiviert die 24-Hydroxylase. Beide Hydroxylasen unterliegen dabei einem reziproken Mechanismus. Neben der renalen Calcitriol-Synthese ist auch eine extrarenale Produktion bekannt. Die 1 α -Hydroxylase wurde in zahlreichen Organen einschließlich Prostata-, Brust-, Dickdarm-, Lungen-, Pankreas- und Nebenschilddrüsenzellen nachgewiesen. Das extrarenal gebildete Calcitriol dient in erster Linie überwiegend als autokriner/ parakriner Faktor für die Zellfunktionen (Dusso *et al.* 2005).

Vitamin-D-Rezeptor-Signaltransduktion

Die Entdeckung des Vitamin-D-Rezeptors ist auf Houssler und Norman zurückzuführen. Sie legten 1969 den Beweis für die Existenz eines chromosomalen Proteins zur Bindung von Calcitriol (1,25(OH)₂D₃) mit hoher Affinität vor (Minghetti und Norman 1988). Der VDR-Rezeptor gehört zur Familie der Steroidrezeptoren (Haussler *et al.* 1997) und wirkt als Ligand-aktivierender Transkriptionsfaktor. 1,25(OH)₂D₃ wirkt in den Zellen der Zielorgane wie ein Steroidhormon. Über die Bindung an den intrazellulären Vitamin-D-Rezeptor wird Calcitriol in den Zellkern transportiert. Im Zellkern erfolgt die Transkription verschiedener Vitamin-D₃-sensitiver-Gene und führt zu Veränderungen in der Proteinsynthese mit korrespondierenden Wirkungen (Dusso *et al.* 2005).

Klassisch-kalzämische Calcitriol Effekte

Für die Aufrechterhaltung der Calcium-Homöostase ist ein Zusammenspiel verschiedener Organsysteme notwendig. Calcitriol reguliert die Wechselwirkungen zwischen Niere, Knochen, Nebenschilddrüse und Darm. Für die normalen zellulären Funktionen und den Knochenmetabolismus ist es von entscheidender Bedeutung, den extrazellulären

Calciumspiegel in engen Grenzen zu Halten (Dusso *et al.* 2005). Durch die VDR-Expression in nahezu allen Organen werden diese zahlreichen Effekte ermöglicht (Li 2010). Die klassischen Zielorgane des Vitamin-D-Stoffwechsels sind somit Darm, Knochen, Nieren und Nebenschilddrüse (Dusso *et al.* 2005). Die bekannteste Funktion des Vitamin-D-Stoffwechsels ist die Regulation des Calcium/Phosphat-Haushaltes und die damit zusammenhängende Knochenmineralisierung. Für die Absorption von Calcium und Phosphat aus dem Dünndarm ist Vitamin D₃ essentiell. Die vermehrte Transkription der Calciumkanäle (TRPV5 und TRPV6) wird durch den Calcitriol-VDR-Komplex induziert. Dafür muss der Komplex in ausreichender Menge zur Verfügung stehen. Nach Aufnahme in die Dünndarmzellen wird Calcium, gebunden an Calbindin D, durch die Zelle transportiert und anschließend über einen Na⁺/Ca²⁺-Austauscher in die Blutbahn abgegeben (Hoenderop *et al.* 2003). Zusätzlich erhöht 1,25(OH)₂D₃ die aktive Phosphatabsorption über eine vermehrte Expression der Na-Pi Ko-Transporter im Darmlumen. Über die molekularen Mechanismen in Bezug auf die Phosphatabgabe in den Blutkreislauf ist allerdings wenig bekannt (Brown *et al.* 1999). Im Knochen ist Calcitriol für die Knochenmineralisierung von großer Bedeutung. Ein Mangel führt bei Kindern zur Rachitis und bei Erwachsenen zur Osteomalazie (Li *et al.* 1998). Die 1,25(OH)₂D₃-induzierte Knochenneubildung erfolgt nicht nur über die Erhöhung von Calcium und Phosphat im Blut sondern auch die Knochenneubildung durch Induktion der Synthese von Knochenmatrixproteinen und mineralischer Apposition (Brown *et al.* 1999). Die Regulation der Nebenschilddrüsen erfolgt über Parathormon (PTH) und Calcitriol. Die Schlüsselrolle spielt dabei das PTH. Es stimuliert die Synthese von 1,25-Dihydroxycholecalciferol durch Aktivierung der 1 α -Hydroxylase und verringert die 24-Hydroxylasetätigkeit, wodurch indirekt auch die Calciumabsorption im Darm gesteigert wird (Johal und Levin 2009). 1,25(OH)₂D₃ hemmt die Synthese und Sekretion vom Parathormon und steuert das Zellwachstum in der Nebenschilddrüse. Bei der Pathogenese des sekundären Hyperparathyreodismus spielt der Vitamin-D-Mangel eine erhebliche Rolle (Brown *et al.* 1999, Li *et al.* 1998).

Die Niere ist für die Aufrechterhaltung der Calcium- und Phosphat-Homöostase essentiell. Calcium und anorganisches Phosphat werden in den Nierenkörperchen filtriert und im Tubulussystem resorbiert. Dies wird durch Calcitriol und PTH reguliert (Kumar *et al.* 2012). Calcitriol supprimiert am Ort seiner Bildung gleichzeitig die 1 α -Hydroxylase Aktivität und stimuliert die der 24-Hydroxylase. Sehr wahrscheinlich kommt es auch zu einer Megalinexpression im proximalen Tubulussystem (Liu *et al.* 1998). Die Calciumresorption

im proximalen Nierentubulus wird analog zum Darm durch Aktivierung der Transkription des renalen TRPV5 und Calbinin erhöht. Weiterhin beschleunigt Calcitriol die PTH-abhängige Calciumresorption im distalen Tubulus und verbessert die Phosphatresorption in Gegenwart von PTH (Dusso *et al.* 2005, Hoenderop *et al.* 2003).

Pleiotrope Calcitrioleffekte

In den vergangenen Jahrzehnten konnten durch zahlreiche Studien nichtklassische Vitamin D-Zielorgane identifiziert werden (Li 2010). Unter Verwendung von Tiermodellen konnten Effekte wie die Hemmung der Tumorprogression, diverse Auswirkungen auf das Herz-Kreislaufsystem und Haut sowie die Modulation des angeborenen Immunsystems nachgewiesen werden (Christakos *et al.* 2013). Was die Auswirkungen von Calcitriol auf die Pathogenese der Nierenfibrose betrifft, ist hier die Erforschung des RAAS und des NF- κ B-Signalweges besonders hervorzuheben.

1.7 Das RAA-System und seine Auswirkungen auf die Niereninsuffizienz

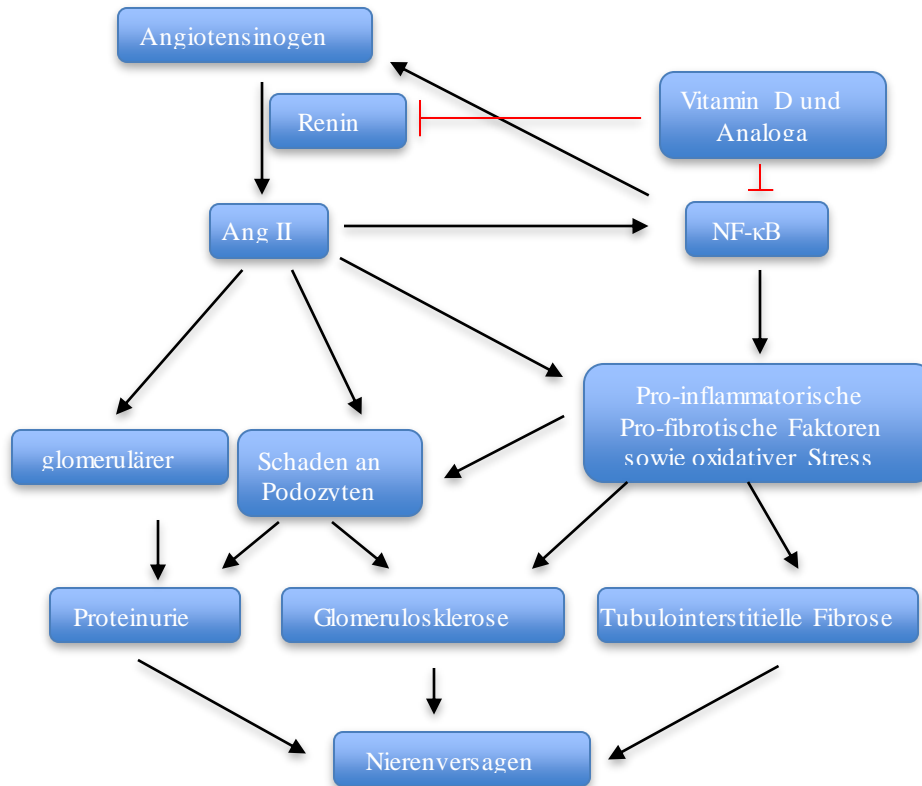


Abbildung 2: Mechanismen der nephroprotektiven Wirkung von Vitamin D und seinen Analoga (modifiziert von Li 2010).

Das RAAS und die Aktivierung des NF-κB-Signalwegs spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Nierenschäden. Sie fördern die Produktion von profibrotischen und proinflammatorischen Faktoren, erhöhen den oxidativen Stress und schädigen die Podozyten. Hämodynamische Wirkungen von ANG II auf die Glomeruli begünstigen die Proteinurie. ANG II kann NF-κB aktivieren, was wiederum die Expression von Angiotensinogen stimuliert. Vitamin D und seine Analoga hemmen die Renin-Expression und supprimieren die NF-κB-Aktivierung auf molekularer Ebene. Angiotensinogen wird ebenfalls durch die Beeinflussung des NF-κB-Signalweges supprimiert.

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System spielt eine zentrale Rolle in der Blutdruckregulation und Steuerung des Wasser- und Elektrolythaushaltes. Es ist ein Regelkreis in dem die Komponenten in enger Wechselwirkung zueinander stehen. Das physiologisch wirksame Endprodukt ist Angiotensin II (Speckmann *et al.* 2005). Renin ist eine Protease, die in den Epitheloidzellen des juxtaglomerulären Apparates gebildet wird und ist die geschwindigkeitsbestimmende Komponente im RAAS (Li *et al.* 2002). Die Freisetzung unterliegt dabei einer Reihe von verschiedenen Faktoren. Beispielsweise wird durch β_1 -adrenerge Stimulation, Blutdruckabfall, verminderte glomeruläre Durchblutung und eine niedrige NaCl-Konzentration im Harn eine vermehrte Reninausschüttung bewirkt. Faktoren

wie Angiotensin II (negative Rückkopplung), Endothelin, Vasopressin und Adenosin bewirken eine Renininhibition (Hackenthal *et al.* 1990).

Renin spaltet das in der Leber synthetisierte Glykoprotein Angiotensinogen zu Angiotensin I. Das Angiotensin-Converting Enzym (ACE) katalysiert anschließend die Umwandlung von Angiotensin I zu dem biologisch aktiven Angiotensin II. Über die Bindung an seine Rezeptoren kann Angiotensin II nun seine Wirkung in Bezug auf den Wasser- und Elektrolythaushalt und dem Blutdruck entfalten (Hackenthal *et al.* 1990, Speckmann *et al.* 2005). Eine inadäquate Stimulation des RAAS wird häufig mit einem hohen Risiko für arterielle Hypertonie, Herzinfarkt und Schlaganfall in Verbindung gebracht (Li 2003). Neben seinen physiologischen Aufgaben hat Angiotensin II auch diverse pathologische Auswirkungen wie beispielsweise die Vasokonstriktion, die Induktion von oxidativem Stress, die Zellproliferation sowie die Entzündung und Fibrose. In der Niere fördert es durch verschiedene Mechanismen die Progression des Nierenschadens bis hin zur terminalen Niereninsuffizienz. Zu den entscheidenden Faktoren gehören der erhöhte glomeruläre Druck, die Freisetzung von Fibrose und entzündungsfördernden Zytokinen sowie von TGF- β . Weitere Aspekte sind die Förderung der Infiltration durch Zellen der Immunabwehr, Hypertrophie, vermehrte Synthese von EZM und die Schädigung der Podozyten (Brewster und Perazella 2004, Ruster und Wolf 2006).

Aufgrund der entscheidenden zentralen Rolle von Renin im RAAS ist eine strenge Regulation der Renin-Synthese und -sekretion von wesentlicher Bedeutung (Li 2003). Viele epidemiologische und klinische Studien deuten auf einen Zusammenhang zwischen einem niedrigen Vitamin-D-Spiegel und einer erhöhten Plasma-Renin-Aktivität hin (Dusso 149, 151). Li *et al.* 2002 konnten bei VDR $-/-$ knock out Mäusen eine deutliche Zunahme der Reninexpression und damit verbundene vermehrte Angiotensin II-Produktion mit Bluthochdruck und einer erhöhten Flüssigkeitsaufnahme feststellen. Die Inhibition der Calcitriol-Biosynthese in Wildtypmäusen führte ebenfalls zu einer erhöhten Renin Synthese. Die Therapie mit Calcitriol wiederum supprimierte die Reninproduktion (Li *et al.* 2002).

Angiotensin-Converting-Enzym (ACE)

Das ACE ist eine Dipeptidylcarboxypeptidase und wird hauptsächlich in der Lunge, aber auch in den Epithelzellen des proximalen Nierentubulus gebildet (Santos *et al.* 2012). ACE spielt eine entscheidende Rolle in der Hydrolyse von AT I in AT II und es inaktiviert gefäßerweiternde Peptide wie Bradykinin. Die gefäßerweiternde Wirkung von Bradykinin beruht auf Freisetzung von Stickstoffmonoxid und Prostacyclin.

Vitamin-D-Mangel und seine Auswirkungen

Ein Vitamin-D-Mangel ist bei Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen schon in den frühen Stadien zu beobachten. Wie schon erwähnt, nimmt Calcitriol eine bedeutende Rolle in der Entstehung und Progression chronischer Nierenerkrankungen ein. Zum einen führt die verminderte 1α -Hydroxylierung von Calcidiol und die zusätzliche Supprimierung des Enzyms durch erhöhte Phosphatwerte zum Vitamin D-Mangel. Auch die verminderte Megalin-vermittelte Resorption von Calcidiol ist stark beeinträchtigt. Sie ist insbesondere auf die Proteinurie und den daraus folgenden Mangel an Vitamin-D-bindenden Proteinen zurückzuführen (Li 2010).

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Programme

Tabelle 2: Verwendete Geräte und Programme

Produkt	Hersteller
Analyseautomat	Cobas®8000 Modular Analyzer, Roche® (Basel, Schweiz)
Photometer	BioTek Synergy™ HAT (Bad Friedrichshall, Deutschland)
Gefrierschrank	Vip Serie -86° Sanyo (Bad Nenndorf, Deutschland)
Heizblock	Liebisch TRL-288 (Bielefeld, Deutschland)
Mikrotom Autocut Mikrotom	Reichert-Jung 2040, AutoCut 2040 (Nussloch, Deutschland)
Mikropipetten	Eppendorf Research® (Hamburg, Deutschland)
Mikroskop (Axciovert S100 TV)	Zeiss Axiovert S100 TV (Oberkochen, Deutschland)
UV-Analyzer	BioDoc Analyze (Hannover, Deutschland)
Pipetierhilfe	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Programm zur densitometrischen Auswertung	Image J
Scanner	Hewlett Packard Office Jet R 45
Steril Werkbank HERA Safe	Heraeus HERA Safe (Hanau, Deutschland)
Blotting-Kammer	Bio-Rad, Mini Protean™ (München, Deutschland)
Blotting-Netzteil	Bio-Rad, Mini Protean™ (München, Deutschland)
Thermo Cycler	Biometra T Professional (Göttingen, Deutschland)

Homogenisator	Ultra-Turrax®, Jahnke und Kunkel (Staufen im Breisgau)
Graph Pad Prism	GraphPad Software, Inc., (San Diego, USA)
Thermo Cycler	
Vortexer	IKA® Labortechnik (Staufen im Breisgau, Deutschland)
Wasserbad	Vieth, Mikrotome GmbH (Wiesmoor, Deutschland)
Western Blot Kassette	IKA® Labortechnik (Staufen im Breisgau, Deutschland)
Elektrophoresekammer	X Cell Sure Lock™, Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Zentrifuge Mikro 200R	Hettich Mikro 200 R (Tuttlingen, Deutschland)
Wippe	Heidolph Duomax 1030 (Schwabach, Deutschland)
Programm Mikroskopie	Olympus Cell D (Shinjuku, Japan)
Entwässerung	Leica TP 1020 (Wetzlar, Deutschland)
Paraffingus	Melite Tissue Block Dispenser PAG 12
Thermoplatte	Schütt (Göttingen, Deutschland)
Trockenofen	Sanyo Convection Oven (Morigucho, Japan)
Entwickler	Konica SRX 101 A (Langenhagen, Deutschland)
Programm Extinktionsbestimmung	BioTek KC4™ (Bad Friedrichshall, Deutschland)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf Research® (Hamburg, Deutschland)
Reaktionsgefäße	Biozym, 1,5 ml (Hess. Oldendorf, Deutschland)

Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Einmalkanülen	Sterican 26 G (Kronberg/Taunus, Deutschland)
Einwegspritzen	Transcojet (Neumünster, Deutschland)
Reaktionsgefäße	Falcon® Blue Max™ (Becton Dickinson, USA)
ELISA Platte	Greiner bio-one, 96-well (Frickenhausen, Deutschland)
Whatmann-Papier	Bio-Rad Filter Paper™ (München, Deutschland)
PVDF-Membran	Bio-Rad Immun-Blot (München, Deutschland)
Einmalhandschuhe	Meditrade (Kiefersfelden, Deutschland)
Einbettkassette	Kabe Labortechnik (Nümbrecht -Eisenroth, Deutschland)
Einmalpipetten	Greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland)
Polyacrylamid-Fertiggel	Invitrogen™ 4 - 12 % Tris-Glycine Gel 1,5mm x 10 oder 15 well (Darmstadt, Deutschland)
Röntgenfilm	Fuji Safelight (Minato, Japan)
Röntgenkassette	Fuji (Minato, Japan)
Objektträger	Menzel Superfrost 75x25 mm (Braunschweig, Deutschland)
Deckgläser	Menzel 24x24 mm (Braunschweig, Deutschland)

