

Aus der Klinik für Nephrologie und Rheumatologie
(Prof. Dr. med. M. Zeisberg)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Auswirkung von ACE-Hemmern auf die
Nierenfunktion bei hereditären
Nierenerkrankungen wie dem Alport-
Syndrom im Mausmodell**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Markus Konstantin Brüggemann

aus

Kassel

Göttingen 2021

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in: Prof. Dr. med. O. Gross

Ko-Betreuer/in: PD Dr. rer. nat. W. Krick

Prüfungskommission

Referent/in: Prof. Dr. med. O. Gross

Ko-Referent/in: Prof. Dr. med. F. Alves

Promotor-Vertreterin: Prof. Dr. med. M. Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 04.05.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Auswirkung von ACE-Hemmern auf die Nierenfunktion bei hereditären Nierenerkrankungen wie dem Alport-Syndrom im Mausmodell" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung	1
1.1 Das Alport-Syndrom.....	1
1.1.1 Aufbau und Funktion des glomerulären Filters	1
1.1.2 Molekulargenetik des Alport-Syndroms	2
1.1.3 Pathogenese des Alport-Syndroms.....	4
1.1.4 Prognose und Therapie des Alport-Syndroms	5
1.2 Podozyten, die Schlitzmembran und ihre Bestandteile.....	6
1.3 Aufbau und Zielsetzung des Versuchs	9
1.3.1 Versuchsaufbau.....	9
1.3.2 Eignung des Tiermodells und Übertragbarkeit auf den Menschen.....	10
1.3.3 Zielsetzung	11
2 Material und Methoden	13
2.1 Versuchstiere.....	13
2.2 Genotypisierung	14
2.2.1 DNA-Isolation aus Schwanzbiopsien	14
2.2.2 Polymerasekettenreaktion	15
2.2.3 Agarosegelelektrophorese	16
2.3 Operation, Therapie und Präparation der Versuchstiere.....	19
2.3.1 Uninephrektomie und ACEi-Therapie	19
2.3.2 Präparation	20
2.4 Bestimmung der Proteinurie.....	23
2.4.1 Probengewinnung.....	23
2.4.2 Chloroform-Methanol-Fällung.....	23
2.4.3 Polyacrylamidgelelektrophorese	24
2.4.4 Auswertung der Proteingele.....	26
2.5 Immunfluoreszenz	28
2.5.1 Theoretischer Hintergrund	28
2.5.2 Paraffineinbettung.....	29
2.5.3 Anfertigung der Schnitte	29
2.5.4 Färbung.....	30
2.5.5 Fluoreszenzmikroskopie	33
2.5.6 Scoring.....	34
2.6 Harnstoff- und Cholesterinmessung im Serum.....	39
2.7 Statistische Analyse	39
2.8 Geräte.....	41

3	Ergebnisse	44
3.1	Proteinurie	45
3.1.1	Geschlechtervergleich.....	46
3.1.2	Genotypen- und Therapievergleich.....	53
3.2	Serumharnstoff	61
3.3	Serumcholesterin	63
3.4	Immunfluoreszenz	64
3.4.1	Tubulointerstitielle Fibrose.....	66
3.4.2	Glomeruläre Fibrose.....	69
3.4.3	Tubulointerstitielle Matrixakkumulation	72
3.4.4	Glomeruläre Matrixakkumulation.....	75
3.5	Körpergewicht	78
4	Diskussion	79
4.1	Einfluss der Therapie auf die Nierenfunktion in Abhängigkeit vom Genotyp.....	79
4.1.1	Proteinurie	79
4.1.2	Fibrose und Matrixakkumulation.....	82
4.1.3	Harnstoff.....	86
4.1.4	Cholesterin.....	87
4.1.5	Einfluss der R140Q-Variante auf die Nierenfunktion bei heterozygoten Trägern einer Alport-Variante.....	88
4.2	Einfluss des Geschlechts auf die Proteinurie.....	89
4.3	Kritische Auseinandersetzung mit dem Versuchsaufbau und Beleuchtung von Limitationen des Experiments	90
4.3.1	Gruppengröße und Alter der Versuchstiere	90
4.3.2	Mögliche Fehlerquellen bei der Untersuchung der Proteinurie.....	91
4.3.3	Mögliche Fehlerquellen bei der Immunfluoreszenzmikroskopie	93
4.4	Ausblick.....	94
4.4.1	Wissenschaftlicher Ausblick	94
4.4.2	Klinischer Ausblick	96
5	Zusammenfassung	98
6	Literaturverzeichnis	100

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>Col4a3</i> -Gelelektrophorese	17
Abbildung 2: <i>Nphs2</i> -Gelelektrophorese	18
Abbildung 3: Beispielgel für die SDS-PAGE.....	27
Abbildung 4: Relative Höhe der Albuminurie (Vergleich zu Alport, Weibchen)	46
Abbildung 5: Relative Höhe der Albuminurie in Abhängigkeit von dem Geschlecht im Alter von 60 Tagen.....	47
Abbildung 6: Relative Höhe der Albuminurie in Abhängigkeit von dem Geschlecht im Alter von 90 Tagen.....	48
Abbildung 7: Relative Höhe der Albuminurie in Abhängigkeit von dem Geschlecht im Alter von 120 Tagen.....	48
Abbildung 8: Relative Höhe der Albuminurie in Abhängigkeit von dem Geschlecht im Alter von 150 Tagen (Sham)	49
Abbildung 9: Relative Höhe der Albuminurie in Abhängigkeit von dem Geschlecht im Alter von 150 Tagen (Neph).....	50
Abbildung 10: Relative Höhe der Albuminurie in Abhängigkeit von dem Geschlecht im Alter von 150 Tagen (ACEi).....	50
Abbildung 11: Relative Höhe der Albuminurie in Abhängigkeit von dem Geschlecht im Alter von 180 Tagen (Sham)	51
Abbildung 12: Relative Höhe der Albuminurie in Abhängigkeit von dem Geschlecht im Alter von 180 Tagen (Neph).....	52
Abbildung 13: Relative Höhe der Albuminurie in Abhängigkeit von dem Geschlecht im Alter von 180 Tagen (ACEi).....	52
Abbildung 14: Relative Höhe der Albuminurie in Abhängigkeit vom Genotyp im Alter von 60 Tagen	54
Abbildung 15: Relative Höhe der Albuminurie in Abhängigkeit vom Genotyp im Alter von 90 Tagen	55
Abbildung 16: Relative Höhe der Albuminurie in Abhängigkeit vom Genotyp im Alter von 120 Tagen.....	56
Abbildung 17: Relative Höhe der Albuminurie in Abhängigkeit vom Genotyp und der Therapie im Alter von 150 Tagen	57
Abbildung 18: Relative Höhe der Albuminurie in Abhängigkeit vom Genotyp und der Therapie im Alter von 180 Tagen	59
Abbildung 19: Relative Höhe der Albuminurie im Zeitverlauf (ACEi-Gruppe)	61
Abbildung 20: Serumharnstoff in Abhängigkeit von der Therapie und dem Genotyp	62
Abbildung 21: Serumcholesterin in Abhängigkeit von der Therapie und dem Genotyp	63
Abbildung 22: Ergebnisse der Immunfluoreszenz (Vergleich zu Alport).....	65
Abbildung 23: Tubulointerstitielle Fibrose in Abhängigkeit vom Genotyp	67
Abbildung 24: Tubulointerstitielle Fibrose in Abhängigkeit von der Therapie.....	68
Abbildung 25: Glomeruläre Fibrose in Abhängigkeit vom Genotyp	70
Abbildung 26: Glomeruläre Fibrose in Abhängigkeit von der Therapie.....	71
Abbildung 27: Tubulointerstitielle Matrixakkumulation in Abhängigkeit vom Genotyp.....	73
Abbildung 28: Tubulointerstitielle Matrixakkumulation in Abhängigkeit von der Therapie	74
Abbildung 29: Glomeruläre Matrixakkumulation in Abhängigkeit vom Genotyp.....	76
Abbildung 30: Glomeruläre Matrixakkumulation in Abhängigkeit von der Therapie	77