2.1.3 Antikörper und Medikamente

Tabelle 4: Verwendete Antikörper und Medikamente

Produkt	Hersteller
TGF-Primärantikörper	Monoklonaler Antikörper aus Maus, R&D Systems, MAB 240 (Minneapolis, MN)
cTGF-Primärantikörper	Polyklonaler rabbit-anti-mouse Antikörper, Biovision, 5553R (Cambridge, England)
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)
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 IT, Goat-anti-rabbit-Cy3 (West Grove, PA)
Sekundärantikörper Fibronectin	Jackson IT, Goat-anti-mouse-Cy3 (West Grove, PA)
Calcitriol (0,03µg/kg, 5 x/Woche, i.p.)	Abbott (Chicago, Illinois, USA)
Ramipril Batch N205; MW 416,51 (40g Ramipril wurden in 1 ml absolut Ethanol aufgelöst und auf einen Liter mit Leitungswasser ausgefüllt.)	Sanofi-Aventis (Paris, Frankreich)

2.1.4 Reagenzien, Lösungen und Chemikalien

Tabelle 5: Verwendete Reagenzien und Lösungen sowie Chemikalien

Produkt	Hersteller
Agarose	Biozym LE Agarose (Hess. Oldendorf, Deutschland)
Chloroform	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Ethanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Methanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Coomassie-Färbelösung	Roth, Roti Blue 5x (Karlsruhe, Deutschland)
Chemolumineszenz-Reagenz A	PerkinElmer, Western Lightning® Enhanced Luminol Reagent Plus (Massachusetts, USA)
Chemolumineszenz-Reagenz B	PerkinElmer, Western Lightning® Oxidizing Reagent Plus (Massachusetts, USA)

Magermilch	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Molekulargewichtsmarker	Invitrogen TM SeeBlue [®] Prestained Standard (Darmstadt, Deutschland)
DNA-Extraktion	Qiagen DNeasy[®] Blood & Tissue Kit (Hilden, Deutschland)
Nukleotide	Invitrogen TM dATP, dCTP, dGTP, dTTP (je 100 mM), (Darmstadt, Deutschland)
Ethidiumbromid	0,06 %, Roth (Karlsruhe, 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')
Marker DNA-Bandengröße	Fermentas Gene Ruler TM 100bp Plus DNA Ladder (St. Leon-Rot, Deutschland)
Tween	Merck (Darmstadt, Deutschland)
DNA-Polymerase	Finnzymes F-100L (Vantaa, Finnland)
EDTA	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
EGTA	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumvanadat	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Brij-35	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
PMSF	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Kaliumphosphat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Glycerin	Roth (Karlsruhe, Deutschland)

Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Bradford-Reagenz	Bio-Rad Protein Assay (München, Deutschland)
Proteinkinase K	Qiagen, > 600 mAU/ml (Hilden, Deutschland)
Einbettungsmedium	DAKO Fluorescent Mounting Medium (Glostrup, Dänemark)

2.1.5 Puffer

Tabelle 6: Verwendete Puffer

Produkt	Hersteller
Probenpuffer	Invitrogen™ NuPage® LDS Sample Buffer, 2x (Darmstadt, Deutschland)
Citrat-Puffer	Lösung. A: 4,2 g Citroensäuremonohydrat ad 200 ml dH ₂ O, Lösung. B: 14,7 g Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat ad 500 ml dH ₂ O; 9 ml Lsg. A + 41 ml Lösung B + 450 ml dH ₂ O (pH 6,0)
PCR-Probenpuffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,03% Bromphenolblau, 60% Glycerol, 60 mM EDTA
Laufpuffer	Invitrogen™ NuPage® MOPS SDS Running Buffer (Darmstadt, Deutschland)
Reduktionspuffer	Invitrogen™ NuPage® Sample Reducing Agent 10x (Darmstadt, Deutschland)
Stripping Puffer	Thermo Scientific, Restore Western Blot Stripping Buffer (Waltham, Massachusetts, USA)
Transferpuffer	Invitrogen™ NuPage® Transfer Buffer (Darmstadt, Deutschland)
Tris-Puffer	50 mM, pH 7,74
TAE	50x, 2 mM Tris, 50 MM EDTA, 1m Essigsäure

TBST	10x, 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, HCl bis pH 7,6
Lysepuffer	10 mM Kaliumphosphatpuffer (pH=7,0), 10mM EDTA, 5mM EGTA, 10mM MgCl ₂ , 50mM β - Glycerophosphat, 1mM Natriumvanadat, 0,5 % NP-40, 0,1 % Brij-35, 1mM PMSF, 10μM Pepstatin, 10μM Leupeptin

2.1.6 Versuchstiere

Für alle Experimente wurde der Mausstamm 129/ SvJ (COL4A3 *-/-* knock out) der Firma Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) verwendet. Der Tierversuchsantrag wurde regelrecht gestellt und genehmigt. Das Aktenzeichen des Tierversuchsantrages lautet: 33.9.-42502-04-10/0163. Die Zucht, Pflege und Versorgung der Tiere erfolgte in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen.

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Isolation aus Mäuseschwanzbiopsien

Die DNA-Präparation erfolgte mit dem DNeasy® Blood & Tissue Kit von der Firma Qiagen. Das Kit enthielt alle Reagenzien, außer 100 % Ethanol. Die Isolation erfolgte nach dem Qiagen Spin - Column Protokoll (Purification of total DNA from animal Tissues).

Die in den Reaktionsgefäßen befindlichen Biopsien wurden mit jeweils 180 μl ATL Puffer und 20 μl Proteinkinase K über Nacht bei 56 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss wurden die Proben mit 200 μl AL-Puffer und der identischen Menge 100 % Ethanol gemischt und auf eine Säule pipettiert. Der Ansatz wurde eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert und der Säulendurchfluss verworfen. Anschließend wurde auf die Säule 500 μl AW1 Puffer gegeben und nochmals eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wieder verworfen. Danach wurde die Probe mit 500 μl AW2 Puffer versetzt und drei Minuten bei 13500 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde auf einen neuen Durchfluss gesetzt mit

200 µl AE-Puffer gemischt, eine Minute inkubiert und noch einmal eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Die isolierte DNA wurde über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2.2 Genotypisierung/ COL4A3 PCR

Die PCR wurde in einem Volumen von 25 µl angesetzt. Der PCR-Mix bestand aus folgenden Komponenten:

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

Die Amplifizierung der DNA erfolgte in 45 Zyklen (2,5 Minuten bei 72 °C, eine Minute bei 95 °C, eine Minute bei 58 °C).

2.2.3 Agarose – Gelelektrophorese

Für das Agarose-Gel (1,5 %) wurden 0,45 g Agarose mit 30 ml 1x TAE Puffer in der Mikrowelle aufgekocht und mit 0,2 % Ethidiumbromid versetzt und anschließend in eine Gelkammer gegossen. Danach wurden die PCR-Produkte mit 6x Probenpuffer gemischt, auf das Gel aufgetragen und bei 70 V für eine Stunde aufgetrennt. Die Visualisierung der PCR erfolgte unter UV-Licht mit Hilfe des BioDoc Analyze.

2.2.4 Chloroform-Methanol-Protein-Fällung

Von den aufgetauten Urinproben wurden zunächst 20 µl Urin mit 80 µl dH₂O gemischt. Schrittweise wurde dem Gemisch 400 µl Methanol, 100 µl Chloroform und 300 µl dH₂O dazugegeben. Vor jedem Schritt wurden die Proben gemischt und eine Minute bei 14000 g zentrifugiert. Die obere Phase (ca. 900 µl) wurde vorsichtig abgenommen. Das zu isolierende Protein befand sich unter der ersten Phase. Zum Waschen des Proteins wurde der Probe 400 µl Methanol zugefügt und zwei Minuten bei 14000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Probe erneut mit 400 µl Methanol gewaschen. Das Überschüssige Methanol wurde erneut abgenommen und die Proben mit offenem Deckel unter der Sterilbank getrocknet.

2.2.5 Urin – Elektrophorese

Nach der Trocknung der isolierten Proteine wurden diese in 15 µl NuPage 2x Probenpuffer aufgenommen. Anschließend erfolgte die Denaturierung für fünf Minuten bei 95 °C, auf einem dafür vorgesehenen Heizblock. Danach wurden die Proben für fünf Minuten auf Eis gestellt.

In die Elektrophoresekammer wurden Polyacrylamid - Fertiggele eingesetzt und die Kammer zwischen den Gelen zu $\frac{3}{4}$ mit dem Laufpuffer aufgefüllt. Nach Überprüfung der Dichte wurde die Kammer zu $\frac{2}{3}$ mit dem Laufpuffer aufgefüllt. In die Probenaschen wurde je 15 µl der vorbereiteten Proben pipettiert. In die erste Tasche wurden insgesamt 10 µl des Molekulargewichtsmarkers pipettiert. Anschließend wurde die Elektrophoresekammer an das Stromgerät angeschlossen. Zunächst für 30 Minuten bei 80 V, danach 60 Minuten bei 120 V. Nach Ablauf der Elektrophorese wurden die Gele aus den Platten gelöst und über Nacht in einer fünffach verdünnten Coomassie-Blue-Lösung inkubiert. Um die überschüssige Farbe zu entfernen, wurden die Proben am nächsten Tag reichlich mit Leitungswasser gespült. Zur Auswertung der Banden wurden die Gele eingescannt und mit dem Programm Image J ausgewertet.

2.2.6 Nephrektomie

Die COL4A3-Mäuse wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten durch kranio-kaudale Dislokation getötet. Anschließend erfolgte die Nephrektomie. Beide Nieren wurden longitudinal in zwei Hälften geteilt. Eine Niere wurde für die histologischen Untersuchungen entsprechend weiterverarbeitet. Die zweite Niere wurde zur Proteingewinnung für den Western Blot zunächst bei -80 °C eingefroren.

2.2.7 Herstellung der Lysate

Für die Herstellung der Lysate wurden die eingefrorenen Nieren zunächst aufgetaut. Pro Versuchstier wurden 1/4 Niere mit 500 µl Lysepuffer in einem 5 ml Röhrchen mit Hilfe eines Massenhomoenisators für 30 Sekunden homogenisiert und auf Eis gestellt. Schließlich wurde das Lysat in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und zehn Minuten bei 16500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entnommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren.

2.2.8 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung des Proteingehalts wurde die Bradford-Methode verwendet. Dazu wurden die Lysate zunächst 1:10 mit Wasser verdünnt. Anschließend wurde mit BSA eine Standardreihe mit 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; und 2 mg/ml hergestellt. Je 10 µl der Proteinlösung und Standardlösung wurden mit 200 µl Quick Start Reagenz in einer 96-well Platte gemischt. Die optische Dichte wurde im Photometer (Shimadzu, UV-120-01) bei 595 nm gegen einen Leerwert gemessen (10 µl H₂O + 200 µl Quick Start Reagenz). Die Proteinkonzentration wurde anschließend aus der Eichkurve abgelesen, die aus den Messwerten der Standardreihe erstellt wurde.

2.2.9 Western Blot

Je 10 µl Lysat (Proteinkonzentration von 40 µg/10 µl) wurden in dem Master-Mix (1 µl Reduktionspuffer + 2,5 µl Probenpuffer) aufgenommen und für fünf Minuten bei 95 °C inkubiert. Die Auftrennung erfolgte schließlich nach dem Eiskühlen der Proben. Die Polyacrylamid-Gele wurden in die Elektrophoresekammer eingelegt. Die Handhabung der Kammer erfolgte wie bei der Urinelektrophorese. Die Taschen wurden mit je 13,5 µl Lysatgemisch gefüllt. In die erste Tasche wurden 10 µl des Molekulargewichtsmarkers pipettiert. Anschließend wurde die Elektrophoresekammer an das Stromgerät angeschlossen. Die Auftrennung erfolgte zunächst 30 Minuten bei 80 V, danach 60-75 Minuten bei 100 V. Für das Blotten der aufgetrennten Proteine wurde zunächst das Blotting-Sandwich aufgebaut. Dazu wurden die Schwämme und das Filterpapier sorgfältig in Transferpuffer getränkt, die PVDF-Membran für zehn Sekunden in Methanol aktiviert und in Transferpuffer äquilibriert. Anschließend wurde das Sandwich folgendermaßen aufgebaut: Halterung, Schwamm, Filterpapier, Gel, PVDF-Membran, Filterpapier, Schwamm und Halterung. Das Sandwich wurde in den Tank-Blot eingebaut, mit Transferpuffer aufgefüllt und unter Kühlung für 60 Minuten bei 100 V auf die PVDF Membran transferiert. Nach dem Transfer wurde die PVDF-Membran kurz mit TBST-Puffer gewaschen. Das Blocken der unspezifischen Bindungsstellen erfolgte für eine Stunde in 5 % Magermilch/TBS-Puffer. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper gegen das zu detektierende Protein. Der Antikörper wurde 1:1000 in 5 % Magermilchlösung verdünnt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 4 x 15 Minuten in TBST-Puffer gewaschen und der Sekundärantikörper für eine Stunde auf die Membran gegeben. Danach wurde die Membran wieder 4 x für 15 Minuten mit TBST gewaschen. Zur Detektion der gebundenen Antikörper wurde die Membran für eine

Minute in einem Chemolumineszenz-Reagenz inkubiert. Die PVDF-Membran wurde in einer Röntgenkassette zwischen zwei Folien fixiert, in einer Dunkelkammer für 20-120 Sekunden gegenüber der Membran exponiert und anschließend entwickelt. Die Auswertung erfolgte densitometrisch. Die korrekten Banden konnten anhand des Molekulargewichtsmarkers und des Molekulargewichts identifiziert werden. Nach der Detektion wurde die Membran mit dH₂O gewaschen. Um die gebundenen Antikörper wieder zu entfernen, wurde die Membran für 15 Minuten in einem Stripping-Puffer inkubiert. Nach diesem Schritt konnten gemäß der oben beschriebenen Methode weitere Proteine detektiert werden. Folgende Antikörper wurden für den Western Blot in der aufgeführten Reihenfolge eingesetzt:

Primärantikörper: TGF- β , cTGF, Aktin

Sekundärantikörper: TGF- β , cTGF, Aktin

2.2.10 Fixierung und Einbettung der Nieren

Die Nieren wurden zunächst, gleich nach der Entnahme, in einer 4 %-Formalin-Lösung für 24-48 h fixiert. Danach erfolgte in der Pathologie die weitere Verarbeitung. Hierzu wurden sie als erstes in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Anschließend wurde der Alkohol durch Xylol aus dem Gewebe entfernt und das Xylol wiederum durch heißes Paraffinwachs ersetzt. Der ganze Vorgang erfolgte in einem Einbettgerät über Nacht.

Am nächsten Tag wurden die Gewebestücke in Gießschälchen gelegt und mit heißem Paraffin überschichtet um einen Paraffinblock herzustellen. Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden schließlich 5 μ m dünne Schnitte für die Immunhistochemie hergestellt.

2.2.11 Immunhistochemie

Die 5 μ m dünnen Paraffinschnitte wurden zunächst 30 Minuten bei 80 °C erwärmt. Danach wurden die Paraffinschnitte 2 x für 15 Minuten in Xylol gebadet. Anschließend erfolgte die Wässerung mit Hilfe einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 90 %, 80 % und 70 % Ethanol) für jeweils fünf Minuten. Zum Schluss wurden die Schnitte für drei Minuten mit Wasser überschichtet.

Die Paraffinschnitte für die Laminin-Färbung wurden anschließend zehn Minuten bei 37 °C mit 10 μ l Proteinkinase K + 990 μ l 50 mM Tris-Puffer (pH 7,5) andaut. Für die Fibronectinfärbung wurden die Schnitte 6 x 5 min in Citratpuffer gekocht. Bei dem Kochvorgang musste zwischendurch mit Wasser aufgefüllt werden. Nach dem Andauen der Paraffinschnitte wurden diese 3 x 10 Minuten in TBS gewaschen und bei Raumtemperatur für

60 Minuten in 5 % BSA/TBS-Lösung geblockt. Danach erfolgte die Inkubation mit 100 µl des Primär-Antikörpers über Nacht bei 4 °C (Anti-Laminin 1:25, Anti-Fibronectin 1:100).

Am nächsten Tag wurden die Schnitte wieder 3 x 10 Minuten in TBS gewaschen und erneut geblockt. Die Blockung erfolgte diesmal mit 5 % Normalserum (Goat) in 0,8 % BSA/ TBS für 30 Minuten.

2.2.12 Fibrose – Score

Zur Bestimmung des Fibrose-Scores wurden von den mit Laminin und Fibronectin gefärbten Parafinschnitten jeweils 6 Bilder angefertigt die das gesamte Präparat abdeckten. Um den Grad der Fibrose zu bestimmen, wurden die Bilder von drei Personen ausgewertet. Die Bilder wurden vorher verblindet. Der Score für die glomerulären Veränderungen wurde bei einer Auflösung von 40 x 10 bestimmt, die der tubulointestinalen bei 10 x 10. Es wurde, je nach Grad der Fibrose, ein Score zwischen 0 - 3 definiert (0= keine vermehrte Ablagerung von Fibronectin oder Laminin, 1= leicht erhöhte Ablagerungen, 2= stark erhöhte Ablagerung, 3= sehr stark erhöhte Ablagerung von Fibronectin und Laminin).

2.2.13 Harnstoffbestimmung

Die Harnstoffbestimmung erfolgte photometrisch in Routinelabor mit Hilfe des Cobas®8000 der Firma Roche®. Der Test beruht auf dem Prinzip der kinetischen UV-Messung unter Verwendung des gekoppelten Enzymsystems Urease/ Glutamat-Dehydrogenase (GLDH). Das Enzym Urease spaltet den Harnstoff zu Ammonium- und Carbonat- Ionen. Die Glutamat-Dehydrogenase wiederum setzt die freigewordenen Ammonium Ionen mit 2-Oxoglutarat unter Oxidation von NADH zu Glutamat um. Die Geschwindigkeit der Abnahme von NADH ist proportional zur Harnstoffkonzentration (Talke und Schubert 1965).

2.2.14 Statistik

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism. Die Diagramme und Tabellen wurden mit den Programmen Open Office und Graph Pad Prism erstellt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung SEM. Für die Analyse unserer Hypothese, ob die Kombinationstherapie einer Monotherapie überlegen ist, wurde der ungepaarte t-Test (One-tailed Student t-Test) für die Auswertung der Nierenfunktionsparame-

ter (Proteinurie und BUN) verwendet. Alle anderen in dieser Arbeit erwähnten statistischen Analysen wurden *mit der two-way analysis of variance* (ANOVA) und Log-Rank (Überlebenszeiten) untersucht.

Die statistischen Ergebnisse wurden in dieser Dissertation folgendermaßen ausgewertet: schwach signifikant $0,01 < p \leq 0,05$; signifikant $0,001 < p \leq 0,01$ und hoch signifikant $p \leq 0,001$.

Die statistische Beratung erfolgte in der Abteilung für Medizinische Statistik der Universität Göttingen.