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Materialien für die DNA-Isolation.....	14
Tabelle 2: Materialien für die Polymerasekettenreaktion	15
Tabelle 3: Materialien für die Agarosegelelektrophorese	18
Tabelle 4: Materialien für Analgesie und ACEi-Therapie	20
Tabelle 5: Materialien für die Präparation der Versuchstiere	21
Tabelle 6: Materialien für die Urinprobengewinnung.....	23
Tabelle 7: Materialien für die Chloroform-Methanol-Fällung.....	24
Tabelle 8: Materialien für die Polyacrylamidgelelektrophorese	25
Tabelle 9: Materialien für die Proteingelauwertung.....	28
Tabelle 10: Materialien für die Anfertigung der Paraffinschnitte	30
Tabelle 11: Materialien für die Immunfluoreszenz-Färbung.....	31
Tabelle 12: Materialien für die Fluoreszenzmikroskopie	34
Tabelle 13: Einteilung der tubulointerstitiellen Fibrose	35
Tabelle 14: Einteilung der glomerulären Fibrose	36
Tabelle 15: Einteilung der tubulointerstitiellen Matrixakkumulation.....	37
Tabelle 16: Einteilung der glomerulären Matrixakkumulation.....	38
Tabelle 17: Materialien für die statistische Analyse.....	40
Tabelle 18: Geräte.....	41

Abkürzungsverzeichnis

ACEi	<i>Angiotensin-converting enzyme inhibitor</i> , Inhibitor des angiotensin-konvertierenden Enzyms
AS	Alport-Syndrom
BFH	Benigne familiäre Hämaturie
BSA	Bovines Serumalbumin
BUN	<i>Blood urea nitrogen</i> , Blut-Harnstoff-Stickstoff
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GFB	Glomeruläre Filtrationsbarriere
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GBM	Glomeruläre Basalmembran
IF	Immunfluoreszenz
n. a.	Nicht angegeben, nicht abrufbar beziehungsweise nicht auswertbar
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SM	Schlitzmembran
SRNS	Steroidresistentes nephrotisches Syndrom
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBMN	<i>Thin basement membrane nephropathy</i> , Nephropathie der dünnen Basalmembran
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> , trisgepufferte Salzlösung
TGF- β 1	<i>Transforming growth factor-β1</i> , transformierender Wachstumsfaktor- β 1

1 Einleitung

1.1 Das Alport-Syndrom

Das Alport-Syndrom (AS) ist eine hereditäre Nierenerkrankung, die unter anderem mit Hämaturie, Proteinurie und Innenohrschwerhörigkeit einhergeht (Alport 1927). Zu den weiteren Manifestationen zählen asymptotische Makulopathie, *lenticonus anterior* sowie ösophageale Leiomyomatose (Jais et al. 2003). Ursächlich sind Mutationen der α 3-, α 4- oder α 5-Ketten von Kollagen IV (Gross und Weber 2005). Die homo-, hemi- oder *compound* heterozygote Trägerschaft solcher Mutationen führt zu einer frühzeitigen Einschränkung der Nierenfunktion und zu Dialysepflichtigkeit ab dem 20. Lebensjahr (Gross und Weber 2005). Die renale Manifestation ist dementsprechend für betroffene Patienten von übergeordneter Bedeutung hinsichtlich der Prognose ihrer Erkrankung.

1.1.1 Aufbau und Funktion des glomerulären Filters

Die glomeruläre Filtrationsbarriere (GFB) setzt sich aus dem fenestrierten Kapillarendothel, der glomerulären Basalmembran (GBM) und der Schlitzmembran (SM), welche sich zwischen den Fußfortsätzen der Podozyten aufspannt, zusammen. Sie agiert als primärer Filter in der Niere und stellt ein Hindernis für Blutzellen sowie Albumin und Makromoleküle, welche größer als Albumin sind, dar. Kleinere Moleküle werden hingegen weitgehend ungehindert filtriert (Tryggvason und Wartiovaara 2005). Auf diese Weise werden von den etwa 1.000.000 Glomeruli jeden Tag etwa 180 l Primärfiltrat generiert. Im Tubulussystem der Niere wird dieses Primärfiltrat verändert und konzentriert, sodass nur 1-1,5 l Urin pro Tag ausgeschieden werden.

Das fenestrierte Kapillarendothel stellt den ersten Teil der GFB dar. Die Glykokalyx, welche die Fenestrierungen auskleidet, bildet bereits einen primären Filter (Tryggvason und Wartiovaara 2005). Nachdem das Filtrat das Endothel passiert hat, übernimmt die GBM den nächsten Filtrationsschritt.

Die glomeruläre Basalmembran besteht hauptsächlich aus Typ-IV-Kollagen, Laminin, Nidogen, Agrin, Perlecan und sulfatierten Proteoglykanen (Miner 1999). Die α -Ketten des Typ-IV-Kollagens bilden Heterotrimere, die auch als Protomere bezeichnet werden (Miner 2011). Diese Protomere setzen sich in der fetalen GBM aus zwei α 1-Ketten und einer α 2-Kette zusammen. Dieses α 1 α 1 α 2-Kollagen-Netzwerk wird im Laufe der Entwicklung durch ein adultes α 3 α 4 α 5-Kollagen-Netzwerk ersetzt, das unter anderem aufgrund seiner stärkeren Vernetzung durch Disulfidbrücken resistenter gegenüber biomechanischem Stress und Endoproteolyse ist (Kalluri et al. 1997; Gross und Weber 2005; Meehan et al. 2009). Insgesamt gibt es sechs verschiedene Kollagen-IV- α -Ketten, wobei diese insgesamt

drei verschiedene Protomere bilden können: das $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ -Protomer der fetalen GBM, das $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ -Protomer der adulten GBM und das $\alpha 5\alpha 5\alpha 6$ -Protomer, das in der GBM keine bedeutende Rolle spielt (Hudson et al. 1993). Typ-IV-Kollagen besitzt neben den nicht kollagenen N- und C-terminalen Domänen eine lange zentrale Kollagen-Domäne, welche aus einer häufig unterbrochenen Abfolge von Gly-X-Y-Aminosäure-Triplets besteht (Gross und Weber 2005; Miner 2011). Die häufigen Unterbrechungen dieser Triplets gewährleisten eine ausreichende Flexibilität des Kollagen-IV-Netzwerks (Miner 2011).