3 Ergebnisse

3.1 Mausgruppen

Zum Vergleich der verschiedenen Behandlungsmodalitäten wurden die COL4A3-Versuchstiere in verschiedene Gruppen unterteilt.

Gruppe I:	Homozygote COL4A3-Mäuse als Placebokontrolle ohne Medikamentöse Intervention (N= 24)
Gruppe II:	Homozygote COL4A3-Mäuse, medikamentöse Intervention ab der 4. Woche mit dem ACE - Hemmer Ramipril im Trinkwasser (N= 34)
Gruppe III:	Homozygote COL4A3-Mäuse, medikamentöse Intervention ab der 6. Woche nach Ausbruch der Nierenerkrankung mit Calcitriol i.p. (N= 12)
Gruppe IV:	Homozygote COL4A3-Mäuse, medikamentöse Intervention ab der 4. Woche mit dem ACE-Hemmer Ramipril im Trinkwasser und ab der 6. Woche mit Calcitriol wie in Gruppe II (N= 12)

Zur Bestimmung der Überlebenszeiten und Proteinurie wurden aus jeder Gruppe jeweils acht Tiere der Überlebensgruppe zugewiesen. Für die zur Bestimmung der TGF- β -Expression sowie für die immunhistochemische Darstellung von Laminin und Fibronectin und die Messung des Harnstoffs wurden jeweils 4 Tiere aus jeder Gruppe in die Tötungsgruppe verteilt.

Die medikamentöse Intervention mit Calcitriol in den Gruppen III und IV erfolgte ab Beginn der 6. Lebenswoche bis zur vollendeten 12. Lebenswoche bzw. bis zum Tod durch terminales Nierenversagen. Den Tieren der Tötungsgruppe wurde bis zum Alter von 9 Wochen Calcitriol in einer Konzentration von 0,03 mg/kg/KG gespritzt. Das Ramipril (ACE-Converting Enzyme Inhibitor) bekamen die Tiere aus den entsprechenden Gruppen ab der 4,5 Lebenswoche im Trinkwasser verabreicht. Die Uringewinnung erfolgte zu vier verschiedenen Zeitpunkten:

Zeitpunkt 1:	4,5 Lebenswoche
Zeitpunkt 2:	6. Lebenswoche, Beginn der Proteinurie
Zeitpunkt 3:	7,5 Lebenswoche, Vollbild des nephrotischen Syndroms
Zeitpunkte 4:	9,5 Lebenswoche, terminale Niereninsuffizienz

Die Tiere der Tötungsgruppe wurden in der 9,5 Lebenswoche durch Genickbruch getötet. Ein Teil der Nieren wurden für die Immunhistochemie in Formalin fixiert. Der andere Teil wurde bei -80 °C für den Western Blot zur Messung der TGF- β -Expression eingefroren sowie Blut und Urin für die Harnstoffbestimmung bei -20 °C gelagert.

Tabelle 7: Gruppeneinteilung

In folgender Tabelle sind die Anzahl der Versuchstiere der Tötungsgruppe und der Überlebensgruppe abgebildet.

	Placebo	Ramipril	Calcitriol	Calcitriol+Ramipril
Tötungsgruppe	N= 4	N= 4	N= 4	N= 4
Überlebensgruppe	N= 8	N= 8	N= 8	N= 8

3.2 Überlebenszeiten

In den folgenden Abbildungen ist die Überlebenszeit der Versuchstiere von Geburt bis zum Tod durch terminales Nierenversagen in Form einer Kaplan-Meyer-Kurve graphisch dargestellt. Den Versuchstieren aus den Gruppen III bzw. IV wurde mit Beginn der sechsten Lebenswoche bis einschließlich zur 12. Lebenswoche bzw. bis zum Tod durch terminales Nierenversagen das Medikament Calcitriol i.p verabreicht.

3.2.1 Überleben nach Monotherapie

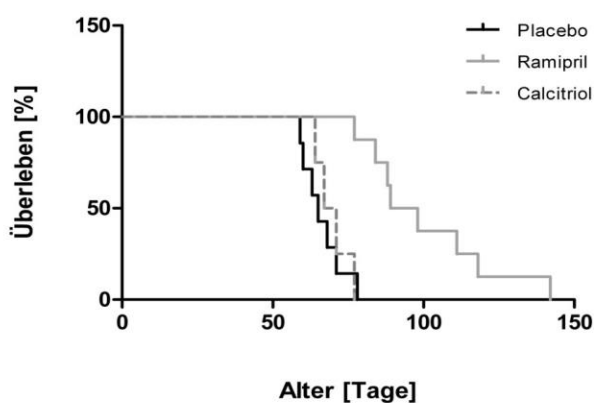


Abbildung 3: Kaplan-Meyer-Kurve.

Überlebenszeiten der Placebogruppe sowie in den Gruppen mit Ramipril- und Calcitriol-Monotherapie ($p < 0,001$ Ramipril vs. Placebo)

In der Kaplan-Meyer-Kurve (siehe Abbildung 3) ist das durchschnittliche Überleben der unbehandelten Alport-Mäuse im Vergleich zur Ramipril- und Calcitriol-Monotherapie

graphisch dargestellt. Die Versuchstiere aus der Placebogruppe zeigten im Durchschnitt ein Überleben von $66,3 \pm 6,7$ Tagen. Die Monotherapie mit Calcitriol führte im Vergleich zur Placebogruppe zu einer mittleren Überlebenszeit von $66,6 \pm 5,3$ Tagen.

3.2.2 Kombinationstherapie mit Calcitriol und Ramipril

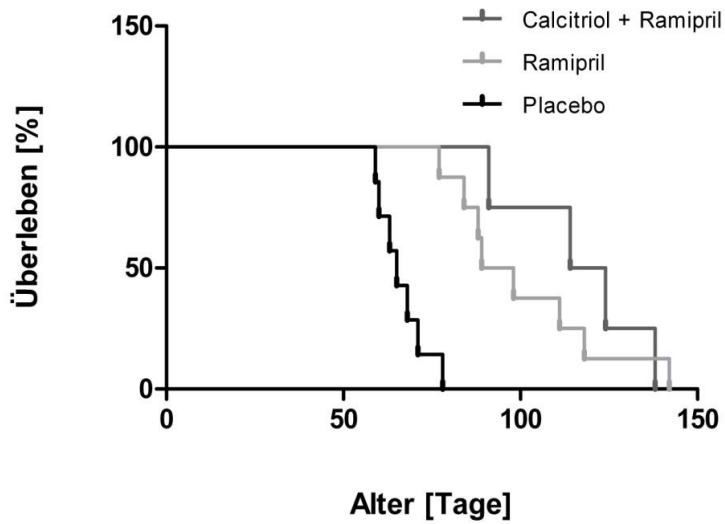


Abbildung 4: Kaplan-Meier-Kurve.

Überlebenszeiten der Gruppen: Placebo (Plac), Ramipril (R) Monotherapie und Calcitriol (C) plus Ramipril (R), $p < 0,0001$ C+R vs. Plac.

In Abbildung 4 sind die Überlebenszeiten der Behandlungsgruppen I, II und IV abgebildet. Aus der Kaplan-Meier-Kurve ist zu entnehmen, dass Ramipril behandelte COL4A3-knock-out-Tiere im Unterschied zu den unbehandelten Alport-Mäusen mit $102 \pm 19,10$ Tagen ($p < 0,001$ vs. Placebo) ein um 53 % verlängertes Überleben zeigten. Die Gruppe unter der Kombinationstherapie mit Calcitriol plus Ramipril wies ein mittleres Überleben von $113 \pm 14,34$ Tagen ($p < 0,0001$ vs. Placebo) auf. Dies entspricht im Vergleich zur Placebo-Gruppe einem Unterschied von 70 %. Bei der Gegenüberstellung der Kombinationstherapie mit der Ramipril Monobehandlung ist eine Differenz von 10 % messbar, dieser Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant.

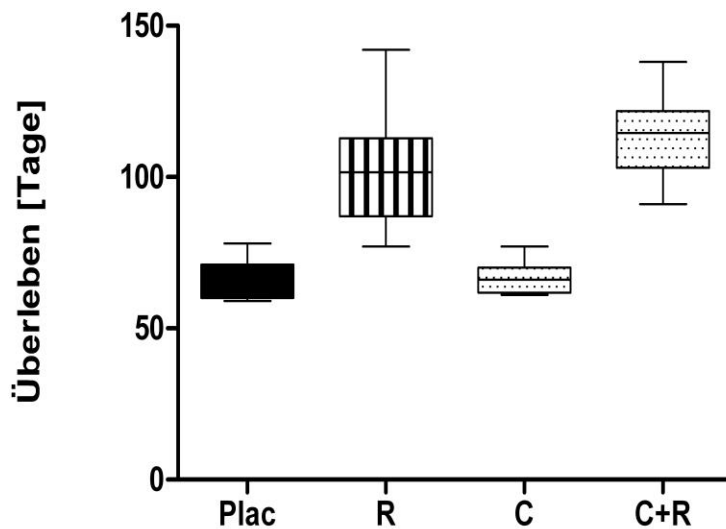


Abbildung 5: Überlebenszeiten Boxplot.

Als weitere Darstellung für die Verbesserung des Überlebens wurden in diesem Boxplot die Überlebenszeiten aller Behandlungsgruppen abgebildet (Plac= Placebo; R= Ramipril; C= Calcitriol; C+R= Calcitriol + Ramipril).

3.3 *Urin - Elektrophorese*

Die Proteinurie in den unterschiedlichen Behandlungsmodalitäten wurde im Verlauf gemessen. Hierzu wurde in den entsprechenden Lebenswochen (4,5/ 6 / 7,5 / 9,5 Lebenswochen) Urin gesammelt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels einer Elektrophorese auf einem Polyacrylamidgel. Zur densitometrischen Quantifizierung der aufgetrennten Banden wurden diese mit Coomassie-Blau angefärbt. Die Proteine wurden in drei Gruppen unterteilt: hochmolekulare Proteine >90 kDa, Albumin 70 kDa und niedermolekulare Proteinurie <50 kDa.

3.3.1 **Proteinurie in Relation zum Wildtyp**

In den folgenden Balkendiagrammen ist die Ausscheidung für hoch- und niedermolekulare Proteine sowie für Albumin in den verschiedenen Stadien der Niereninsuffizienz graphisch dargestellt. Der Proteingehalt der Behandlungsgruppen wurde in Relation zum Wildtyp gesetzt und die Proteinausscheidung der Behandlungsmodalitäten im Vergleich zur unbehandelten Alport-Gruppe prozentual berechnet.

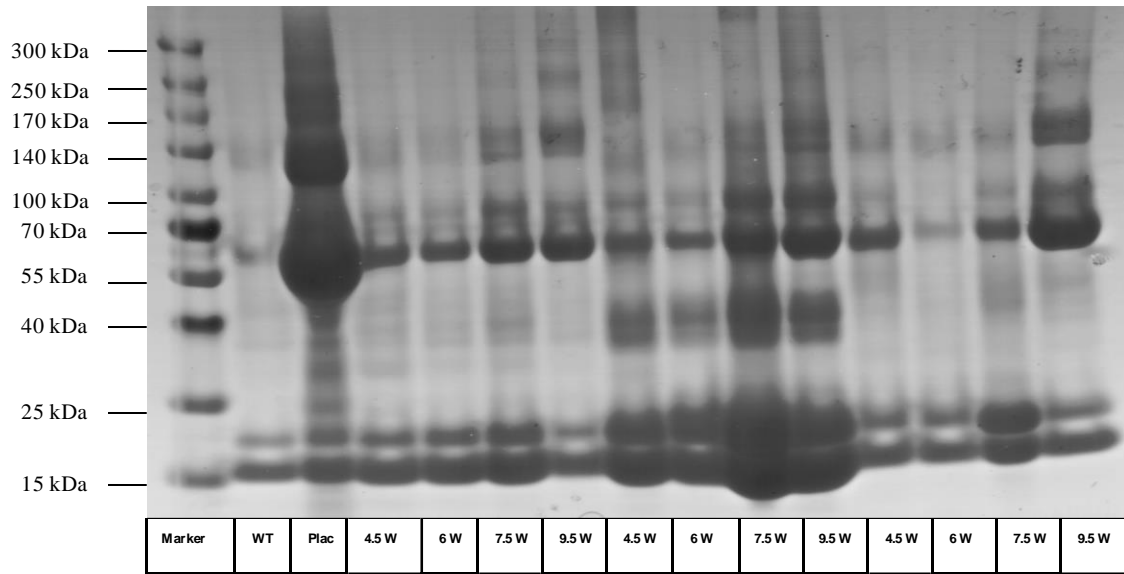


Abbildung 6: Urin-Gelelektrophorese zur Demonstration der Proteinurie der Behandlungsgruppe Calcitriol plus Ramipril in unterschiedlichen Lebenswochen. Wildtyp (WT) als Negativkontrolle und Placebo (Plac) als Positivkontrolle.

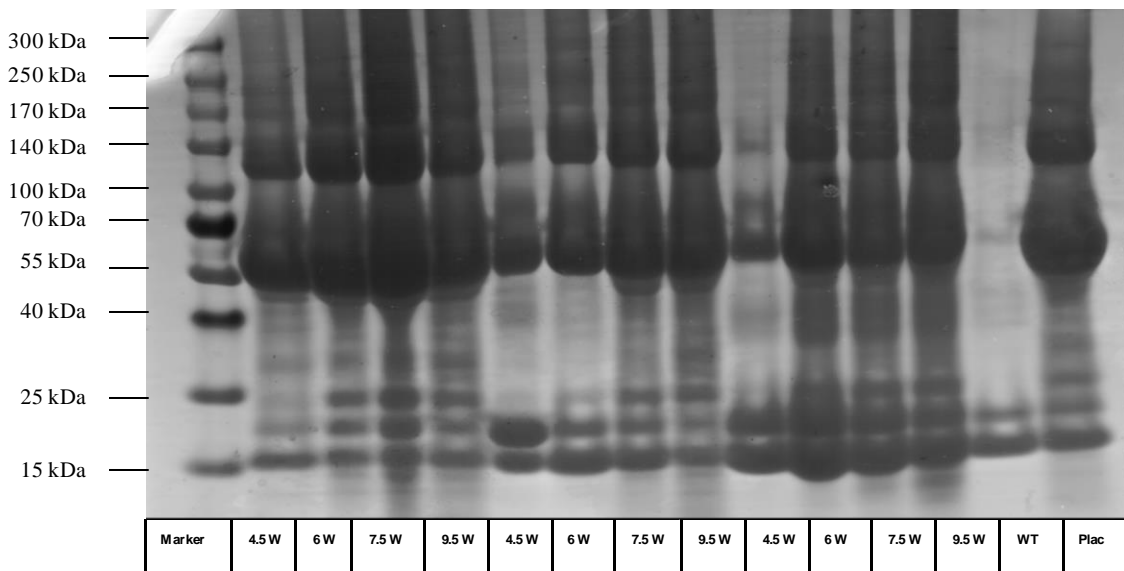


Abbildung 7: Urin-Gelelektrophorese zur Demonstration der Proteinurie bei Calcitriol-Monotherapie in unterschiedlichen Lebenswochen (4,5/ 6/ 7,5/ 9,5). Wildtyp (WT) als Negativkontrolle und Placebo (Plac) als Positivkontrolle.

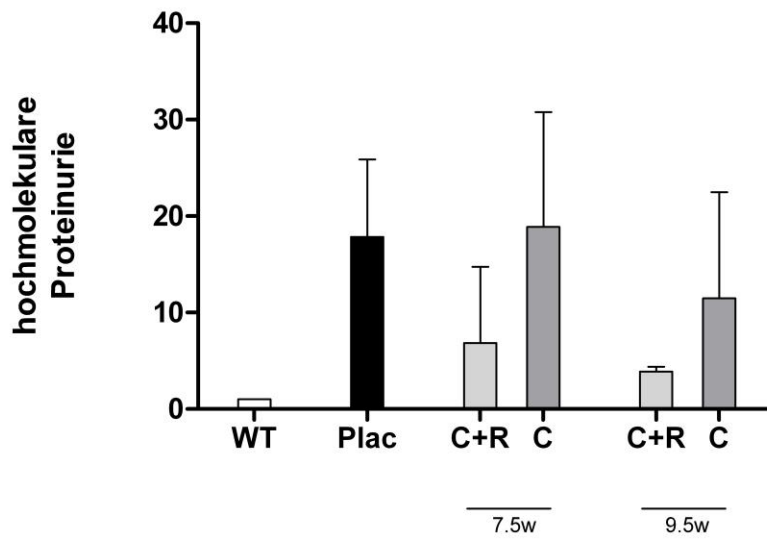


Abbildung 8: Hochmolekulare Proteinurie > 90 kDa

Dargestellt ist die hochmolekulare Proteinausscheidung in Relation zum Wildtyp. Die Placebo (Plac) Tiere stehen im Vergleich zu den Calcitriol (C) bzw. Calcitriol + Ramipril (C+R) behandelten Tieren die sich in verschiedenen Stadien der Niereninsuffizienz befinden (7,5 Wochen und 9,5 Wochen).

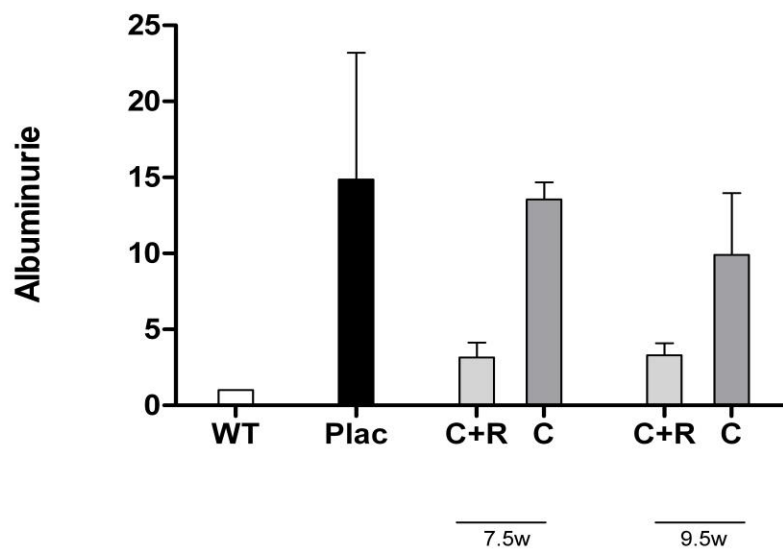


Abbildung 9: Albuminurie (70 kDa).

Die Albuminausscheidung in den verschiedenen Stadien der Niereninsuffizienz (7,5 Lebenswoche Beginn des nephrotischen Syndroms; 9,5 Lebenswoche terminales Stadium des terminalen Nierenversagens). WT=Wildtyp, Plac= Placebo, C= Calcitriol, C+R= Calcitriol + Ramipril.

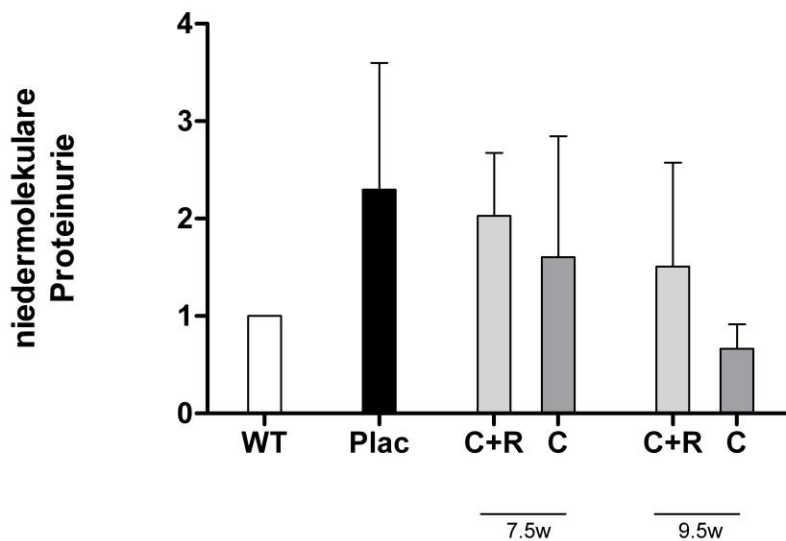


Abbildung 10: Niedermolekulare Proteinurie (< 50 kDa).
Darstellung der niedermolekularen Proteinurie in den unterschiedlichen Behandlungsmodalitäten sowie in verschiedenen Stadien der Niereninsuffizienz im Vergleich zur unbehandelten Alport-Maus. Plac= Placebo, C= Calcitriol, C+R= Calcitriol + Ramipril, WT= Wildtyp.

Bei der Untersuchung in der 7,5 Lebenswoche zeigten sich folgende Ergebnisse: Im Vergleich zur gesunden Wildtyp-Maus wurde in den Urinproben der unbehandelten Alport-Mäuse eine 18-fach höhere Ausscheidung an hochmolekularen Proteinen (vorwiegend Immunglobuline), eine 14-fach höhere Albuminausscheidung sowie eine 2-fach erhöhte niedermolekulare Proteinurie gemessen.

In den Urinproben der Versuchstiere aus der Gruppe III (Calcitriol Monotherapie) wurde im Vergleich zu den unbehandelten Tieren ein 20 % niedrigerer Gehalt an hochmolekularen Proteinen und ein 35 % niedrigerer Albumingehalt ermittelt. Hinsichtlich der niedermolekularen Proteine ergab sich kein Unterschied. Die Urinproben der Alport-Mäuse aus der Gruppe IV präsentierten einen 44 % niedrigeren Albumingehalt. Der Gehalt an hochmolekularen Proteinen im Urin fiel um 68 %. Hinsichtlich der niedermolekularen Proteinurie war kein Unterschied messbar. Die Untersuchungen in der 9,5 Lebenswoche ergaben folgendes: In der Gruppe III wurde im Vergleich zu der Gruppe I ein um 50 % niedrigerer Wert für alle drei Proteinfractionen gemessen. Die Mäuse aus der Gruppe IV präsentierten einen Abfall der hochmolekularen Proteinurie um 68 % und einen 63 % niedrigeren Albumingehalt im Urin.

Tabelle 8: Prozentuale Verteilung der Proteinurie im Vergleich zur unbehandelten Alport-Maus.
In folgender Tabelle ist der prozentuale Abfall der Proteinurie in den Behandlungsgruppen Calcitriol bzw. Calcitriol + Ramipril im Vergleich zu den unbehandelten Alport-Mäuse zu finden.

	> 90 kDa	70 kDa	< 50 kDa
Calcitriol/ 7,5 Lebenswochen	- 20 %	- 35 %	- 0 %
Calcitriol + Ramipril/ 7,5	- 44 %	- 65 %	- 0%
Calcitriol/ 9,5 Lebenswochen	- 51 %	- 52 %	- 52 %
Calcitriol + Ramipril/ 7,5	- 68 %	- 63 %	- 0 %

3.3.2 Proteinurie im zeitlichen Verlauf

In den folgenden Verlaufsdiagrammen ist die Proteinausscheidung der drei Fraktionen (hoch- und niedermolekulare Proteine und Albumin) im zeitlichen Verlauf graphisch dargestellt.

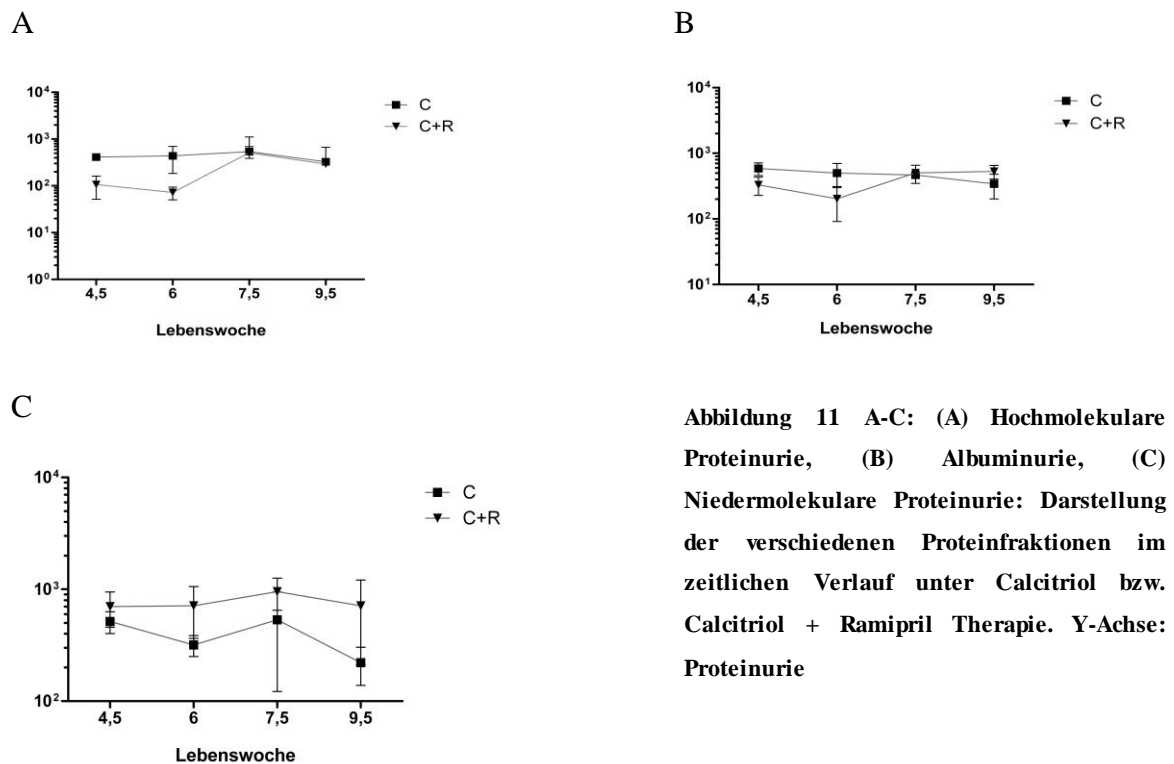


Abbildung 11 A-C: (A) Hochmolekulare Proteinurie, (B) Albuminurie, (C) Niedermolekulare Proteinurie: Darstellung der verschiedenen Proteinfractionen im zeitlichen Verlauf unter Calcitriol bzw. Calcitriol + Ramipril Therapie. Y-Achse: Proteinurie

3.4 TGF- β und cTGF-Expression im Western Blot

Die Nierenfibrose bildet sich durch eine pathologisch erhöhte Ablagerung von Proteinen der extrazellulären Matrix im Interstitium. Die Synthese der Matrixproteine wird durch Zytokine gesteuert. TGF- β und cTGF sind solche Zytokine, die an der Regulation beteiligt sind. Die bei -80 °C eingefrorenen Nieren der COL 4A3 Versuchstiere wurden zur Quantifizierung der TGF- β Expression mittels Western-Blot in Lysepuffer homogenisiert.

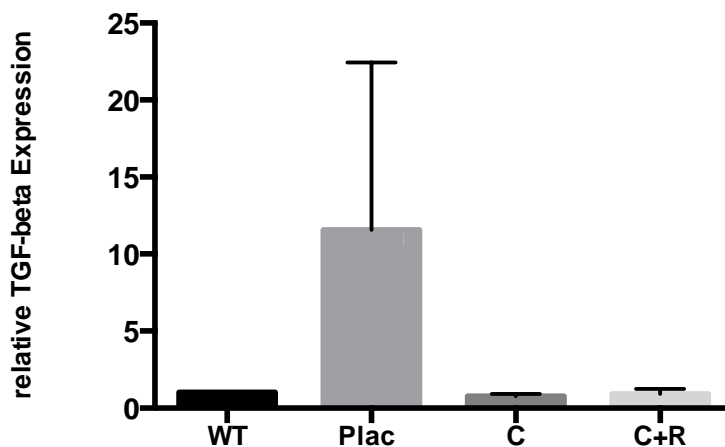


Abbildung 12: TGF- β -Expression

Dargestellt ist die TGF- β -Expression vom Wildtyp (WT), Placebo-Gruppe (Plac), Calcitriol (C) behandelter Tiere und unter Kombinationsbehandlung Calcitriol + Ramipril (C+R)

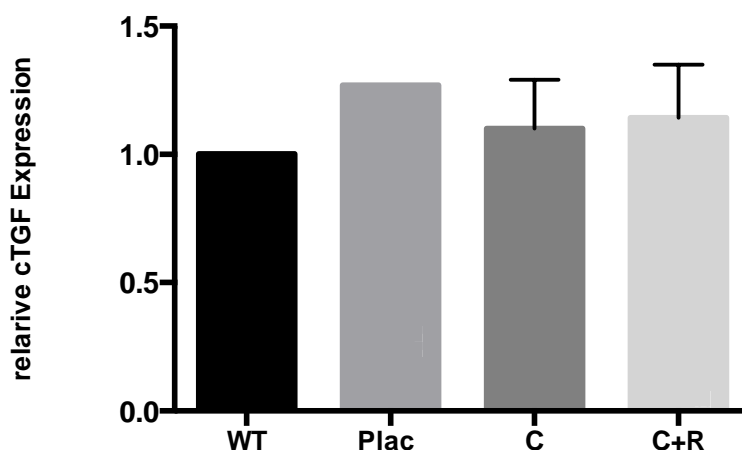


Abbildung 13: cTGF-Expression

Dargestellt ist die cTGF- β -Expression vom Wildtyp (WT), Placebo- Gruppe (Plac), Calcitriol (C) behandelter Tiere und unter Kombinationsbehandlung Calcitriol + Ramipril (C+R)

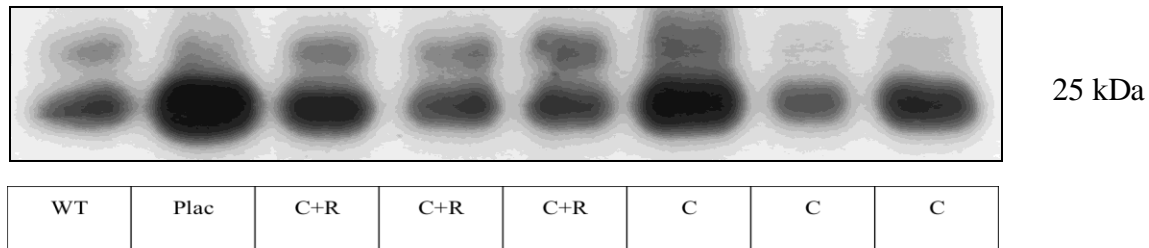


Abbildung 14: TGF- β Expression, Western-Blot

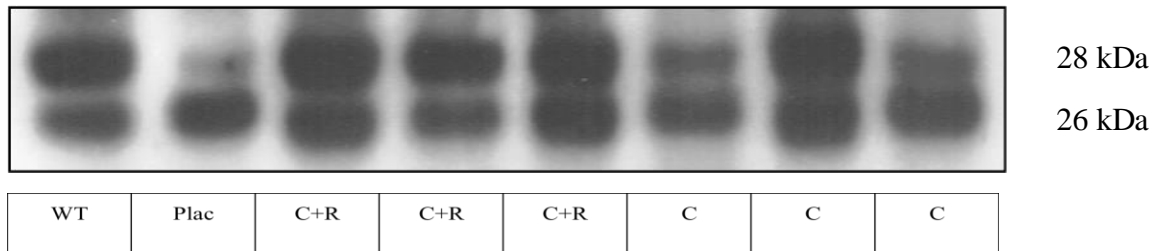


Abbildung 15: cTGF-Expression, Western Blot

Unbehandelte Alport-Mäuse zeigten im Vergleich zu den Wildtypen >10 Fach erhöhte TGF β -Expression. Durch die Behandlung der Alport-Mäuse mit Calcitriol und Calcitriol + Ramipril wurde eine niedrigere TGF- β -Expression gemessen (Wildtypellevel).

3.5 Immunhistochemische Darstellung chronisch glomerulärer und interstitieller Nierenfibrose

Der Nachweis für die vermehrte tubulointerstitielle und periglomeruläre Ablagerung von Matrixproteinen konnte anhand der immunhistochemischen Methode an den Nierenschnitten nachgewiesen werden. Hierzu wurden zuerst 5 μ m dünne Paraffinschnitte der Nieren angefertigt und anschließend, wie im „Material und Methoden“-Teil beschrieben, für Laminin bzw. Fibronectin angefärbt. Die Auswertung für die tubulointerstitiellen Ablagerungen erfolgte anhand von Bildern, die in 200-facher Vergrößerung von den gefärbten Schnitten angefertigt wurden und die Beurteilung der periglomerulären Fibrose anhand von 400-fach vergrößerten Bildern.

3.5.1 Glomeruläre Ablagerungen von Laminin und Fibronectin

In den folgenden Abbildungen ist das Maß für die glomerulären Ablagerungen in Form eines Balkendiagramms graphisch dargestellt.

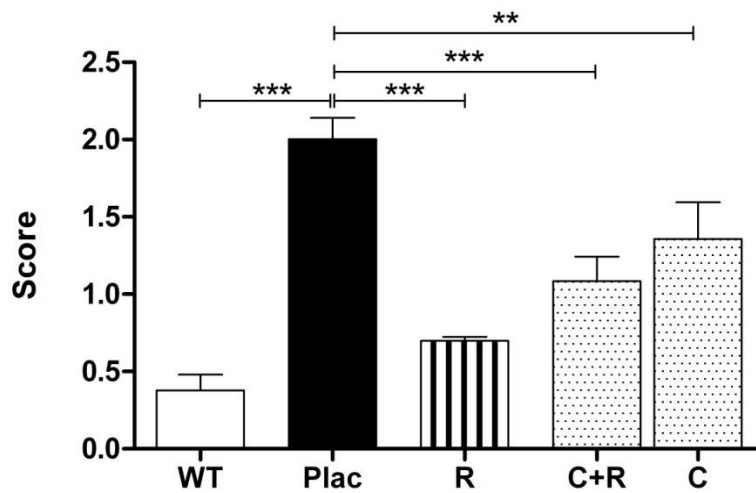


Abbildung 16: Laminin-Score, 400-fache Vergrößerung

** p < 0,01; *** p < 0,001

Der Score für die glomerulären Veränderungen der Wildtypen betrug 0,16. Unbehandelte Alport-Mäuse zeigten in der 400-fachen Vergrößerung mit einem Score von 2,1 eine sehr hohe Ablagerung von Laminin in den Glomeruli (p < 0,001 vs. Wildtyp). Die Monotherapie mit Calcitriol reduzierte die glomerulären Matrixablagerungen auf 1,36 (p < 0,01 unbehandelte Alport-Mäuse). Die Kombinationstherapie (Calcitriol und Ramipril) verringerte die Ablagerungen von Laminin um 50 % auf einen Score von 1,09 (p < 0,001 vs. unbehandelte Alport-Mäuse).

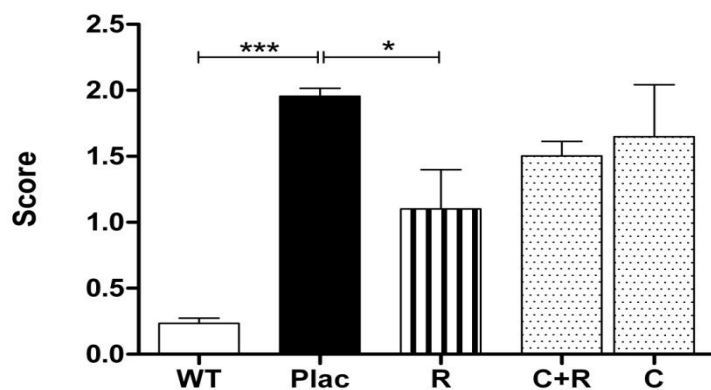


Abbildung 17: Fibronectin-Score, 400-fache Vergrößerung

* p < 0,05; *** p < 0,001

Die Fibronectin-Ablagerungen in den Paraffinschnitten der Wildtyp-Gruppe waren sehr gering (Glomerulosklerose-Score 0,31). Unbehandelte Alport-Mäuse zeigten mit einem Score von 1,94 (p < 0,001 vs. Wildtyp) einen hohen Anteil an Fibronectin-Ablagerungen in den Glomeruli. Die Monotherapie mit Calcitriol reduzierte die Ablagerungen auf einen Score von

1,7 (n.s. versus unbehandelte Alport-Mäuse). Die Kombinationstherapie mit Calcitriol + Ramipril ergab für die Glomerulosklerose einen Score von 1,5 (n.s versus unbehandelte Alport-Mäuse).

3.5.2 Tubulointerstitielle Veränderungen

Die tubulointerstitiellen Laminablagerungen bei den Wildtyp-Mäusen (Score 0,35) waren gering. Im Gegensatz dazu zeigten die unbehandelten Alport-Mäuse einen Score von 2,03 ($p < 0,001$ vs. Wildtyp). Der Fibrose-Score für die Behandlungsgruppe mit Calcitriol betrug 1,92. Die Kombinationstherapie mit Calcitriol und Ramipril ergab einen Score von 1,31 ($p < 0,05$ vs. unbehandelte Alport-Mäuse). eine um 35 % niedrigere Laminin Ablagerung.