Für das glomeruläre Primärfiltrat stellt die Schlitzmembran zwischen den Fußfortsätzen der Podozyten die letzte Barriere dar. Sie hat eine besonders wichtige Barrierefunktion für Albumin und andere größere Makromoleküle (Tryggvason und Wartiovaara 2005). Der molekulare Aufbau dieses hochspezialisierten Proteinkomplexes soll in Kapitel 1.2 näher beleuchtet werden.

1.1.2 Molekulargenetik des Alport-Syndroms

Das Alport-Syndrom wird durch Mutationen in den Genen der α -Ketten des $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ -Protomers verursacht (Gross und Weber 2005). Das Fehlen bereits einer der drei α -Ketten führt dazu, dass das gesamte Protomer nicht mehr in der GBM nachweisbar ist (Kalluri et al. 1997). Während die Gene der $\alpha 3$ - und $\alpha 4$ -Kette (*COL4A3* und *COL4A4*) auf Chromosom 2 liegen (Kamagata et al. 1992), befindet sich das Gen der $\alpha 5$ -Kette (*COL4A5*) auf dem X-Chromosom (Hostikka et al. 1990). Daraus ergibt sich, dass das AS sowohl X-chromosomal als auch autosomal vererbt werden kann. In etwa 80 % der Fälle sind X-chromosomal vererbte *COL4A5*-Mutationen ursächlich für das AS, während die autosomal vererbten *COL4A3*- und *COL4A4*-Mutationen gemeinsam nur für etwa 20 % der Fälle verantwortlich sind (Kashtan et al. 2013).

Homozygote Träger von *COL4A3*- und *COL4A4*-Mutationen sowie hemizygoten Träger der *COL4A5*-Mutationen erkranken am Vollbild des Alport-Syndroms mit Nierenversagen und Dialysepflichtigkeit im zweiten bis dritten Lebensjahrzent (Gross und Weber 2005). Heterozygote Träger einer Alport-Variante in einem der drei Gene erkranken weniger fulminant. Sie weisen eine ausgedünnte glomeruläre Basalmembran auf, was auch als TBMN (*thin basement membrane nephropathy*, Nephropathie der dünnen Basalmembran) bezeichnet wird (Savige et al. 2013), und haben ein Lebenszeitrisiko für das Fortschreiten ihrer Nierenerkrankung bis zur Dialysepflichtigkeit von etwa 20 % (Stock et al. 2017). Einen weiteren Begriff für den heterozygoten Trägerstatus einer Alport-Variante bezeichnet die benigne familiäre Hämaturie (BFH). Aufgrund des hohen Risikos für eine fortschreitende Nierenerkrankung soll nach aktuellem Kenntnisstand im klinischen Alltag sowohl auf die Diagnose BFH, da diese dazu verleitet die Erkrankung als ungefährlich einzuschätzen, als auch auf die Bezeichnung TBMN, weil diese keine klinisch hilfreiche Diagnose sondern lediglich eine Läsionsbeschreibung darstellt, verzichtet werden (Kashtan et al. 2018).

Man geht davon aus, dass etwa 5,2-9,2 % der gesunden Bevölkerung eine elektronenmikroskopisch sichtbar ausgedünnte GBM haben (Dische et al. 1990). Patienten mit diagnostizierter TBMN machen dagegen nur etwa 1 % der Gesamtbevölkerung aus (Savige et al. 2003), da nicht alle Menschen mit dünner Basalmembran auch einen entsprechenden klinischen Phänotyp entwickeln. Obgleich es andere molekulare Ursachen für eine dünne Basalmembran gibt, so ist die mit Abstand häufigste die heterozygote Trägerschaft einer Alport-Variante (Savige et al. 2013). Die Penetranz einer heterozygoten *COL4*-Mutation ist allerdings mit 5-10 % unvollständig (Deltas et al. 2013). Auch die Expressivität unterscheidet sich stark, sodass das Krankheitsspektrum bei heterozygoten Trägern einer Alport-Variante von völliger Gesundheit über isolierte Mikrohämaturie bis zum terminalen Nierenversagen reicht (Deltas et al. 2013).

Die breit gefächerte Expressivität der Erkrankung kann teilweise durch verschiedenartige Mutationen in den *COL4*-Genen erklärt werden (Gross et al. 2002), welche sich unterschiedlich auf das Genprodukt auswirken. Während dieser Zusammenhang bei homo- oder hemizygoten Trägern einer Alport-Variante stichhaltig ist (Gross et al. 2002), konnte eine eindeutige Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei heterozygoten Trägern einer Alport-Variante bisher nicht belegt werden (Jais et al. 2003; Deltas et al. 2013; Yamamura et al. 2017). Die fehlende Erklärbarkeit selbst intrafamiliärer Variabilität bei Patienten mit identischen *COL4*-Mutationen legt nahe, dass neben unterschiedlichen Mutationsarten auch andere Faktoren eine Rolle spielen müssen (Jais et al. 2003; Deltas et al. 2013). Als mögliche *modifier* der Erkrankung bei heterozygoter Trägerschaft werden verschiedene Bestandteile der GBM und der SM diskutiert. Daneben ist es auch wahrscheinlich, dass Lebensstilfaktoren, wie beispielsweise die tägliche Salzaufnahme und der Raucherstatus, das Fortschreiten der Erkrankung beeinflussen können (Kashtan et al. 2018).

Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass Veränderungen der Laminin- β 2-Kette, welches ein Protein der GBM ist (Miner und Sanes 1996), im Mausmodell zu einem schnelleren Fortschreiten der Nierenerkrankung bei Tieren mit heterozygoter Trägerschaft einer *Col4a5*-Alport-Variante führen, während eine Veränderung nur des Laminins bei gesunden Versuchstieren keinen Krankheitswert hat (Funk et al. 2018). Als weitere genetische *modifier* werden Veränderungen von Podocin, welches Teil der SM ist (Mulukala et al. 2016), gehandelt (Machuca et al. 2009; Voskarides et al. 2012). Podocin wird durch das *NPHS2*-Gen kodiert, welches auf Chromosom 1 liegt (Boute et al. 2000). Die R229Q-Podocin-Variante ist bereits als Ursache für verstärkte Proteinurie in einigen Patienten mit TBMN identifiziert (Tonna et al. 2008b; Voskarides et al. 2012). Da diese Variante allerdings nur bei etwa 10 % dieser Patienten nachgewiesen werden kann, ist es sehr wahrscheinlich, dass weitere *modifier* existieren (Voskarides et al. 2012). Ein weiterer identifizierter *modifier* ist Nephrin (Frese et al. 2019), welches als Bestandteil der Schlitzmembran Bindungen mit Podocin eingeht (Schwarz et al. 2001). Um die Prognose betroffener Patienten anhand genetischer Befunde genauer vorhersagen zu können, ist es von großem Interesse, weitere solcher *modifier* zu identifizieren.

1.1.3 Pathogenese des Alport-Syndroms

Da das $\alpha3\alpha4\alpha5$ -Protomer ausschließlich von den Podozyten exprimiert wird, handelt es sich beim AS um eine Erkrankung der Podozyten (Abrahamson et al. 2009). Wie bereits dargestellt, findet in gesunden Individuen im Laufe der Entwicklung der GBM ein Wechsel von einem $\alpha1\alpha1\alpha2$ -Kollagen-Netzwerk auf das adulte $\alpha3\alpha4\alpha5$ -Kollagen-Netzwerk statt (Kalluri et al. 1997; Abrahamson et al. 2009), welches eine ausreichende Resistenz der GBM gegen Endoproteolyse und biomechanischen Stress gewährleistet (Kalluri et al. 1997; Meehan et al. 2009). Bei homo- oder hemizygot erkrankten Patienten, welchen folglich das gesunde Allel für eine der drei Kollagen-IV-Ketten der adulten GBM fehlt, findet dieser Wechsel nicht statt. Stattdessen bleibt das $\alpha1\alpha1\alpha2$ -Netzwerk dauerhaft erhalten (Miner und Sanes 1996), da das vollständige Fehlen auch nur einer Kette des $\alpha3\alpha4\alpha5$ -Protomers dazu führt, dass das gesamte Protomer und damit das Netzwerk nicht exprimiert werden kann (Kalluri et al. 1997). Diese unreife GBM bildet im Krankheitsverlauf eine elektronenmikroskopisch sichtbare Aufsplitterung aus, die typisch für das Alport-Syndrom ist (Gross und Weber 2005). Obwohl heterozygote Träger einer Alport-Variante über mindestens ein gesundes Allel aller drei Kollagen-Ketten verfügen, ist auch bei diesen Patienten der reguläre Aufbau der GBM gestört, was zur Entwicklung von Ausdünnungen und seltener Verdickungen der Basalmembran führt (Jais et al. 2003), die Hämaturie und Proteinurie nach sich ziehen können (Savige et al. 2003). Insgesamt erkranken diese Patienten allerdings deutlich später und milder als homo- oder hemizygot Träger (Jais et al. 2003).

Basalmembranen und ihre nachgeschalteten Signalwege sind von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung, Erkrankung, aber auch Reparatur von verschiedensten Geweben (Kruegel und Miosge 2010). Über Rezeptoren, die mit Komponenten der GBM verbunden sind, können Podozyten das fehlerhafte Kollagen-Netzwerk von Alport-Patienten erkennen, woraufhin ein Prozess in Gang gesetzt wird, welcher das Ziel hat, das fehlerhafte Netzwerk zu reparieren (Gross und Weber 2005). Aufgrund der Mutationen in den entsprechenden Genen verläuft dieser Reparaturvorgang frustan, wodurch eine inflammatorische Signalkaskade in Gang gesetzt wird, welche unter anderem über den *transforming growth factor- β 1* (TGF- β 1, transformierender Wachstumsfaktor- β 1), inflammatorische Chemokine sowie Matrix-Metalloproteasen vermittelt wird (Cosgrove et al. 2000; Gross und Weber 2005). Diese TGF- β 1-Erhöhung kann auch bei heterozygoter Trägerschaft nachgewiesen werden (Beirowski et al. 2006), was als Hinweis darauf zu verstehen ist, dass auch bei diesen häufig gesund erscheinenden Patienten ein inflammatorischer Prozess im Gange ist. TGF- β 1 und seine nachgeschalteten Signalwege spielen eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung von Nierenfibrose (Loboda et al. 2016). Beschrieben ist außerdem, dass Angiotensin-II ebenfalls über TGF- β 1 zu fibrotischen Veränderungen der Niere führt, welche durch die Gabe eines ACEi (*angiotensin-converting enzyme inhibitor*, Inhibitor des angiotensin-konvertierenden Enzyms) abgemildert werden können (Mezzano et al. 2001). Im Rahmen von glomerulärer Proteinurie, wie sie beim AS

vorliegt (Alport 1927), kommt es außerdem zur Translokation von TGF- β 1 in das glomeruläre Ultrafiltrat, was zu einer tubulointerstitiellen Fibrosierung führt (Wang et al. 2000). Des Weiteren exprimieren Podozyten unter biomechanischem Stress Matrix-Metalloproteasen sowie Interleukin-6 (Meehan et al. 2009), wodurch eine weitere endoproteolytische und inflammatorische Schädigung der angreifbaren GBM vermittelt wird.

Über die genannten Effekte kommt es zu Nierenfibrose und fortschreitendem Nierenversagen bis hin zur Dialysepflichtigkeit. Das Nierenversagen ist der limitierende Faktor bezüglich der Lebenserwartung und Lebensqualität bei Patienten mit AS. Dadurch begründet sich der Fokus dieser Dissertation auf die renale Manifestation, wemgleich extrarenale Manifestationen bei der Pathogenese des AS ebenfalls eine Rolle spielen.

1.1.4 Prognose und Therapie des Alport-Syndroms

Die Prognose des AS ist ernst. Homo- und hemizygot erkrankte Menschen entwickeln bereits mit 20 bis 30 Jahren terminales Nierenversagen (Gross et al. 2002; Gross und Weber 2005). Heterozygote Träger einer Alport-Variante haben eine deutlich bessere Prognose. Die Trägerschaft führt bei etwa 20 % der Betroffenen im Laufe ihres Lebens zu terminalem Nierenversagen (Voskarides et al. 2007; Stock et al. 2017; Kashtan et al. 2018). Anhand dieses Risikos wird deutlich, dass es sich bei der heterozygoten Trägerschaft einer Alport-Variante, welche zu TBMN und Nierenversagen führt, nicht um einen benignen Zustand handelt, wie es noch vor einiger Zeit mit dem Begriff der BFH suggeriert wurde (Kashtan et al. 2018). Eine präzise Vorhersage des Risikos für Nierenversagen heterozygoter Träger anhand einer Mutationsanalyse in den *COL4*-Genen ist nicht möglich (Jais et al. 2003; Yamamura et al. 2017), was die Identifikation von genetischen *modifern* interessant macht.

Das Alport-Syndrom ist nach aktuellem Wissensstand nicht heilbar. Kausale Therapiemöglichkeiten, wie beispielsweise eine Stammzelltherapie, sind noch nicht so weit fortgeschritten, um erfolgreich an Patienten eingesetzt werden zu können (Gross et al. 2014). Aus diesem Grund stehen die Nephroprotektion und die Verlangsamung des Fortschreitens der Nierenerkrankung im Vordergrund. Es wird empfohlen, dass homo- und hemizygot Erkrankte ab Diagnosestellung mit ACEi behandelt werden und auch heterozygote Träger spätestens nach dem Auftreten von Symptomen wie Proteinurie und Mikrohämaturie einer medikamentösen Nephroprotektion zugeführt werden (Savige et al. 2013). Selbst bei homo- oder hemizygoten Kindern empfiehlt es sich, bereits sehr früh mit der ACEi-Therapie zu beginnen (Gross et al. 2012), obwohl dies als *Off-label*-Therapie geschehen muss, da ACEi in Deutschland keine Zulassung für den Einsatz bei Kindern haben. Die Inhibition des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) ist Therapie der Wahl zur Nephroprotektion. Im klinischen Alltag werden insbesondere ACEi, welche zu den RAAS-Inhibitoren zählen, häufig verwendet (Stock et al. 2017). Sie bewirken bei

homo- und hemizygot Erkrankten sowie bei heterozygoten Trägern eine Verlangsamung des Fortschreitens der Nierenerkrankung (Temme et al. 2012; Savige et al. 2013; Stock et al. 2017).