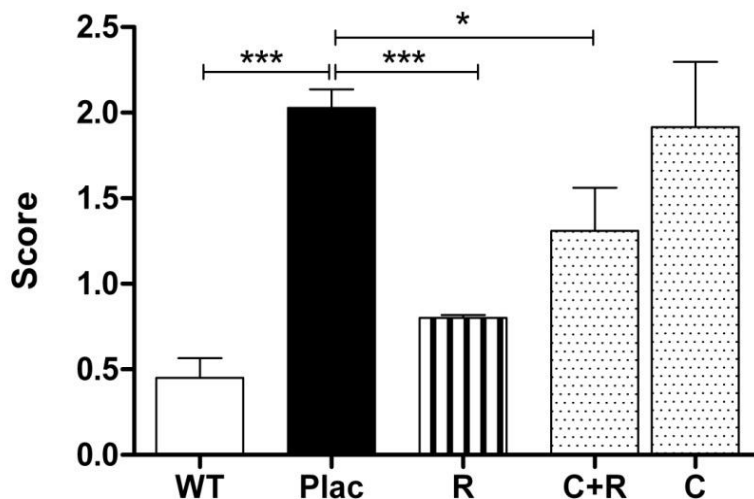


Abbildung 18: Laminin-Score, 100-fache Vergrößerung.

Eine Vermehrung von extrazellulärer Matrix im tubulointerstitiellen Raum bestand für die unbehandelten Alport-Mäuse (Plac) und für die Calcitriol (C) behandelten Tiere. Die Fibrosemarker in den Behandlungsgruppen Ramipril (R) und Calcitriol + Ramipril (C+R) waren im Gegensatz zu den unbehandelten Alport-Mäusen geringer, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Im unten abgebildeten Balkendiagramm ist der Score für die Fibronectinablagerungen in den Nierenschnitten graphisch dargestellt. Aus dem Diagramm ist zu entnehmen, dass die Gruppe der Wildtyp-Mäuse einen geringen Anteil von Fibronectin-Ablagerungen im interstitiellen Raum zeigten (Score 0,12). Für die unbehandelten Alport-Mäuse wurde ein Score von 2,19 ($p < 0,001$ vs. Wildtyp) ermittelt. Die Behandlung mit Calcitriol erzielte im Vergleich zu den unbehandelten Alport-Mäusen, einen Score von 2,08. Die Kombinationstherapie mit Calcitriol + Ramipril ergab einen Score von 1,22 ($p < 0,001$ vs. unbehandelte Alport-Mäuse).

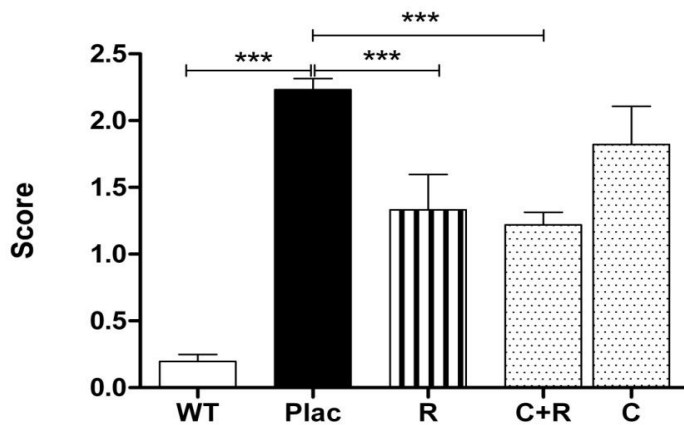


Abbildung 19: Fibronectin-Score in 100-facher Vergrößerung.

Im Gegensatz zur Placebo-Gruppe (Plac) zeigten die Individuen der Behandlungsgruppen Ramipril (R), Calcitriol + Ramipril (C+R) eine verminderte Ablagerung an extrazellulären Matrixproteinen *** $p < 0,001$. Der Score für die Calcitriol (C)-Monotherapie war im Unterschied zur Placebo-Gruppe nicht signifikant.

3.6 Harnstoff

Die Harnstoffbestimmung erfolgte aus dem Serum der Versuchstiere aus der Tötungsgruppe. Die BUN Messung in der Wildtypgruppe (9,5 Lebenswoche) ergab einen Wert von $27 \pm 2,9$ mg/dl (Abbildung 14). Placebo Mäuse dagegen präsentierten einen BUN von $53 \pm 9,6$ mg/dl. Alport-Mäuse die mit Calcitriol behandelt wurden, zeigten gegenüber den unbehandelten Alport-Mäusen keinen Unterschied bezüglich der Harnstoffwerte. In der Therapiegruppe Calcitriol + Ramipril waren ähnliche Werte wie bei der Therapiegruppe Ramipril messbar ($65 \pm 5,6$).

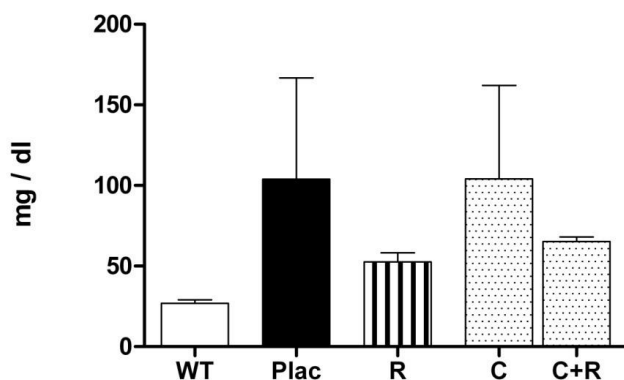
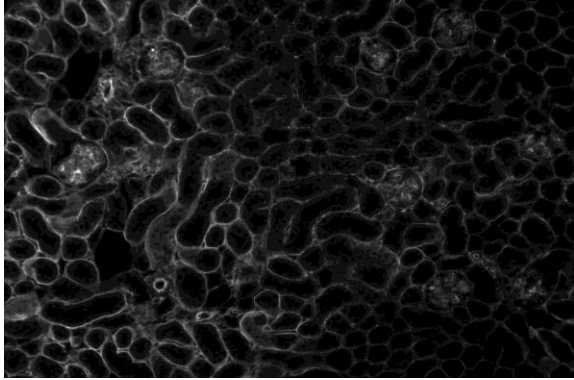
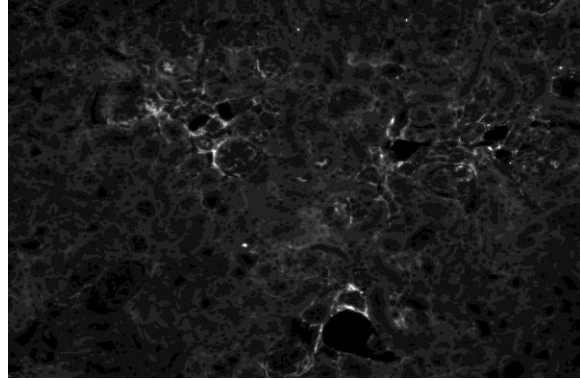


Abbildung 20: BUN (9,5 Lebenswochen)

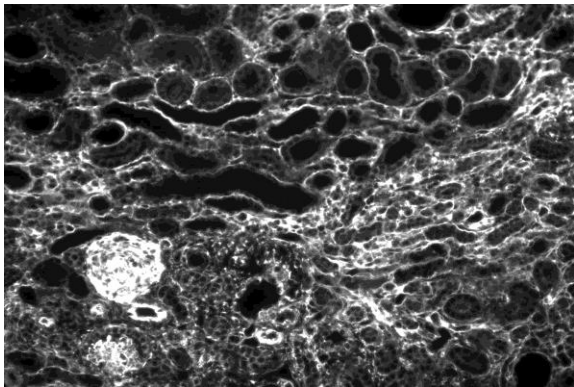
Wildtyp (WT), Placebo (Plac), Ramipril (R), Calcitriol (C), Calcitriol + Ramipril (C+R)



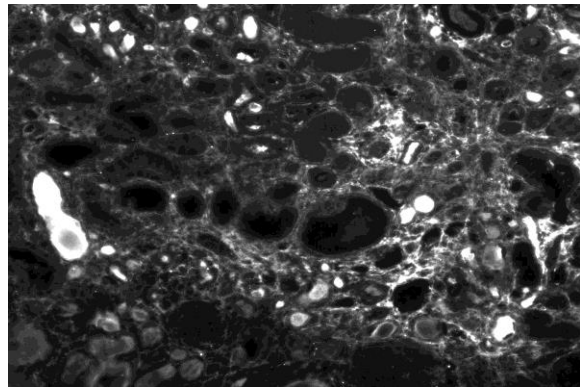
**Abbildung 21: Wildtyp, Laminin,
200-fache Vergrößerung**



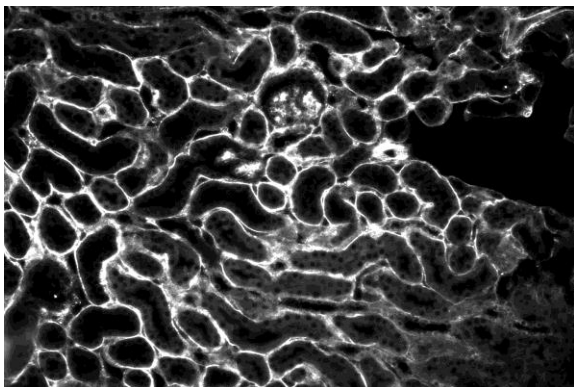
**Abbildung 22: Wildtyp, Fibronectin,
200-fache Vergrößerung**



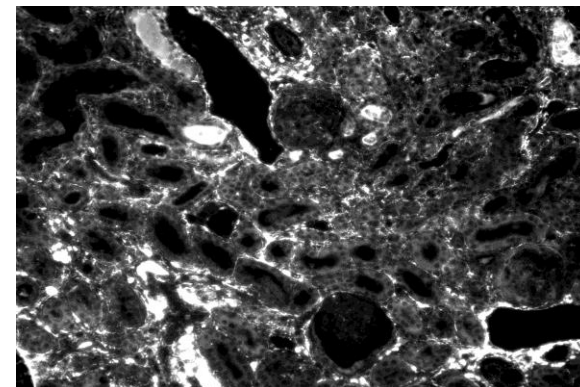
**Abbildung 23: Placebo, Laminin,
200-fache Vergrößerung**



**Abbildung 24: Placebo, Fibronectin,
200-fache Vergrößerung**



**Abbildung 25: Calcitriol, Laminin,
200-fache Vergrößerung**



**Abbildung 26: Calcitriol, Fibronectin,
200-fache Vergrößerung**

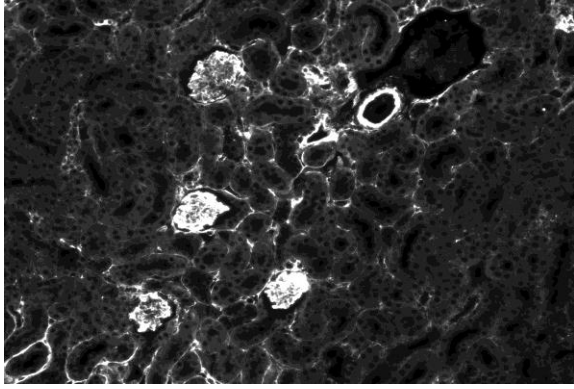


Abbildung 27: Calcitriol und Ramipril, Laminin, 200-fache Vergrößerung

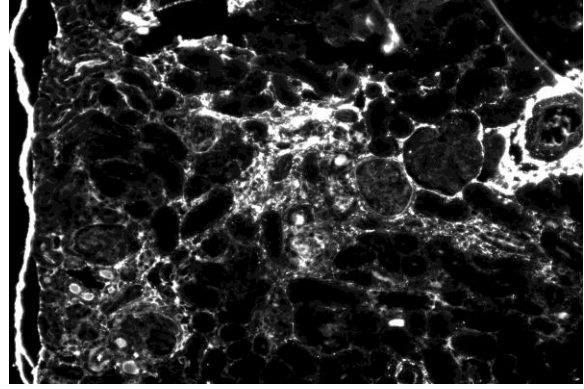


Abbildung 28: Calcitriol und Ramipril, Fibronectin, 200-fache Vergrößerung

4 Diskussion

4.1 Auswirkungen der Kombinationstherapie mit Ramipril und Calcitriol

Epidemiologische Studien trugen dazu bei, ein Bewusstsein für das Problem der nicht diagnostizierten chronischen Nierenerkrankung (CKD) zu wecken. Sie deuten darauf hin, dass eine frühe Behandlung der chronischen Nierenerkrankungen die Anzahl der dialysepflichtigen Patienten deutlich reduzieren könnte. Voraussetzung hierfür wäre die frühzeitige Erkennung der chronischen Niereninsuffizienz. Mit Hilfe von prospektiven Studien konnten Risikofaktoren für die CKD in der Allgemeinbevölkerung sowie Progressionsfaktoren bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz identifiziert werden.

Zu diesen Progressionsfaktoren gehören die intraglomeruläre Hypertonie, die glomeruläre Hypertrophie und die Proteinurie. Diese drei Faktoren sind für die Hyperfiltration und die Glomerulosklerose verantwortlich (Taal und Brenner 2006). Wird die Anzahl der funktionsfähigen Nephrone durch die Grunderkrankung reduziert, erhöhen die verbleibenden kompensatorisch ihre Filterleistung, was wiederum zur Erhöhung des intraglomerulären Drucks führt. Kurzfristig kann dadurch die Filterleistung erhalten werden, auf lange Sicht jedoch ist eine Sklerosierung nicht abwendbar. Die Progression ist neben der individuellen Variabilität von zusätzlichen Faktoren wie z.B. arterielle Hypertonie, Hyperglykämie, Hyperlipidämie, Anämie und der Einnahme nephrotoxischer Substanzen anhängig (Keller und Geberth 2010). Die aktuellen Therapieoptionen beschränken sich auf die Symptomkontrolle. Leider kann bislang selbst bei optimaler Einstellung (beispielsweise Blutzucker und Blutdruck) bestenfalls eine Reduktion bzw. die Verlangsamung der Progressionsrate erreicht werden.

Die nephroprotektive Wirkung vom ACE-Hemmern und AT1-Antagonisten wurde in zahlreichen klinischen Studien und tierexperimentellen Versuchen nachgewiesen. Die ersten Ergebnisse hierzu lieferte eine Placebo-kontrollierte Studie mit Captopril bei Typ1-Diabetikern. Im Vergleich zur Placebo-Gruppe wiesen die Captopril-behandelten Patienten ein um 50 % verringertes Mortalitätsrisiko auf (Lewis *et al.* 1993). In einer anderen Studie, diesmal mit dem AT1-Antagonisten Irbesartan, wurde (im Vergleich zum Calcium-Antagonisten Amlodipin) eine Risikoreduktion von 23 % bezüglich der Progredienz des Nierenversagens (Lewis *et al.* 2001) ermittelt. Ansonsten existieren nur wenige Studien, die beim Menschen die Wirkung von ACE-Inhibitoren und AT1-Antagonisten vergleichen. Zu diesen gehört die Studie der Arbeitsgruppe Remuzzi und Kollegen. Sie stellten ein ähnliches

Potenzial beider Medikamente in Bezug auf Proteinurie, Mikroalbuminurie und Albuminausscheidung fest (Remuzzi *et al.* 1999). Ein Vorteil der Gruppe der ACE-Inhibitoren ist ihre Eigenschaft, die MMP-Aktivität (Matrixmetalloproteasen) bei Patienten mit Glomerulonephritis zu reduzieren (Lods *et al.* 2003). Selbst Patienten mit einer fortgeschrittenen schweren Niereninsuffizienz profitieren von der progressionshemmenden Wirkung der ACE-Hemmer (Hou *et al.* 2006).

Mit der COL4A3 *-/-* Maus konnte nicht nur ein Tiermodell für das humane Alport-Syndrom etabliert werden, sondern auch ein Modell für die chronisch glomeruläre und interstitielle Fibrose. Die Tiere entwickeln das Vollbild des Alport Syndroms und versterben letztendlich an Nierenversagen. Es handelt sich um ein nicht entzündliches Tiermodell, das nicht an arterieller Hypertonie oder Diabetes mellitus erkrankt (Cosgrove *et al.* 1996). Somit besteht durch die genetischen Eigenschaften der COL4A3 *-/-* Maus kein kardiovaskuläres Risiko als Störfaktor. Die nierenschützende Wirkung durch ACE-Inhibitoren und Vitamin D kann in diesem Fall nicht auf die Verringerung des kardiovaskulären Risikos zurückgeführt werden.

Der anti-fibrotische und nephroprotektive Effekt von Ramipril wurde durch die Arbeitsgruppe Gross und Kollegen bereits eindeutig nachgewiesen. Eine präemptive Gabe des ACE-Hemmers Ramipril verzögerte das Auftreten von Proteinurie sowie deren Schweregrad. Außerdem verlängerte sich das Überleben der behandelten Tiere um über 100%. Parallel zu diesen positiven Veränderungen kam es zu einer signifikanten Abnahme der glomerulären und tubulointerstitiellen Fibrose über eine Herunterregulierung der TGF- β -Expression (Gross *et al.* 2003a, Gross *et al.* 2012). Tierexperimentell zeigte sich hierbei der ACE-Hemmer der Gruppe der AT1-Antagonisten überlegen (Gross *et al.* 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Versuchstiere mit Calcitriol allein oder in Kombination mit dem ACE-Hemmer über einen definierten Zeitraum behandelt, um synergistische Effekte von Calcitriol mit dem ACE-Hemmer auf die Überlebenszeit, Proteinurie und die Progression der Nierenfibrose zu erzielen. Da sich der Fokus dieser Arbeit primär auf die additiven Effekte von Calcitriol konzentrierte, begannen wir statt mit einer sehr frühen ACE-Hemmer Therapie ab der dritten Lebenswoche mit einer ab der vierten Lebenswoche. Den Tieren wurde also erst ab der vierten Lebenswoche der ACE-Hemmer Ramipril ins Trinkwasser beigemischt. Setzt man dies zum menschlichen Alter bei Alport-Patienten gleich entspricht dies einer frühen ACE-Behandlung bei Kindern ab dem Grundschulalter. In der 6. Lebenswoche der Mäuse starteten wir dann mit der i.p. Calcitriolgabe. Dies kommt beim humanen Alport-Syndrom dem klinischen Bild einer fortschreitenden Proteinurie mit zunehmender Nierenfibrose sehr nah. Unser Ergebnis bezüglich der Wirkung der alleinigen

Therapie mit Ramipril unterschied sich, wie zu erwarten, nicht wesentlich von den Ergebnissen vorheriger Studien. Eine signifikant verlängerte Lebensdauer konnte unter der Calcitriol-Monotherapie nicht erreicht werden. Ein additiver Effekt bei der gleichzeitigen Gabe von Calcitriol und Ramipril verlängerte die Überlebensrate um 10 %. Diese Werte verfehlten jedoch knapp die Signifikanzgrenze. Anders verhielt es sich mit der Gabe vom Vitamin D-Analogon Paricalcitol. Hier war ein signifikant verlängertes Überleben der Versuchstiere im Vergleich zur ACE-Monotherapie mit einer höheren Überlebensrate von 18 % ($p < 0,01$) messbar (Rubel *et al.* 2013). Die zugrundeliegende Hypothese dieser Arbeit war, dass die Kombination von Calcitriol und Ramipril das Fortschreiten der Niereninsuffizienz über synergistische Effekte, nämlich durch die Herunterregulierung des RAAS, hinauszögern würde. Entgegen unserer Hypothese konnte kein signifikanter Calcitriol-Effekt bezüglich der Lebenserwartung erzielt werden. Interessanterweise erzielte die parallel laufende Monotherapie mit Paricalcitol einen signifikanten Unterschied bezüglich der Überlebenszeiten. Auch wenn Calcitriol bezüglich der Überlebenszeiten nur knapp die Signifikanzgrenze unterschritten hatte, ist eine positive Tendenz auf die Nephroprotektion nicht abzustreiten. Bei unserem Maus-Modell lag die Zeitspanne zwischen Beginn der Proteinurie bis zum Erreichen der terminalen Niereninsuffizienz bei 3,5 Wochen (6. - 9,5. Lebenswoche). Durch die nephroprotektiven Eigenschaften des ACE-Hemmers wird zwar das Therapiefenster für Calcitriol vergrößert, dies reicht aber möglicherweise nicht aus. Unter Umständen könnte ein früherer Therapiebeginn mit Calcitriol ein signifikantes Ergebnis erzielen, so z.B. in einem weniger rapide verlaufendem Tiermodell.

Die Bestimmung des Serumharnstoffs als Parameter für die Nierenfunktion bestätigte die Ergebnisse hinsichtlich der Lebenserwartung. Die höchste BUN Konzentration wurde in den Gruppen für Placebo, Calcitriol- und Paricalcitol gemessen. In allen Ramipril-Gruppen war eine deutlich niedrigere Harnstoff-BUN Konzentration messbar.

4.2 Aktives Vitamin und seine Analoga senken die Mortalitätsrate bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung

Der fortschreitende Verlust der Nierenfunktion führt zu einer verminderten Synthese von Calcitriol. Zudem mangelt es Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz häufig an Vitamin D (LaClair *et al.* 2005). Unter physiologischen Bedingungen erfolgt die Synthese von Calcitriol i.d.R. bedarfsgerecht und unterliegt einem Regelkreis. Die Calcitriol-Serumkonzentration liegt etwa 100-fach niedriger als die Calcidiol-Konzentration. Calcitriol

und seine Analoga sind nun seit fast 30 Jahren die Therapie der Wahl bei der Behandlung des sekundären HPT (Dusso und Tokumoto 2011).

Die Folgen eines Vitamin-D-Mangels sind vielfältig und reichen von bekannten Effekten wie beispielsweise einer Erhöhung des Parathormons bis hin zu einer gesteigerten Mortalitätsrate. Der Vitamin-D-Mangel hat nicht nur bei Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen einen negativen Effekt auf die Mortalitätsrate. Ein niedriger 25(OH)D Spiegel (<17,8 ng/ml) führt auch bei Patienten mit einer normalen Nierenfunktion zu einer Mortalitätssteigerung von bis zu 26 % (Melamed *et al.* 2008). Studien belegen, dass die Art des zugeführten Präparates sich auf die Mortalitätsrate auswirken kann. Teng *et al.* beobachteten in einer ersten Studie 68 000 Hämodialysepatienten über einen Zeitraum von drei Jahren. Patienten die Paricalcitol erhielten hatten im Gegensatz zu mit Calcitriol behandelten Probanden eine um 16 % verbesserte Mortalitätsrate (Teng *et al.* 2003). In einer zweiten retrospektiven Studie wurden Hämodialysepatienten, die eine Vitamin-D-Therapie in Form von Calcitriol oder Paricalcitol erhielten, sowie Patienten ohne Vitamin-D-Substitution beobachtet. Patienten mit Vitamin-D-Substitution (ob nun Paricalcitol oder Calcitriol) zeigten im Gegensatz zu der unbehandelten Gruppe eine um 20-25 % verbesserte Mortalitätsrate. Auch hohe Serum Calcium-, Phosphat- und PTH-Spiegel wurden mit einer erhöhten Mortalitätsrate assoziiert (Teng *et al.* 2005). Retrospektive Studien an nicht dialysepflichtigen Patienten berichten über eine statistisch signifikante Senkung des Mortalitätsrisikos bei mit Calcitriol behandelten im Vergleich zu unbehandelten Patienten (Kovesdy *et al.* 2008, Shoben *et al.* 2008). In einer Querschnittsstudie an 825 inzidenten Hämodialysepatienten war die Therapie mit Calcitriol oder aktiven Vitamin-D-Analoga unabhängig der 25(OH)D oder Calcitriol-Serumkonzentration mit einer besseren Prognose assoziiert. Ohne eine Vitamin D-Substitution war die Überlebenschance umso höher, je höher die 25(OH)D- oder Calcitriol Serum-Konzentration war (Wolf *et al.* 2007). Durch normwertige Calcitriolspiegel wird die Anzahl der Vitamin-D-Rezeptoren im Zielgewebe aufrechterhalten, denn die Bindung von Calcitriol an seinen Rezeptor schützt diesen vor einem proteosomalem Abbau. 25 (OH)D-Spiegel im Referenzbereich sorgen bei noch erhaltener Hydroxilierungseigenschaft der Niere für entsprechende Calcitriolkonzentrationen im Serum (Wiese *et al.* 1992).

4.3 Senkung der Proteinurie unter Vitamin D

Eine persistierende Proteinurie ist ein Parameter für den Schweregrad einer Nierenerkrankung und gehört zu den wichtigsten progressionsfördernden Risikofaktoren der chronischen

Nierenerkrankungen. Zudem ist die Proteinurie mit einer erhöhten Mortalität verbunden (Hallan *et al.* 2012). Durch eine erhöhte Aktivität des RAAS wird die Eiweißausscheidung verstärkt. Die glomeruläre Hypertonie führt zur Erhöhung der glomerulären Permeabilität und somit zur vermehrten Proteinausscheidung (Remuzzi und Bertani 1998). Ein weiterer Mechanismus der zur einer pathologischen Proteinausscheidung führt ist eine verminderte Nephtrin-Expression. Denn Nephtrin ist für die Aufrechterhaltung der Integrität der Schlitzmembran verantwortlich und limitiert den Eiweißverlust über die Glomeruli (Brewster und Perazella 2004).

Proteine im Urin sind nephrotoxisch. Die erhöhte tubuläre Absorption induziert eine tubulointerstitielle Entzündung über eine Stimulation pro-inflammatorischer Zytokine und eine vermehrte EZM Produktion, was schließlich zur tubulären Atrophie, zur interstitiellen Fibrose und somit dem Verlust der Nierenfunktion führt (Remuzzi *et al.* 2006). Demnach wirkt eine Reduktion der Eiweißausscheidung nephroprotektiv.

Trotz ausdosierter Blockade des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und optimaler Blutzuckereinstellung leiden viele CKD-Patienten weiterhin unter der Proteinurie (vorwiegend Albuminurie). Ein Grund hierfür kann unter anderem das lokale RAAS der Niere sein, welches unabhängig vom klassischen endokrinen RAAS funktioniert. Denn interessanterweise ist die systemische Blockade der ANG-II-Produktion durch ACE-Hemmer nicht in der Lage, die lokale ANG-II-Produktion signifikant zu senken (Nishiyama *et al.* 2002). Alle Komponenten des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems sind auch in den proximalen Tubuluszellen der Niere anzutreffen (Ruster und Wolf 2006). Eine weitere Möglichkeit für die Aufnahme von ANG II (nach Bindung an den AT1-Rezeptor) in die Tubuluszellen erfolgt wahrscheinlich über Oberflächenrezeptoren oder durch rezeptorvermittelte Endozytose (Gonzalez-Villalobos *et al.* 2005, Navar und Nishiyama 2004).

Proteinurie und Hyperglykämie führen zu einer verstärkten Synthese von ANG II in den Tubuluszellen (Wolf *et al.* 2003). Neben der Induktion der glomerulären Hyperfiltration führt ANG II zur Aktivierung von Fibroblasten, die wiederum über eine gesteigerte Bildung von EZM den Fibrosierungsprozess fördern. Zu den pleiotropen Effekten des ANG II gehören auch die Aktivierung entzündungs- und fibrosefördernder Faktoren wie z.B. TGF- β 1 (Ruster und Wolf 2006) sowie die Supprimierung der Nephtrin-Expression in den Podozyten (Macconi *et al.* 2006).

Zahlreiche Studien belegen die blutdrucksenkende Wirkung von Calcitriol. In mehreren Fällen wurde z.B. über eine verminderte Plasma-Renin und ANG II Aktivität berichtet. Der

genaue Mechanismus ist noch nicht bekannt (Li 2003).

Angesichts der wichtigen Rolle des RAAS bei der Regulation des Blutdrucks, insbesondere der gegenseitigen Beziehung zwischen dem Vitamin-D-Spiegel und der Plasma-Renin-Aktivität, ging die Arbeitsgruppe von Li und Kollegen von einer reziproken Beziehung zwischen Vitamin D und der Renin-Expression aus. Mit Hilfe von VDR $-/-$ Mäusen konnte die suppressive Wirkung des aktiven Vitamin D₃ (Calcitriol) in Bezug auf die Renin-Expression im RAAS nachgewiesen werden (Li 2003).

Die nephroprotektive Wirkung von Calcitriol, über die Vitamin-D-Rezeptor Aktivierung, die letztendlich zur Herunterregulation des RAAS führt, wurde auch schon von Zhang et. al beschrieben.

Ein positiver Effekt von Calcitriol auf die Albuminurie wurde 2004 in subtotal nephrektomierten Ratten gezeigt (Zhang *et al.* 2008). Eine weitere Studie zeigte bei IgA-Nephritis-Patienten einen signifikanten Rückgang der Proteinurie (Liu *et al.* 2012) sowie einen gleichzeitigen Abfall der TGF- β Konzentration im Serum (Szeto *et al.* 2008). Bei Patienten mit diabetischer Nephropathie brachte die orale Calcitrioltherapie einen Abfall der Proteinurie um 18,7 % (Krairitichai *et al.* 2012). Niedrige Calcitriolkonzentrationen stimulieren die Renintranskription, begleitet von einem lokalen Anstieg von ANG II (Wolf *et al.* 2003). In dieser Arbeit konnte mit der i.p Calcitriolgabe in der 7,5. Lebenswoche eine Reduktion der hochmolekularen Proteinurie um 20% und ein Albuminabfall um 35 % im Vergleich zu unbehandelten COL 4A3 $-/-$ Mäusen erzielt werden. Durch die Kombination mit dem ACE-Hemmer Ramipril erzielten wir einen weiteren Rückgang der Proteinurie auf der Ebene der hochmolekularen Proteine um 68 % und der Albuminurie um 44 %. Der schon zuvor in klinischen Studien erzielte günstige Effekt auf die Eiweißausscheidung wurde hier bestätigt.

4.4 Renale Fibrose und TGF- β

Hohe Angiotensin II-Spiegel fördern die Produktion von pro-inflammatorischen sowie pro fibrotischen Faktoren. Die im Rahmen der Entzündungsreaktion eingewanderten mononukleären Zellen sezernieren eine Reihe von Zytokinen wie z.B. den TGF- β und cTGF und den „fibroblast growth factor 2“ (FGF-2) (Boor und Floege 2011). Durch die Stimulation von Angiotensin II kommt es zur Proliferation von renalen Fibroblasten in der Zellkultur sowie zu einer erhöhten TGF- β mRNA-Expression, cTGF, Fibronectin und Kollagen Typ I

(Ruster und Wolf 2006). Eine interessante Beobachtung ist, dass Renin in der Lage ist, über spezifische Rezeptoren TGF- β 1 in mesangialen Zellen zu aktivieren (Ruster und Wolf 2006). ACE-Hemmer und AT1-Antagonisten erhöhen bekanntlich den Renin-Spiegel. Vielleicht begünstigt die Blockade des RAAS auch zum Teil über diesen Weg die Entstehung der Fibrose (Rodriguez-Vita *et al.* 2005). Die Suppression des RAAS führt aber auch zu einer Herunterregulation von z.B. TGF- β und TNF-Alpha, was sich in einer reduzierten Expression von Laminin und Fibronectin widerspiegelt (Ryu und Rando 2001). In einer früheren Studie konnte bereits gezeigt werden, dass Ramipril die TGF- β -Expression um ca. 85 % reduziert (Gross *et al.* 2003a). Calcitriol und die Kombination aus Calcitriol + Ramipril führten zu einer Reduktion der TGF- β Expression bis auf Wildtyplevel. Hinsichtlich der cTGF-Expression war in keinen Behandlungsgruppen ein Effekt zu verzeichnen.

Obwohl das Calcitriol in der Lage war, die TGF- β -Expression auf ein normales Niveau zu senken, spiegelt sich dieses Ergebnis nicht in den histologischen Untersuchungen wieder. Der Grund hierfür könnte sein, dass für die Quantifizierung des TGF- β das Lysat einer ganzen Niere genutzt wurde, in dem unterschiedliche Mengen an TGF produzierenden Zellen enthalten waren. Aufgrund der niedrigen Überlebenszeit in der Calcitriol-Gruppe könnte man davon ausgehen, dass die Nieren schon soweit geschädigt waren, dass eine Produktion von TGF- β nicht mehr möglich war.

Betrachten wir die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen wird deutlich, dass durch die alleinige Behandlung mit Ramipril, die Ablagerung von EZM und die interstitielle Fibrose deutlich reduziert werden. Diese Effekte sind auf die verminderte TGF- β -Expression zurückzuführen. Die Therapie mit Calcitriol erzielte im Vergleich zur Placebokontrolle auf glomerulärer Ebene signifikante Unterschiede in der EZM-Akkumulation und dem Grad der Fibrose. Auf tubulointerstitieller Ebene blieb ein positiver Effekt jedoch aus. Zwischen der alleinigen Calcitriol- und der Kombinationstherapie war keine Signifikanz messbar. Die Ergebnisse aus der Kombination mit Ramipril und Calcitriol erzielten nicht noch bessere Resultate als die Behandlung mit dem ACE-Hemmer allein.

4.5 Vitamin D und seine Analoga: Wirkungsweisen, die der Progression der Niereninsuffizienz entgegenwirken

Die meisten pleiotropen Effekte von Vitamin D und seinen Analoga werden bekanntlich durch spezifische VDR's vermittelt. Neueste Studien belegen den positiven Effekt der VDR-Aktivierung und tierexperimentelle Studien beweisen den nephroprotektiven Effekt durch Reduktion der Proteinurie sowie Glomerulosklerose (Agarwal *et al.* 2005, Jorgensen *et al.* 2012).

2005 wurde in einer Placebo-kontrollierten Studie der Nutzen von Paricalcitol bei sHPT ermittelt. Die Proteinurie konnte in der Paricalcitol-Gruppe um 51 % und in der Placebogruppe um 25 % gesenkt werden (Agarwal *et al.* 2005). In einer single-center Studie wurde die orale Paricalcitol Substitution über sechs Monate mit einer Placebo-Gruppe verglichen. Der Protein/Kreatinin-Quotient sank bei Paricalcitol behandelten Patienten im Urin um 17,6 % (Fishbane *et al.* 2009). In der VITAL-Studie, einer größeren Placebo kontrollierten und doppelblinden, randomisierten Studie mit Diabetes mellitus Typ 2 Patienten wurden die Ergebnisse von Fishbane *et al.* bestätigt (de Zeeuw *et al.* 2010). Alle Studienteilnehmer wurden mit RAAS blockierenden Medikamenten behandelt. Zudem bekamen die Patienten das Paricalcitol in unterschiedlichen Dosierungen (1 µg und 2 µg) über einen Zeitraum von sechs Monaten. In der Gesamtgruppe der Paricalcitol behandelten Patienten sank im Vergleich zu der Placebo-Gruppe der Albumin/Kreatinin Quotient um 16 % ab. Die höhere Dosis von 2 µg erzielte sogar einen Abfall des gesamten Quotienten um 20 %. Fazit der Autoren war, dass ein kleiner Anteil der Reduktion des Albumin/Kreatinin Quotienten auf die direkte Senkung des Blutdruckes und der überwiegende Teil auf die Gabe von Paricalcitol zurückzuführen ist.

Auch für Calcitriol wurden positive Auswirkungen in Bezug auf die Proteinausscheidung berichtet (siehe 3.2).

Die genauen Mechanismen der nephroprotektiven Wirkung von Vitamin D konnten jedoch noch nicht verstanden werden. Es wird davon ausgegangen, dass multiple Vorgänge daran beteiligt sind. Dazu gehören die bereits erwähnte Suppression des RAAS, immunmodulatorische Eigenschaften (Zhang *et al.* 2012), anti-proliferative und anti-fibrotische Effekte (Zhang *et al.* 2010) und eine Reduktion der Podozytenschädigung (Kuhlmann *et al.* 2004).

Calcitriol und Paricalcitol besitzen unterschiedliche Potentiale in Bezug auf die Inhibition der Renin mRNA-Expression (Fryer *et al.* 2007). In der LURIC-Studie (**L**udwigshafen **R**isk and

Cardiovascular Health Study) wurde erstmals in einer klinischen Studie gezeigt, dass die Konzentrationen an 25-Hydroxyvitamin D und 1,25-Dihydroxyvitamin D invers mit der Renin-Konzentration assoziiert sind. Die Arbeitsgruppe von Li et al. publizierte in ihrer Arbeit, dass die Plasma-ANG-2 Produktion in VDR^{-/-} Mäusen erhöht ist und die Gabe von Calcitriol in der Lage ist, Renin zu supprimieren (Li et al. 2002). Dieser Effekt scheint unabhängig von Calcium und PTH zu funktionieren (Kong et al. 2008). Auf molekularbiologischer Ebene bindet Calcitriol an seinen Rezeptor. Dadurch wird die Bindung des CREB-CBP-Komplexes (*cyclic adenosine monophosphate-response element-binding protein*) in der Promotorregion des Renin Gens blockiert und infolgedessen die Renin-Expression reduziert (Yuan et al. 2007).

Renin supprimierende Eigenschaften wurden auch für Paricalcitol nachgewiesen. Freundlich et al. studierten an teils nephrektomierten Ratten die Auswirkungen einer Therapie mit Paricalcitol. Sie fanden heraus, dass bei mit Paricalcitol behandelten Ratten die mRNA-Konzentration von Komponenten des RAAS im Vergleich zu unbehandelten Ratten niedriger war. Glomeruläre und tubuläre Veränderungen, Bluthochdruck und Proteinurie waren ebenfalls vermindert (Freundlich et al. 2008).