Mit Eintreten des terminalen Nierenversagens wird eine Nierenersatztherapie in Form einer Dialyse oder Nierentransplantation notwendig. Der Tatsache geschuldet, dass die Wartezeit auf ein Spenderorgan in Deutschland in der Regel mehrere Jahre beträgt, entschließen sich viele Familien von homo- oder hemizygoten Alport-Patienten zur Lebendnierenspende (Gross et al. 2009). Aufgrund des häufig X-chromosomalen Erbgangs sind die Mütter erkrankter Söhne häufig heterozygote Trägerinnen einer Alport-Variante. Im klinischen Alltag sind es insbesondere diese selber heterozygot betroffenen Mütter, die einen starken Wunsch äußern, ihrem erkrankten Kind eine Niere zu spenden (Gross et al. 2009). Die hohe Spendenbereitschaft in Alport-Familien ist auch daran zu ermessen, dass Alport-Patienten mit terminalem Nierenversagen statistisch häufiger Lebendspenden erhalten als Patienten mit anderen Ursachen für Nierenversagen (Kelly et al. 2017). Da, wie bereits erläutert, auch die heterozygote Trägerschaft keinen Zustand völliger Nierengesundheit darstellt, ist die Lebendspende einer Niere eines Trägers einer Alport-Variante mit einem erhöhten Risiko für Nierenversagen sowohl für den Spender als auch für den Empfänger verbunden (Beirowski et al. 2006; Gross et al. 2009; Savige et al. 2013). Bei bereits bestehenden Symptomen des möglichen Spenders wie Proteinurie, Hypertonie oder Niereninsuffizienz wird von einer Lebendnierenspende dringend abgeraten (Jais et al. 2003). Eine nephroprotektive Behandlung mit RAAS-Blockade ist in jedem Fall sowohl bei dem Spender als auch bei dem Empfänger indiziert (Gross et al. 2009; Savige et al. 2013).

Aufgrund der fehlenden Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei heterozygoten Trägern ist auch nach Transplantation eine präzise Prognosestellung nicht möglich. Weitere Parameter, welche es erlauben die Wahrscheinlichkeit des Organversagens nach Nierenspende bereits vor der Operation vorauszusagen, sind demnach von großem klinischem Interesse. Schwerpunkt dieser Dissertation ist es, den Einfluss eines genetischen *modifiers* auf die Nierenfunktion und -struktur des im Spender verbleibenden Organs aufzudecken, um auf lange Sicht eine präzisere Prognosestellung zu ermöglichen. Die Hyperfiltration, welcher die verbleibende Niere des Spenders nach Transplantation ausgesetzt ist, wird in diesem Mausmodell durch eine Uninephrektomie simuliert. Der vermutete genetische *modifier* ist eine Variante des Schlitzmembranproteins Podocin. Neben dessen Einfluss auf die Prognose soll auch der Nutzen einer Therapie mit ACEi nach der Transplantation in Abhängigkeit vom Genotyp untersucht werden.

1.2 Podozyten, die Schlitzmembran und ihre Bestandteile

Die Podozyten bilden mit ihren Fußfortsätzen, zwischen denen sich die Schlitzmembran aufspannt, den letzten Teil der glomerulären Filterbarriere. Die Funktion der SM ist insbesondere die Filterung großer Moleküle, für solche Makromoleküle etwa ab der Größe

von Albumin stellt sie eine unüberwindbare Barriere dar (Tryggvason und Wartiovaara 2005). Die Schlitzmembran setzt sich aus verschiedenen Proteinen zusammen, welche miteinander Bindungen eingehen und die Schlitzmembran mit dem Zytoskelett der Podozyten verbinden (Boute et al. 2000; Schwarz et al. 2001). Zu den Proteinen der Schlitzmembran gehören unter anderem Nephrin und Podocin (Schwarz et al. 2001). Über Laminin-521 wird ein direkter Kontakt der SM und GBM vermittelt, diese sind so räumlich und funktionell eng verbunden (Suh und Miner 2013).

Auch beim Alport-Syndrom kann es unter anderem zur Verschmelzung der Podozytenfußfortsätze kommen (Gross et al. 2003), was mit dem Verlust der Schlitzmembranen einhergeht, wodurch sich Proteinurie bis hin zum nephrotischen Syndrom entwickeln kann. Es ist bereits bekannt, dass Varianten der Schlitzmembranbestandteile Podocin und Nephrin bei heterozygoten Trägern einer Alport-Variante zu einer durch die *COL4A*-Variante allein nicht erklärbar hohen Proteinurie führen können (Frese et al. 2019). Demnach agieren diese beiden elementaren Bestandteile der Schlitzmembran als *modifier* bei heterozygot betroffenen Alport-Patienten. Aus diesem Grund ist die Entschlüsselung der genauen Bedeutung der Einflüsse von Proteinen der SM auf den Krankheitsverlauf beim Alport-Syndrom hinsichtlich der Verbesserung der Prognosestellung erfolgversprechend.

Im besonderen Fokus dieses Experimentes steht das Schlitzmembranprotein Podocin. Es hat essentielle Bedeutung für die Aufrechterhaltung der SM und damit der Filterfunktion der Niere (Roselli et al. 2004a). Podocin ist ein Protein der Stomatin-Familie, welches ausschließlich in der Niere vorkommt und als Bestandteil der SM ausschließlich von den Podozyten exprimiert wird (Boute et al. 2000). Zu seinen Funktionen gehört insbesondere die Aufrechterhaltung von Struktur und Funktion der SM durch Bindungen mit mehreren beteiligten Proteinen (Schwarz et al. 2001; Roselli et al. 2004a; Mulukala et al. 2016). Podocin kommt auf diese Weise eine zentrale Rolle bei der Regulation der glomerulären Permeabilität insbesondere für hochmolekulare Stoffe zu (Boute et al. 2000). Des Weiteren verbindet es über seine Transmembrandomäne die SM mit dem podozytären Zytoskelett (Boute et al. 2000). Neben der Bindung anderer SM-Bestandteile wird Podocin ebenfalls als Transportprotein für einen Teil des Nephrins benötigt, welcher ohne Podocin im endoplasmatischen Retikulum verbleibt (Roselli et al. 2004a). Ein vollständiges Fehlen von Podocin führt im Mausmodell von der Geburt an zu einem schweren Phänotyp mit Verschmelzung der Podozytenfußfortsätze, nicht nachweisbarer SM, daraus resultierender massiver Albuminurie sowie schwerer mesangialer Sklerosierung (Roselli et al. 2004a). Beim Menschen können verschiedenste Veränderungen von Podocin verantwortlich für die Ausbildung eines steroidresistenten nephrotischen Syndroms (SRNS) sein (Roselli et al. 2004b; Weber et al. 2004).

Es existieren viele verschiedene Podocin-Varianten in der Bevölkerung, die mit dem SRNS in Verbindung gebracht werden. Von diesen sollen insbesondere die R138Q- und R229Q-

Variante näher beleuchtet werden. Molekular sind beide Varianten durch die Substitution von Arginin durch Glutamin an jeweils unterschiedlichen Stellen des Proteins gekennzeichnet.

Die R138Q-Substitution führt dazu, dass Podocin die Plasmamembran als seinen Bestimmungsort nicht mehr erreichen kann und mit Teilen von Nephrin im endoplasmatischen Retikulum akkumuliert, wodurch es seine Funktion in der SM nicht wahrnehmen kann, was zur Entwicklung eines autosomal-rezessiv vererbten nephrotischen Syndroms bereits im Kindesalter führt (Roselli et al. 2004b; Weber et al. 2004). Der Aminosäureaustausch bei dieser Variante befindet sich in einer Region, die unter Proteinen der Stomatin-Familie hochkonserviert ist und bei diesen funktionell hohe Relevanz besitzt (Boute et al. 2000). Es ist beschrieben, dass bereits kleine Veränderungen der Struktur von Podocin dessen Bindungsfähigkeit mit anderen Bestandteilen der Schlitzmembran einschränken und so die Aufrechterhaltung der SM massiv beeinträchtigen können (Mulukala et al. 2016). Dies gibt einen Hinweis darauf, weshalb bereits der Austausch einer Aminosäure zu einem schweren Phänotyp mit SRNS im Kindesalter führen kann. R138Q ist für etwa ein Drittel aller Fälle von SRNS, die mit Podocin-Varianten assoziiert werden, verantwortlich und gehört damit zu den häufigsten Varianten, welche bei Patienten mit SRNS nachgewiesen werden können (Boute et al. 2000; Weber et al. 2004; Lu et al. 2015). Selbst die heterozygote Trägerschaft einer R138Q-Variante birgt bereits ein fünffach erhöhtes Risiko, im Laufe des Lebens eine fokal-segmentale Glomerulosklerose (FSGS) zu entwickeln, welche häufig Ursache des nephrotischen Syndroms ist (McKenzie et al. 2007). In gesunden Kontrollen kommt diese Variante nur in etwa 0,4-0,8 % der Fälle vor, bei FSGS-Patienten ist sie hingegen deutlich häufiger (McKenzie et al. 2007). Veränderungen, die wie R138Q zur Folge haben, dass Podocin die Plasmamembran nicht mehr erreichen kann, führen zu einem schwereren Phänotyp als solche, bei denen Podocin diese Fähigkeit erhalten bleibt (Roselli et al. 2004b). Die R138Q-Variante ist demnach bereits als Veränderung beschrieben, welche für renale Erkrankungen wie SRNS verantwortlich sein kann. Ob ihr eine Funktion als *modifier* der Erkrankung bei Patienten mit Alport-Syndrom zugeschrieben werden kann, ist aktueller Gegenstand der Forschung und stellt auch eine Kernfrage dieser Dissertation dar.

Während R138Q in der gesunden Bevölkerung selten ist, lässt sich R229Q in etwa 4 % der Fälle bei gesunden Kontrollen nachweisen (McKenzie et al. 2007). Die Pathogenität dieser Variante scheint geringer als die von R138Q zu sein, da es bei an FSGS erkrankten Patienten nahezu genauso häufig nachgewiesen wurde wie in der Allgemeinbevölkerung (McKenzie et al. 2007). Während angenommen wird, dass die R229Q-Variante bei nierengesunden Personen keine oder nur eine geringe Rolle bei der Entwicklung von FSGS oder Proteinurie spielt (McKenzie et al. 2007; Tonna et al. 2008a), verdichten sich die Hinweise darauf, dass R229Q bei Patienten mit TBMN als *modifier* agiert und zu einer verstärkten Proteinurie im Vergleich zu Patienten ohne zusätzliche R229Q-Variante führt (Tonna et al. 2008b; Voskarides et al. 2012; Frese et al. 2019). In Fällen von Proteinurie,

welche nicht ausschließlich durch eine TBMN zu erklären war, konnte diese Variante allerdings nur bei etwa 10 % der Patienten nachgewiesen werden (Voskarides et al. 2012). Es ist daher anzunehmen, dass es weitere genetische *modifier* gibt, von denen die R138Q-Variante einen vielversprechenden Kandidaten darstellt.

Da bei heterozygoten Trägern einer Alport-Variante nach einer Lebendspende für ein homo- oder hemizygot betroffenes Familienmitglied die verbleibende Niere einer deutlichen Hyperfiltration ausgesetzt ist, welche bei den Spendern mit bereits vorgeschädigter GBM weitere Schäden setzen kann, können insbesondere diese Patienten von der Identifikation solcher *modifier* profitieren. Genetische *modifier* können, sobald sie identifiziert sind, bereits vor der Spende bestimmt werden und zur besseren Prognoseabschätzung für Spender und Empfänger dienen.

1.3 Aufbau und Zielsetzung des Versuchs

Wie bereits einleitend erwähnt, soll es Ziel dieses Versuchs sein, die Funktion der R138Q-Variante als *modifier* bei Patienten mit heterozygoter Trägerschaft einer Alport-Variante und ihren Einfluss bezüglich eines etwaigen Ansprechens auf eine Therapie mit ACEi zu untersuchen.

1.3.1 Versuchsaufbau

Die folgende Versuchsbeschreibung soll lediglich einen Überblick über den grundlegenden Aufbau des Experiments präsentieren, um durch eine zusammenhängende Darstellung ein besseres Verständnis des Versuches zu ermöglichen. Exakte Beschreibungen der angewandten Methoden erfolgen im Abschnitt Material und Methoden.

Zur Simulation der Hyperfiltration nach Lebendnierenspende soll ein Mausmodell dienen, in dem die Mäuse im Erwachsenenalter einer Uninephrektomie unterzogen werden. Die Versuchstiere können fünf verschiedenen Genotypen zugeordnet werden. Als Kontrolle dienen Wildtyp-Mäuse, eine zweite Gruppe ist Träger einer heterozygoten *Col4a3*-Variante, die nächste Gruppe trägt heterozygot das murine Äquivalent einer R138Q-Podocin-Variante, während eine weitere Gruppe beide dieser genetischen Merkmale im heterozygoten Zustand auf sich vereint. Bei der letzten Gruppe handelt es sich um Mäuse mit homozygoter *Col4a3*-Variante, welche demnach am Vollbild des AS erkranken und als „Alport“-Gruppe bezeichnet werden. Mit Ausnahme der homozygot erkrankten Tiere, welche nur als Referenz dienen sollen und im Folgenden nicht Gegenstand der Versuchsbeschreibung sind, werden die Tiere der verschiedenen Genotypen zufällig unterschiedlichen Therapien zugeordnet. Eine Therapiegruppe erhält eine Scheinoperation, diese Gruppe wird im Folgenden als „Sham“-Gruppe bezeichnet, während die anderen Tiere einer tatsächliche Uninephrektomie unterzogen werden. Die uninephrektomierten Tiere erhalten entweder keine nachfolgende medikamentöse Therapie, diese Gruppe wird

als „Neph“-Gruppe bezeichnet, oder es wird ihnen eine Therapie mit ACEi über das Trinkwasser verabreicht. Diese letzte Therapie-Gruppe wird als „ACEi“-Gruppe bezeichnet. Die Uninephrektomie wird durchgeführt, wenn die Versuchstiere ein Alter von etwa 138 Tagen erreicht haben, da dies nach Erkenntnissen der Arbeitsgruppe mit einem mittleren menschlichen Erwachsenenalter vergleichbar ist, in welchem sich folglich auch die potentiellen Spender befinden würden. Die ACEi-Therapie wird ab dem 14. Tag nach der Operation appliziert.