Das histologische Korrelat zur Niereninsuffizienz ist die interstitielle Fibrose mit tubulärer Atrophie. Das Verständnis für die Entwicklung einer Nierenfibrose hat wichtige therapeutische Konsequenzen. Viele tierexperimentelle wie auch klinische Studien belegen den positiven Effekt einer Vitamin-D-Substitution im Sinne einer verminderten Fibrose und verbesserten Nierenfunktion. Dabei ist die Rolle des Vitamin D in der Entstehung von der Nierenfibrose relativ ungeklärt. Für die Forschung an der tubulointerstitiellen Fibrose ist das UUO-Mausmodell (*unilateral ureteral obstruction*) am besten geeignet. Tan et al. zeigten in diesem Tiermodell, dass durch die Substitution von Paricalcitol eine ausgeprägte Abschwächung der tubulointerstitiellen Fibrose erreicht werden konnte (Tan et al. 2006). Paricalcitol supprimierte die Induktion der EZM-Proteine wie Fibronectin, Kollagen Typ I und III sowie TGF- β . Li et al. untersuchten direkte Wirkungen von Vitamin-D auf Myofibroblasten. Aktivierte Fibroblasten (Myofibroblasten) sind gekennzeichnet durch alpha-SMA (alpha-smooth muscle actin). Es stellte sich heraus, dass Calcitriol in der Lage war, die Aktivierung der Fibroblasten über die Supprimierung der TGF- β vermittelten alpha-SMA-Expression zu unterdrücken. Frühere Studien aus den Jahren 1998 (Schwarz et al. 1998) und 2001 (Makibayashi et al. 2001) zeigten die positive Wirkung von Calcitriol auf die

Glomerulosklerose, Albuminurie und die verminderte Podozytenschädigung in nephrektomierten Ratten.

4.6 *NF- κ B und die Nierenfibrose*

Eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Nierenerkrankungen spielt die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs (Guijarro und Egido 2001). Über diesen Signalweg wird die Produktion von profibrotischen und proinflammatorischen Faktoren (z.B. TNF-alpha, MCP-1) reguliert. So fördert MCP-1 beispielsweise die Infiltration der Nieren durch Makrophagen. Diese wiederum sezernieren Faktoren, welche die Progression der Nierenerkrankungen fördern. Erhöhte Blutglukosespiegel und Lipopolysaccharide sind bekanntlich NF- κ B-Aktivatoren im Nierenparenchym. Interessant ist, dass Ang II NF- κ B aktiviert, während NF- κ B bei hohen Blutglukosespiegeln die Angiotensinogen-Expression stimuliert (Deb *et al.* 2009). Vitamin D und seine Analoga sind auf molekularer Ebene nicht nur in der Lage die Renintranskription sondern auch den NF- κ B-Signalweg zu hemmen (Sun *et al.* 2006, Yuan *et al.* 2007). Bei UUO-Mäusen gelang es z.B. durch die Behandlung mit Paricalcitol die renale Entzündungsreaktion durch die Blockade des NF- κ B-Signalweg zu senken (Tan *et al.* 2008). Für eine Vielzahl von Nierenerkrankungen konnte eine umgekehrt proportionale Beziehung zwischen dem Plasma Vitamin-D-Spiegel und der renalen Entzündungsreaktion festgestellt werden (Zehnder *et al.* 2008). Calcitriol hemmt wiederum die Expression von MCP-1 und Angiotensinogen, die über erhöhte Blutglukosespiegel induziert werden (Deb *et al.* 2009).

4.7 *Bedeutung für die künftige Forschung*

Weltweit steigt die Anzahl an chronisch Nierenkranken Patienten. Global wird die Anzahl an von CKD betroffenen Menschen auf 50 Millionen eingeschätzt (Li 2010).

Die zwei wichtigsten Ursachen für die Entstehung einer CKD sind die arterielle Hypertonie und der Diabetes mellitus. Der Lebensstil in den Industrieländern, gekennzeichnet durch Überernährung und Bewegungsmangel, ist die fördernde Hauptursache dieser Erkrankungen (Bakris und Ritz 2009). Tubulointerstitielle und glomeruläre Schäden durch Infektionen, Toxine und Medikamentenmissbrauch können als weitere Ursachen aufgeführt werden (Levey und Coresh 2012). Zudem ist das kardiovaskuläre Risiko chronisch Nierenkranker zusätzlich erhöht und konnte durch zahlreiche Studien belegt werden (Eckardt *et al.* 2012, Khosla und Bakris 2006).

Die derzeitigen Behandlungsmöglichkeiten erschöpfen sich in einer Symptomkontrolle umso das Fortschreiten einer Niereninsuffizienz hinauszuzögern. Für terminal niereninsuffiziente Patienten besteht aktuell keine andere therapeutische Option als die Nierenersatztherapie. Die Etablierung innovativer Behandlungsstrategien ist daher von großer Bedeutung. Eine mögliche Ansatzstelle ist die Blockade des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems zur Vermeidung der Progression von Nierenschäden. Die Aufrechterhaltung der Vitamin D Homöostase ist ein weiterer wichtiger Aspekt, denn es besteht eine reziproke Beziehung zwischen dem Vitamin-D-Blutplasmaspiegel und der Aktivität des RAAS. Eine weitere Ansatzstelle für weitere Studien stellt der NF- κ B-Signalweg dar, der wie in der in dieser Arbeit erwähnt, auf molekularer Ebene in der Lage ist, Komponenten des RAAS zu inhibieren.

In einem weniger rapide verlaufenden Tiermodell könnte möglicherweise eine durch früheren Therapiebeginn eine bessere Wirkung von Calcitriol erzielt werden.

5 Zusammenfassung

Die erbliche Typ IV-Kollagen-Erkrankung Alport-Syndrom führt zur chronisch progressiven Niereninsuffizienz. Das Syndrom wird durch Mutationen im Typ-IV-Kollagen verursacht. Diese Mutationen führen dazu, dass die glomeruläre Basalmembran letztendlich nicht mehr aus stabileren $\alpha3/\alpha4/\alpha5$ -Ketten, sondern nur aus den $\alpha1$ - und $\alpha2$ -Ketten vom Typ IV-Kollagen aufgebaut wird. Durch diese Veränderungen ist die glomeruläre Basalmembran instabil und anfälliger für Endoproteolyse. Im Verlauf der Erkrankung kommt es zur einer Verdickung und Spaltung der glomerulären Basalmembran, welche zur Hämaturie und Proteinurie führt. Daraus resultiert eine renale Fibrose mit Verlust der Nierenfunktion.

Die COL4A3 $-/-$ Alport-Mäuse haben den gleichen Gendefekt wie Patienten mit Alport-Syndrom und ermöglichen die Untersuchung der Nierenfunktion im Tiermodell. In der vorliegenden Arbeit wurden Wirkungen der aktiven Form des Vitamin D, Calcitriol, des ACE-Hemmers Ramipril und die Kombinationen beider Stoffe in Alport-Mäusen getestet. Ziel dieser Arbeit war es, im Tierversuch mögliche synergistische Effekte zwischen aktivem Vitamin D und dem ACE-Hemmer Ramipril aufzuzeigen.

Andere Arbeitsgruppen lieferten bereits Hinweise darauf, dass Calcitriol und seine Analoga eine wichtige Rolle in der Beeinflussung der Progressionsfaktoren von Nierenerkrankungen wie Proteinurie und Fibrose einnehmen. Der genaue Mechanismus und die Frage, wie Vitamin D diese Prozesse beeinflusst, sind noch nicht vollständig geklärt.

In der vorliegenden Arbeit betrachteten wir zunächst die Überlebensrate der Versuchstiere, die mit Calcitriol-Monotherapie und Calcitriol+Ramipril in Kombination behandelt wurden. Die Calcitriol-Monotherapie zeigte keinen Einfluss auf die Lebenserwartung der Alport-Mäuse bis zum Tod am Nierenversagen. Die Kombination aus Calcitriol und Ramipril erzielte im Vergleich zur Ramipril-Monotherapie ein um 10 % verlängertes Überleben, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant.

Histologisch wurden die Nieren der Versuchstiere auf tubulointerstitielle und glomeruläre Veränderungen in Bezug auf extrazelluläre Matrix-Akkumulation und Fibrose (Laminin und Fibronectin) untersucht. Calcitriol zeigte hierbei im Vergleich zur Placebo-Kontrolle eine signifikant geringere Akkumulation der glomerulären Matrix ($p < 0,01$) ohne signifikante Unterschiede in den tubulointerstitiellen Veränderungen.

Die Kombinationstherapie mit Calcitriol und Ramipril zeigte einen signifikanten Effekt auf die tubulointerstitielle Matrix-Akkumulation ($p < 0,05$). Zwar konnte die Calcitriol-Behandlung die glomeruläre Fibrosierung reduzieren, allerdings ohne eine statistische Relevanz im Vergleich zu der Placebo-Kontrolle. Auf die tubulointerstitielle Fibrosierung hatte Calcitriol keinen positiven Effekt.

TGF- β und CTGF als Marker für profibrotische und proinflammatorische Aktivität wurden mittels der Western Blot-Technik bestimmt. In Bezug auf die TGF β -Expression in den Behandlungsgruppen zeigte sich im Vergleich zur Placebo-Kontrolle ein Abfall auf Wildtyp-Level. Die CTGF-Expression zeigte keinen relevanten Unterschied zu den Kontrollen.

Die Calcitriol-Monotherapie konnte die Proteinurie der Alport-Mäuse leicht reduzieren (<35 % Albuminurie, <20 % hochmolekulare Proteinurie). Die Kombination mit dem ACE-Hemmer erzielte deutlich bessere Werte. Die Albuminurie konnte um 44 % und die hochmolekulare Eiweißausscheidung sogar um 68 % gesenkt werden.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Calcitriolsubstitution als aktives Vitamin-D sich bei chronisch nierenkranken Mäusen mit Alport-Syndrom durchaus positiv auf die chronische progrediente Niereninsuffizienz auswirken kann. Dies könnte in Zukunft auch beim Menschen in Therapieregistern bei Patienten mit Alport-Syndrom genauer untersucht werden.

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Diagnoseverteilung bei lebenden Dialysepatienten in Nierenersatztherapie	21
Abbildung 2: Mechanismen der nephroprotektiven Wirkung von Vitamin D und seine Analoga.....	25
Abbildung 3: Kaplan Meyer-Kurve	41
Abbildung 4: Kaplan-Meyer Kurve	42
Abbildung 5: Überlebenszeiten Bo xplot	43
Abbildung 6: Urin-Gelelektrophorese zur Demonstration der Proteinurie	44
Abbildung 7: Urin-Gelelektrophorese zur Demonstration der Proteinurie bei Calcitriol Monotherapie	44
Abbildung 8: Hochmolekulare Proteinurie > 90 kDa	45
Abbildung 9: Albuminurie (70 kDa).....	45
Abbildung 10: Niedermolekulare Proteinurie (< 50 kDa)	46
Abbildung 11: Darstellung derverschiedenen Proteinfractionen im zeitlichen Verlauf	47
Abbildung 12: TGF- β -Expression.....	48
Abbildung 13: cTGF- β -Expression.....	48
Abbildung 14: TGF- β -Expression, Western Blot.....	49
Abbildung 15: cTGF- β -Expression, Western Blot.....	49
Abbildung 16: Laminin-Score, 400-fache Vergrößerung	50
Abbildung 17: Fibronectin-Score, 400-fache Vergrößerung.....	50
Abbildung 18: Laminin-Score, 100-fache Vergrößerung	51
Abbildung 19: Fibronectin-Score, 100-fache Vergrößerung.....	52
Abbildung 20: BUN (9,5 Lebenswochen).....	52
Abbildung 21: Wildtyp, Laminin	53
Abbildung 22: Wildtyp, Fibronectin.....	53
Abbildung 23: Placebo, Laminin	53
Abbildung 24: Placebo, Fibronectin	53
Abbildung 25: Calcitriol, Laminin	53
Abbildung 26: Calcitriol, Fibronectin	53
Abbildung 27: Calcitriol und Ramipril, Laminin	54
Abbildung 28: Calcitriol und Ramipril, Fibronectin.....	54

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Diagnosekriterien Alport-Syndrom.....	12
Tabelle 2: Verwendete Geräte und Programme	28
Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien	29
Tabelle 4: Verwendete Antikörper und Medikamente.....	30
Tabelle 5: Verwendete Reagenzien und Lösungen sowie Chemikalien	31
Tabelle 6: Verwendete Puffer	33
Tabelle 7: Gruppeneinteilung.....	42
Tabelle 8: Prozentuale Verteilung der Proteinurie im Vergleich zur unbehandelten Alport-Maus.....	48

7 Literaturverzeichnis

1. Agarwal R, Acharya M, Tian J, Hippensteel RL, Melnick JZ, Qiu P, Williams L, Batlle D (2005): Antiproteinuric effect of oral paricalcitol in chronic kidney disease. *Kidney Int* 68, 2823-8
2. Alport AC (1927): Hereditary Familial Congenital Haemorrhagic Nephritis. *Br Med J* 1, 504-6
3. Antonovych TT, Deasy PF, Tina LU, D'Albora JB, Hollerman CE, Calcagno PL (1969): Hereditary nephritis. Early clinical, functional, and morphological studies. *Pediatr Res* 3, 545-56
4. Atkins RC (2005): The epidemiology of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl* S14-8
5. Bakris GL, Ritz E (2009): The message for World Kidney Day 2009: Hypertension and kidney disease: a marriage that should be prevented. *Nephrol Dial Transplant* 24, 695-7
6. Boor P, Floege J (2011): Chronic kidney disease growth factors in renal fibrosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 38, 441-50
7. Brewster UC, Perazella MA (2004): The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease. *Am J Med* 116, 263-72
8. Brown AJ, Dusso A, Slatopolsky E (1999): Vitamin D. *Am J Physiol* 277, F157-75
9. Christakos S, Hewison M, Gardner DG, Wagner CL, Sergeev IN, Rutten E, Pittas AG, Boland R, Ferrucci L, Bikle DD (2013): Vitamin D: beyond bone. *Ann N Y Acad Sci* 1287, 45-58
10. Coresh J, Selvin E, Stevens LA, Manzi J, Kusek JW, Eggers P, Van Lente F, Levey AS (2007): Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA* 298, 2038-47
11. 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, 2981-92
12. 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, 1543-51
13. Deb DK, Chen Y, Zhang Z, Zhang Y, Szeto FL, Wong KE, Kong J, Li YC (2009): 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ suppresses high glucose-induced angiotensinogen expression in kidney cells by blocking the NF- κ B pathway. *Am J Physiol Renal Physiol* 296, F1212-8

14. Durbeej M (2010): Laminins. *Cell Tissue Res* 339, 259-68
15. Dusso AS, Tokumoto M (2011): Defective renal maintenance of the vitamin D endocrine system impairs vitamin D renoprotection: a downward spiral in kidney disease. *Kidney Int* 79, 715-29
16. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E (2005): Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 289, F8-28
17. Eckardt KU, Barthlein B, Baid-Agrawal S, Beck A, Busch M, Eitner F, Ekici AB, Floege J, Gefeller O, Haller H, et al. (2012): The German Chronic Kidney Disease (GCKD) study: design and methods. *Nephrol Dial Transplant* 27, 1454-60
18. Fishbane S, Chittineni H, Packman M, Dutka P, Ali N, Durie N (2009): Oral paricalcitol in the treatment of patients with CKD and proteinuria: a randomized trial. *Am J Kidney Dis* 54, 647-52
19. Flinter F (1997): Alport's syndrome. *J Med Genet* 34, 326-30
20. Flinter FA, Cameron JS, Chantler C, Houston I, Bobrow M (1988): Genetics of classic Alport's syndrome. *Lancet* 2, 1005-7
21. Frei U, Schober-Halstenberg H (2006): Nierenersatztherapie in Deutschland-Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2006/2007. http://www.bundesverband-niere.de/files/QuaSi-Niere-Bericht_2006-2007.pdf, 1-64
22. Freundlich M, Quiroz Y, Zhang Z, Zhang Y, Bravo Y, Weisinger JR, Li YC, Rodriguez-Iturbe B (2008): Suppression of renin-angiotensin gene expression in the kidney by paricalcitol. *Kidney Int* 74, 1394-402
23. Fryer RM, Rakestraw PA, Nakane M, Dixon D, Banfor PN, Koch KA, Wu-Wong JR, Reinhart GA (2007): Differential inhibition of renin mRNA expression by paricalcitol and calcitriol in C57/BL6 mice. *Nephron Physiol* 106, p76-81
24. Gonzalez-Villalobos R, Klassen RB, Allen PL, Navar LG, Hammond TG (2005): Megalin binds and internalizes angiotensin II. *Am J Physiol Renal Physiol* 288, F420-7
25. Gross O (2008): Understanding renal disorders as systemic diseases: the fascinating world of basement membranes beyond the glomerulus. *Nephrol Dial Transplant* 23, 1823-5
26. Gross O, Beirowski B, Koepke ML, Kuck J, Reiner M, Addicks K, Smyth N, Schulze-Lohoff E, Weber M (2003a): Preemptive ramipril therapy delays renal failure and reduces renal fibrosis in COL4A3-knockout mice with Alport syndrome. *Kidney Int* 63, 438-46
27. Gross O, Netzer KO, Lambrecht R, Seibold S, Weber M (2003b): Novel COL4A4 splice defect and in-frame deletion in a large consanguine family as a genetic link between benign familial haematuria and autosomal Alport syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 18, 1122-7

28. 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, 1716-23
29. Gross O, Licht C, Anders HJ, Hoppe B, Beck B, Tonshoff B, Hocker B, Wygoda S, Ehrich JH, Pape L et al. (2012): Early angiotensin-converting enzyme inhibition in Alport syndrome delays renal failure and improves life expectancy. *Kidney Int* 81, 494-501
30. Gubler MC (2008): Inherited diseases of the glomerular basement membrane. *Nat Clin Pract Nephrol* 4, 24-37
31. Gujjarro C, Egido J (2001): Transcription factor-kappa B (NF-kappa B) and renal disease. *Kidney Int* 59, 415-24
32. Haas M (2009): Alport syndrome and thin glomerular basement membrane nephropathy: a practical approach to diagnosis. *Arch Pathol Lab Med* 133, 224-32
33. Hackenthal E, Paul M, Ganten D, Taugner R (1990): Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev* 70, 1067-116
34. Hallan SI, Matsushita K, Sang Y, Mahmoodi BK, Black C, Ishani A, Kleefstra N, Naimark D, Roderick P, Tonelli M et al. (2012): Age and association of kidney measures with mortality and end-stage renal disease. *JAMA* 308, 2349-60
35. Harvey SJ, Perry J, Zheng K, Chen D, Sado Y, Jefferson B, Ninomiya Y, Jacobs R, Hudson BG, Thorner PS (2006): Sequential expression of type IV collagen networks: testis as a model and relevance to spermatogenesis. *Am J Pathol* 168, 1587-97
36. Haussler MR, Haussler CA, Jurutka PW, Thompson PD, Hsieh JC, Remus LS, Selznick SH, Whitfield GK (1997): The vitamin D hormone and its nuclear receptor: molecular actions and disease states. *J Endocrinol* 154 Suppl, S57-73
37. Heidet L, Gubler MC (2009): The renal lesions of Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol* 20, 1210-5
38. Hoenderop JG, Voets T, Hoefs S, Weidema F, Prenen J, Nilius B, Bindels RJ (2003): Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6. *EMBO J* 22, 776-85
39. Holick MF (2007): Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 357, 266-81
40. Hou FF, Zhang X, Zhang GH, Xie D, Chen PY, Zhang WR, Jiang JP, Liang M, Wang GB, Liu ZR, et al. (2006): Efficacy and safety of benazepril for advanced chronic renal insufficiency. *N Engl J Med* 354, 131-40
41. Hudson BG, Tryggvason K, Sundaramoorthy M, Neilson EG (2003): Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. *N Engl J Med* 348, 2543-56

42. 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. *J Am Soc Nephrol* 14, 2603-10
43. Johal M, Levin A (2009): Vitamin D and parathyroid hormone in general populations: understandings in 2009 and applications to chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 4, 1508-14
44. Jorgensen HS, Winther S, Povlsen JV, Ivarsen P (2012): Effect of vitamin-D analogue on albuminuria in patients with non-dialysed chronic kidney disease stage 4-5: a retrospective single center study. *BMC Nephrol* 13, 102
45. Kalluri R, Shield CF, Todd P, Hudson BG, Neilson EG (1997): Isoform switching of type IV collagen is developmentally arrested in X-linked Alport syndrome leading to increased susceptibility of renal basement membranes to endoproteolysis. *J Clin Invest* 99, 2470-8
46. Kashtan CE (2001): 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); 1993-2015.
47. Kashtan CE, Kim Y, Lees GE, Thorner PS, Virtanen I, Miner JH (2001): Abnormal glomerular basement membrane laminins in murine, canine, and human Alport syndrome: aberrant laminin alpha2 deposition is species independent. *J Am Soc Nephrol* 12, 252-60
48. Keller C, Geberth S: Praxis der Nephrologie. 3. Auflage; Springer, Berlin/ Heidelberg 2010.
49. Khosla N, Bakris G (2006): Lessons learned from recent hypertension trials about kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 1, 229-35
50. Koepke ML, Weber M, Schulze-Lohoff E, Beirowski B, Segerer S, Gross O (2007): Nephroprotective effect of the HMG-CoA-reductase inhibitor cerivastatin in a mouse model of progressive renal fibrosis in Alport syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 22, 1062-9
51. Kong J, Qiao G, Zhang Z, Liu SQ, Li YC (2008): Targeted vitamin D receptor expression in juxtaglomerular cells suppresses renin expression independent of parathyroid hormone and calcium. *Kidney Int* 74, 1577-81
52. Kovesdy CP, Ahmadzadeh S, Anderson JE, Kalantar-Zadeh K (2008): Association of activated vitamin D treatment and mortality in chronic kidney disease. *Arch Intern Med* 168, 397-403
53. Krairittichai U, Mahannopkul R, Bunnag S (2012): An open label, randomized controlled study of oral calcitriol for the treatment of proteinuria in patients with diabetic kidney disease. *J Med Assoc Thai* 95 Suppl 3, S41-7

54. 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 Renal Physiol* 286, F526-33
55. Kumar R, Tebben PJ, Thompson JR (2012): Vitamin D and the kidney. *Arch Biochem Biophys* 523, 77-86
56. LaClair RE, Hellman RN, Karp SL, Kraus M, Ofner S, Li Q, Graves KL, Moe SM (2005): Prevalence of calcidiol deficiency in CKD: a cross-sectional study across latitudes in the United States. *Am J Kidney Dis* 45, 1026-33
57. Leitinger B, Hohenester E (2007): Mammalian collagen receptors. *Matrix Biol* 26, 146-55
58. Levey AS, Coresh J (2012): Chronic kidney disease. *Lancet* 379, 165-80
59. Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD (1993): The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N Engl J Med* 329, 1456-62
60. Lewis EJ, Hunsicker LG, Clarke WR, Berl T, Pohl MA, Lewis JB, Ritz E, Atkins RC, Rohde R, Raz I (2001): Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N Engl J Med* 345, 851-60
61. Li YC (2003): Vitamin D regulation of the renin-angiotensin system. *J Cell Biochem* 88, 327-31
62. Li YC (2010): Renoprotective effects of vitamin D analogs. *Kidney Int* 78, 134-9
63. Li YC, Amling M, Pirro AE, Priemel M, Meuse J, Baron R, Delling G, Demay MB (1998): Normalization of mineral ion homeostasis by dietary means prevents hyperparathyroidism, rickets, and osteomalacia, but not alopecia in vitamin D receptor-ablated mice. *Endocrinology* 139, 4391-6
64. Li YC, Kong J, Wei M, Chen ZF, Liu SQ, Cao LP (2002): 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J Clin Invest* 110, 229-38
65. Liu LJ, Lv JC, Shi SF, Chen YQ, Zhang H, Wang HY (2012): Oral calcitriol for reduction of proteinuria in patients with IgA nephropathy: a randomized controlled trial. *Am J Kidney Dis* 59, 67-74
66. Liu W, Yu WR, Carling T, Juhlin C, Rastad J, Ridefelt P, Akerstrom G, Hellman P (1998): Regulation of gp330/megalin expression by vitamins A and D. *Eur J Clin Invest* 28, 100-7
67. Lods N, Ferrari P, Frey FJ, Kappeler A, Berthier C, Vogt B, Marti HP (2003): Angiotensin-converting enzyme inhibition but not angiotensin II receptor blockade

- regulates matrix metalloproteinase activity in patients with glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 14, 2861-72
68. Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC: *Biochemie & Pathobiochemie*. 8. Auflage; Springer, Heidelberg 2007.
 69. Macconi D, Abbate M, Morigi M, Angioletti S, Mister M, Buelli S, Bonomelli M, Mundel P, Endlich K, Remuzzi A et al. (2006): Permselective dysfunction of podocyte-podocyte contact upon angiotensin II unravels the molecular target for renoprotective intervention. *Am J Pathol* 168, 1073-85
 70. Makibayashi K, Tatematsu M, Hirata M, Fukushima N, Kusano K, Ohashi S, Abe H, Kuze K, Fukatsu A, Kita T et al. (2001): A vitamin D analog ameliorates glomerular injury on rat glomerulonephritis. *Am J Pathol* 158, 1733-41
 71. Mazzucco G, Barsotti P, Muda AO, Fortunato M, Mihatsch M, Torri-Tarelli L, Renieri A, Faraggiana T, De Marchi M, Monga G (1998): Ultrastructural and immunohistochemical findings in Alport's syndrome: a study of 108 patients from 97 Italian families with particular emphasis on COL4A5 gene mutation correlations. *J Am Soc Nephrol* 9, 1023-31
 72. Melamed ML, Michos ED, Post W, Astor B (2008): 25-hydroxyvitamin D levels and the risk of mortality in the general population. *Arch Intern Med* 168, 1629-37
 73. Meran S, Steadman R (2011): Fibroblasts and myofibroblasts in renal fibrosis. *Int J Exp Pathol* 92, 158-67
 74. Miner JH (2011): Glomerular basement membrane composition and the filtration barrier. *Pediatr Nephrol* 26, 1413-7
 75. Miner JH, Li C, Mudd JL, Go G, Sutherland AE (2004): Compositional and structural requirements for laminin and basement membranes during mouse embryo implantation and gastrulation. *Development* 131, 2247-56
 76. Minghetti PP, Norman AW (1988): 1,25(OH)₂-vitamin D₃ receptors: gene regulation and genetic circuitry. *FASEB J* 2, 3043-53
 77. Mothes H, Heidet L, Arrondel C, Richter KK, Thiele M, Patzer L, Sado Y, Gubler MC, Antignac C, Scheele J (2002): Alport syndrome associated with diffuse leiomyomatosis: COL4A5-COL4A6 deletion associated with a mild form of Alport nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 17, 70-4
 78. Myllyharju J, Kivirikko KI (2004): Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet* 20, 33-43
 79. Navar LG, Nishiyama A (2004): Why are angiotensin concentrations so high in the kidney? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 13, 107-15
 80. Nishiyama A, Seth DM, Navar LG (2002): Renal interstitial fluid angiotensin I and angiotensin II concentrations during local angiotensin-converting enzyme inhibition. *J Am Soc Nephrol* 13, 2207-12

81. Nuhn P (2009): [Vitamin D - a Prohormone. Vitamin D and hyperparathyroidism]. *Pharm Unserer Zeit* 38, 136-9
82. Pirson Y (1999): Making the diagnosis of Alport's syndrome. *Kidney Int* 56, 760-75
83. Poschl E, Schlotzer-Schrehardt U, Brachvogel B, Saito K, Ninomiya Y, Mayer U (2004): Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Development* 131, 1619-28
84. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R: *Biochemie*. Thieme Verlag, Stuttgart 2008.
85. Remuzzi G, Bertani T (1998): Pathophysiology of progressive nephropathies. *N Engl J Med* 339, 1448-56
86. Remuzzi A, Perico N, Sangalli F, Vendramin G, Moriggi M, Ruggenenti P, Remuzzi G (1999): ACE inhibition and ANG II receptor blockade improve glomerular size-selectivity in IgA nephropathy. *Am J Physiol* 276, F457-66
87. Remuzzi G, Benigni A, Remuzzi A (2006): Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. *J Clin Invest* 116, 288-96
88. Risler T, Kühn KW. *Facharzt Nephrologie*. Elsevier, Tübingen/Karlsruhe 2008, 725-741.
89. Rodriguez-Vita J, Sanchez-Lopez E, Esteban V, Ruperez M, Egido J, Ruiz-Ortega M (2005): Angiotensin II activates the Smad pathway in vascular smooth muscle cells by a transforming growth factor-beta-independent mechanism. *Circulation* 111, 2509-17
90. Rubel D, Stock J, Ciner A, Hiller H, Girgert R, Muller GA, Gross O (2013): Antifibrotic, nephroprotective effects of Paricalcitol versus Calcitriol on top of ACE-inhibitor therapy in the COL4A3 knockout mouse model for progressive renal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant*
91. Ruster C, Wolf G (2006): Renin-angiotensin-aldosterone system and progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol* 17, 2985-91
92. Ryu DH, Rando RR (2001): Aminoglycoside binding to human and bacterial A-Site rRNA decoding region constructs. *Bioorg Med Chem* 9, 2601-8
93. Santibanez JF, Quintanilla M, Bernabeu C (2011): TGF-beta/TGF-beta receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* 121, 233-51
94. Santos PC, Krieger JE, Pereira AC (2012): Renin-angiotensin system, hypertension, and chronic kidney disease: pharmacogenetic implications. *J Pharmacol Sci* 120, 77-88

95. Schwarz U, Amann K, Orth SR, Simonaviciene A, Wessels S, Ritz E (1998): Effect of 1,25 (OH)₂ vitamin D₃ on glomerulosclerosis in subtotally nephrectomized rats. *Kidney Int* 53, 1696-705
96. Shoben AB, Rudser KD, de Boer IH, Young B, Kestenbaum B (2008): Association of oral calcitriol with improved survival in nondialyzed CKD. *J Am Soc Nephrol* 19, 1613-9
97. Smyth N, Vatansever HS, Murray P, Meyer M, Frie C, Paulsson M, Edgar D (1999): Absence of basement membranes after targeting the LAMC1 gene results in embryonic lethality due to failure of endoderm differentiation. *J Cell Biol* 144, 151-60
98. Speckmann EJ, Hescheler J, König R. Physiologie. 5. Auflage; Urban & Fischer, München 2005.
99. Strutz F, Muller GA (1999): Interstitial pathomechanisms underlying progressive tubulointerstitial damage. *Kidney Blood Press Res* 22, 71-80
100. Sun J, Kong J, Duan Y, Szeto FL, Liao A, Madara JL, Li YC (2006): Increased NF-kappaB activity in fibroblasts lacking the vitamin D receptor. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291, E315-22
101. Szeto CC, Chow KM, Kwan BC, Chung KY, Leung CB, Li PK (2008): Oral calcitriol for the treatment of persistent proteinuria in immunoglobulin A nephropathy: an uncontrolled trial. *Am J Kidney Dis* 51, 724-31
102. Taal MW, Brenner BM (2006): Predicting initiation and progression of chronic kidney disease: Developing renal risk scores. *Kidney Int* 70, 1694-705
103. Talke H, Schubert GE (1965): [Enzymatic Urea Determination in the Blood and Serum in the Warburg Optical Test]. *Klin Wochenschr* 43, 174-5
104. Tan X, Li Y, Liu Y (2006): Paricalcitol attenuates renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 17, 3382-93
105. Tan X, Wen X, Liu Y (2008): Paricalcitol inhibits renal inflammation by promoting vitamin D receptor-mediated sequestration of NF-kappaB signaling. *J Am Soc Nephrol* 19, 1741-52
106. Teng M, Wolf M, Lowrie E, Ofsthun N, Lazarus JM, Thadhani R (2003): Survival of patients undergoing hemodialysis with paricalcitol or calcitriol therapy. *N Engl J Med* 349, 446-56
107. 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. *J Am Soc Nephrol* 16, 1115-25
108. Van Agtmael T, Bruckner-Tuderman L (2010): Basement membranes and human disease. *Cell Tissue Res* 339, 167-88

109. Wiese RJ, Uhland-Smith A, Ross TK, Prahl JM, DeLuca HF (1992): Up-regulation of the vitamin D receptor in response to 1,25-dihydroxyvitamin D₃ results from ligand-induced stabilization. *J Biol Chem* 267, 20082-6
110. Wolf G, Butzmann U, Wenzel UO (2003): The renin-angiotensin system and progression of renal disease: from hemodynamics to cell biology. *Nephron Physiol* 93, P3-13
111. Wolf M, Shah A, Gutierrez O, Ankers E, Monroy M, Tamez H, Steele D, Chang Y, Camargo CA, Jr., Tonelli M, et al. (2007): Vitamin D levels and early mortality among incident hemodialysis patients. *Kidney Int* 72, 1004-13
112. Wynn TA (2008): Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 214, 199-210
113. Yuan W, Pan W, Kong J, Zheng W, Szeto FL, Wong KE, Cohen R, Klopot A, Zhang Z, Li YC (2007): 1,25-dihydroxyvitamin D₃ suppresses renin gene transcription by blocking the activity of the cyclic AMP response element in the renin gene promoter. *J Biol Chem* 282, 29821-30
114. Zehnder D, Quinkler M, Eardley KS, Bland R, Lepenies J, Hughes SV, Raymond NT, Howie AJ, Cockwell P, Stewart PM, et al. (2008): Reduction of the vitamin D hormonal system in kidney disease is associated with increased renal inflammation. *Kidney Int* 74, 1343-53
115. Zeisberg M, Neilson EG (2010): Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 21, 1819-34
116. Zeisberg M, Kalluri R (2013): Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 1. Common and organ-specific mechanisms associated with tissue fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 304, C216-25
117. Zhang Z, Zhang Y, Ning G, Deb DK, Kong J, Li YC (2008): Combination therapy with AT1 blocker and vitamin D analog markedly ameliorates diabetic nephropathy: blockade of compensatory renin increase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 15896-901
118. Zhang Y, Kong J, Deb DK, Chang A, Li YC (2010): Vitamin D receptor attenuates renal fibrosis by suppressing the renin-angiotensin system. *J Am Soc Nephrol* 21, 966-73
119. Zhang Y, Leung DY, Richers BN, Liu Y, Remigio LK, Riches DW, Goleva E (2012): Vitamin D inhibits monocyte/macrophage proinflammatory cytokine production by targeting MAPK phosphatase-1. *J Immunol* 188, 2127-35

Danksagung

Mein besonderer Dank geht an meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. Oliver Gross für die Überlassung dieses Themas, für seine ständige Ansprechbarkeit und die Unterstützung in allen Phasen.

Herrn PD Dr. rer. nat. Rainer Girgert danke ich für die Unterstützung bei der Entstehung dieser Dissertation.

Weiterhin bedanken möchte ich mich bei Andrea Bernhardt, Christina Stanischa und den MTA's des nephrologischen Labors.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an Diana Rubel, die mir von Anfang an mit Rat und Tat unter die Arme gegriffen hat und mich in die Arbeit mit den Mäusen eingeführt hat. Vielen Dank für die Unterstützung bei der Auswertung der Ergebnisse sowie für die liebevolle Einarbeitung und die große Geduld.

Curriculum vitae

Mein Name ist Ayse Ciner. Ich wohne in der Schellingstr. 107 in 80798 München. Geboren wurde ich am 06. Mai 1982 in Hildesheim. Nach meiner Schulzeit an der Realschule Hohenhameln absolvierte ich eine Ausbildung zur Medizinisch technischen Assistentin an der Berufsfachschule DR Heinemann in Braunschweig. Meine Ausbildung schloss ich regulär nach drei Jahren erfolgreich ab.

Im Anschluss an meine Ausbildung arbeitete ich zunächst im Klinikum Wolfsburg in der Abteilung für klinische Chemie. Kurze Zeit später beschloss ich einen Wechsel in das Klinikum Braunschweig, wo ich von 01/2002 bis 07/2003 unter anderem auch in der Mikrobiologie als MTA tätig war. 2003 wechselte ich an die Medizinische Hochschule Hannover und begann, in der Abteilung Gastroenterologie und Hepatologie in der Forschung zu arbeiten. Insgesamt war ich 4,5 Jahre an der MHH beschäftigt.

Während dieser Zeit beschloss ich über den zweiten Bildungsweg mein Abitur nachzuholen. Im Juli 2005 absolvierte ich erfolgreich mein Abitur mit der Gesamtnote „1,8“.

Im Oktober 2007 begann ich dann das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität zu Göttingen. Am 1. November 2013 wurde mir die Approbation als Ärztin erteilt.

Seit Januar 2014 bin ich der Abteilung für Nieren-, Hochdruck- und Rheumkrankheiten im Klinikum München-Schwabing im Rahmen meiner Facharztweiterbildung tätig.