Alle 30 Tage werden die Versuchstiere gewogen und ab dem 60. Lebenstag werden zusätzlich ebenfalls alle 30 Tage manuell Urinproben akquiriert. Da es nicht sicher ist, dass von jedem Versuchstier an einem bestimmten Tag eine für die Analyse ausreichende Menge Urin gesammelt werden kann, wird das Intervall zur Urinprobengewinnung auf jeweils drei Tage vor und nach jedem Stichtag erweitert. In einem Alter von 180 Tagen werden die Versuchstiere getötet, dabei werden die Nieren für die nachfolgende Immunfluoreszenz (IF) entfernt. Des Weiteren wird zu diesem Zeitpunkt mittels Herzpunktion Blut entnommen, in welchem anschließend Harnstoff und Cholesterin im Serum untersucht werden. Die bis dahin gesammelten Urinproben werden mittels Gelelektrophorese untersucht, um die Menge an Proteinen im Urin der Versuchstiere beurteilen zu können.

Abweichend davon wird bei homozygoten Tieren keine Operation oder medikamentöse Therapie durchgeführt. Für diese Tiere werden nur einmalig in einem Zeitraum vom 53. Lebenstag bis zur Tötung am 60. Lebenstag Urinproben gesammelt. Die Präparation selber verläuft hingegen ebenso wie die Untersuchung von Nierenstruktur mittels IF, Urinanalyse und Bluttests bei allen Versuchstieren gleich.

1.3.2 Eignung des Tiermodells und Übertragbarkeit auf den Menschen

Ein Tiermodell birgt den großen Vorteil, dass standardisierte Bedingungen für eine relativ große Zahl an Untersuchungsobjekten geschaffen werden können. Das Mausmodell im Spezifischen eignet sich, da Mäuse aufgrund ihrer im Vergleich zum Menschen deutlich kürzeren Lebenserwartung die Möglichkeit bieten, die Progression der Krankheit quasi im Zeitraffer zu erfassen. So kann das zu testende Konzept in kurzer Zeit bereits im Tiermodell untermauert oder verworfen werden, bevor sich gegebenenfalls langwierige und aufwendige Studien an Patienten anschließen.

Col4a3^{-/-}-Mäuse entwickeln einen Phänotyp, der gut mit dem klinischen Bild von Patienten mit homo- oder hemizygoter Trägerschaft vergleichbar ist (Cosgrove et al. 1996) und sind bereits seit einigen Jahren als Tiermodell für AS etabliert. Wie beim Menschen fehlt bei diesen Tieren das $\alpha3\alpha4\alpha5$ -Kollagen-Netzwerk der GBM vollständig, während das fetale $\alpha1\alpha1\alpha2$ -Netzwerk erhalten bleibt (Miner und Sanes 1996). Ebenso wie bei Alport-Patienten hat die Therapie mit ACEi auch bei *Col4a3*^{-/-}-Versuchstieren einen nephroprotektiven und antifibrotischen Effekt (Gross et al. 2003). Auch für *Col4a3*^{+/-}-Versuchstiere ist gezeigt

worden, dass sie ein gutes Tiermodell für heterozygote Träger einer Alport-Variante mit TBMN darstellen und einen mit betroffenen Patienten vergleichbaren Phänotyp entwickeln (Beirowski et al. 2006).

Versuchstieren mit einem *Nphs2*^{-/-}-Genotyp fehlt Podocin gänzlich, sie erkranken deutlich schwerer als Patienten mit Podocin-Varianten (Roselli et al. 2004a). Das murine Podocin ist zwei Aminosäuren länger als das humane Äquivalent, die humane R138Q-Variante entspricht deswegen der murinen R140Q-Variante (Philippe et al. 2008). Für *Nphs2*^{R140Q/-}-Versuchstiere konnte gezeigt werden, dass ihr Phänotyp vergleichbar mit durch Podocin-Varianten ausgelöstes SRNS bei Menschen ist (Tabatabaeifar et al. 2017). Sie entwickeln FSGS und elektronenmikroskopisch nachweisbare Podozytenfußfortsatzverschmelzung analog zur Pathogenese bei Patienten mit SRNS (Tabatabaeifar et al. 2017). Während Versuchstiere mit *Nphs2*^{R140Q/R140Q}-Genotyp frühzeitig nach der Geburt eine schwere Albuminurie und nachfolgend terminales Nierenversagen aufweisen, zeigen sich bei *Nphs2*^{R140Q/+}-Mäusen weder Proteinurie noch strukturelle Auffälligkeiten der Niere (Philippe et al. 2008).

Da es sich sowohl bei *Col4a3*^{+/-}-Versuchstieren als auch bei Mäusen mit R140Q-Variante um Modelle handelt, die mit den zugehörigen menschlichen Erkrankungen durchaus vergleichbare Phänotypen entwickeln, ist auch anzunehmen, dass die Funktion der R140Q-Variante als *modifier* der Erkrankung bei *Col4a3*^{+/-}-Mäusen ebenfalls auf Patienten mit R138Q-Variante und heterozygoter Trägerschaft einer Alport-Variante übertragbar ist.

1.3.3 Zielsetzung

Die Ergebnisse dieses Experiments sollen auf lange Sicht einen Beitrag dazu leisten, Angehörige von homo- oder hemizygot erkrankten Alport-Patienten bezüglich einer Lebendnierenspende besser beraten zu können. Die vorgeschädigte GBM der heterozygoten Angehörigen geht mit einem erhöhten Risiko des Organversagens sowohl für Spender als auch Empfänger einher (Beirowski et al. 2006; Gross et al. 2009; Savige et al. 2013), dennoch ist die Bereitschaft zur Lebendspende durch Angehörige in Alport-Familien hoch (Gross et al. 2009; Kelly et al. 2017). Da das Spektrum der Erkrankung bei heterozygoten Trägern einer Alport-Variante von isolierter Mikrohämaturie bis hin zu terminalem Nierenversagen reicht und diese Variabilität nicht ausschließlich durch unterschiedliche *COLA*-Varianten erklärbar ist (Jais et al. 2003; Deltas et al. 2013), bedarf es zur präziseren Risikostratifizierung vor Lebendnierenspende weiterer Parameter.

Podocin-Varianten werden für vererbare Formen von SRNS verantwortlich gemacht (Boute et al. 2000). Für die R229Q-Variante konnte bereits ein Zusammenhang zwischen der Schwere der Proteinurie und dem Vorhandensein dieser Variante bei Patienten mit heterozygoter Trägerschaft einer Alport-Variante nachgewiesen werden (Frese et al. 2019). Da diese Variante allerdings nur bei etwa 10 % der Fälle von nicht erklärbar schwerer Proteinurie nachweisbar ist, ist es hochwahrscheinlich, dass weitere genetische *modifier*

existieren (Voskarides et al. 2012). Einen möglichen Kandidaten dafür stellt die R138Q-Variante dar, deren Einfluss auf die Nierenfunktion bei heterozygoter Trägerschaft einer Alport-Variante auf die Nierenfunktion nach Nierenspende in diesem Experiment untersucht werden soll.

2 Material und Methoden

Im Folgenden sollen alle verwendeten Materialien sowie Methoden des Experiments erklärt werden. Jedem beschreibendem Kapitel folgt eine Tabelle, welche die genutzten Materialien und Substanzen eindeutig aufschlüsselt. Die verwendeten Geräte, welche teilweise bei mehreren Methoden zum Einsatz gekommen sind, werden zur Vermeidung von Dopplungen gesammelt in Kapitel 2.8 dargestellt.

Im Rahmen dieses Experiments wurden je eine weitere Dissertation von Karoline Czeranski und Stefan Benda erarbeitet, welche ihre Versuchstiere postoperativ keiner ACEi-Therapie zuführten. Stattdessen applizierten sie Futter mit einem höheren Fettgehalt beziehungsweise 0,9 %ige Kochsalzlösung statt normalen Trinkwassers zur Simulation von Lebensstilfaktoren wie fettreicher Ernährung und hoher Salzaufnahme. Die Therapie-Gruppen waren dementsprechend zwischen den insgesamt drei Versuchen unterschiedlich, während sich die Kontrollgruppen überschneiden. Dies diente insbesondere dazu, den Bedarf an Versuchstieren für die Kontrollgruppen zu minimieren. Abseits der gegenseitigen und ausgeglichenen Kooperation innerhalb der Kontrollgruppen gab es keine weiteren Hilfestellungen untereinander, welche die jeweiligen Eigenleistungen an den Dissertationen untergraben würden.

2.1 Versuchstiere

Der Tierversuch wurde durch das niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes und der Tierschutz-Versuchstierverordnung unter dem Aktenzeichen G17.2575 genehmigt. Alle Versuchstiere wurden entsprechend den Auflagen dieser Genehmigung und dem geltenden deutschen Recht behandelt. Die Tiere wurden in einer keimarmen Umgebung in Käfigen mit ausreichender Bodenfläche, Einstreu und Nistmaterial gehalten und unterlagen einem jeweils zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus. Die Käfige wurden jeweils separat durch eine zentrale Filteranlage belüftet. Trinkwasser und Nahrung in Form von Haltungsfutter-Pellets stand *ad libitum* zur Verfügung. Der Allgemeinzustand aller Versuchstiere mit Ausnahme der homozygot erkrankten wurde ab dem 120. Lebenstag mindestens zwei Mal wöchentlich erfasst, während das Gewicht wöchentlich kontrolliert wurde. Vor dem 120. Lebenstag wurde das Gewicht jedes Tieres monatlich überprüft. Davon abweichend wurden die *Col4a3^{-/-}*-Tiere aufgrund ihrer stärkeren Belastung durch die Erkrankung bereits ab dem 28. Lebenstag wöchentlich gewogen und der Allgemeinzustand drei Mal pro Woche kontrolliert.

Bei allen Tieren handelte es sich um Mäuse mit 129/Sv-Hintergrund. Die *Col4a3-knock-out*-Tiere wurden bei den *Jackson Laboratories* (04609 Bar Harbor, USA) erworben

(Bestellnummer: 002908, Bezeichnung des Stamms: *Col4a3*^{tm1Dec}) und sind von der Arbeitsgruppe um Dominic Cosgrove erstbeschrieben worden (Cosgrove et al. 1996). Der *Npbs2*^{R140Q/+}-Stamm wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Corinne Antignac (Inserm, U574, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, Frankreich) zur Verfügung gestellt und ist von dieser beschrieben (Philippe et al. 2008).

Die Tiere des *Col4a3*^{+/-}-129/Sv-Stamms wurden mit denen des *Npbs2*^{R140Q/+}-129/Sv-Stammes gekreuzt. Resultierend ergaben sich Wildtyp-Mäuse, *Col4a3*^{+/-}-Mäuse, *Npbs2*^{R140Q/+}-Mäuse und Versuchstiere, welche die heterozygote Trägerschaft beider genetischer Merkmale auf sich vereinigten und als doppelt heterozygot bezeichnet werden. Des Weiteren wurde eine kleine Gruppe von *Col4a3*^{-/-}-Versuchstieren gezüchtet. Der gemeinsame 129/Sv-Hintergrund aller Versuchstiere ermöglicht eine durch geringe interindividuelle genetische Unterschiede bedingte verbesserte Vergleichbarkeit der Versuchstiere untereinander.

2.2 Genotypisierung

Den durch Kreuzung entstandenen Versuchstieren wurden Schwanzbiopsien entnommen, aus welchen anschließend die DNA (*deoxyribonucleic acid*, Desoxyribonukleinsäure) isoliert wurde. Unter Zuhilfenahme verschiedener Primer wurden die Genotypen mittels PCR (*polymerase chain reaction*, Polymerasekettenreaktion) ermittelt.

2.2.1 DNA-Isolation aus Schwanzbiopsien

Zur DNA-Isolation wurden zunächst 4 µl Proteinase K und 200 µl Lyse-Reagenz zu jeder der in einem Reaktionsgefäß befindlichen Schwanzbiopsien hinzugegeben. Anschließend wurde die Lösung gut durchmischt. Als nächstes wurden die Proben zuerst bei 55 °C und 1400 rpm für 60 min im Thermomixer Compact inkubiert und dann anschließend für 45 min auf 85 °C im Heizblock erhitzt. Zuletzt wurden die Proben für 30 Sekunden bei Raumtemperatur und 15.000 rpm zentrifugiert. In Tabelle 1 sind die dafür verwendeten Materialien gelistet.

Tabelle 1: Materialien für die DNA-Isolation

Material/Substanz	Menge	Hersteller
DirectPCR Lysis Reagent (Mouse Tail)	200 µl	VIAGENCA 90010 Los Angeles, USA
Proteinase K	4 µl	VWR International GmbH 64295 Darmstadt

2.2.2 Polymerasekettenreaktion

Für die *Col4a3*-PCR wurde eine Mixtur mit je 0,5 µl *Forward*-, *Reverse*- und *Mutant*-Primer konzentriert zu je 20 µM in dH₂O angesetzt. Anschließend wurden 0,5 µl einer alle vier Nukleotide enthaltenden dH₂O-Lösung hinzugegeben, in der jedes Nukleotid eine Konzentration von 10 mM hatte. Es folgten 2,5 µl 10-fach PCR-Puffer, 2,5 µl 10-fach Ladepuffer und zuletzt 0,1 µl DNA-Polymerase mit einer Konzentration von 5 U/µl. Die Probe wurde anschließend mit 17,4 µl dH₂O auf 24,5 µl aufgefüllt. Diese Mixtur wurde einem Reaktionsgefäß enthaltend 0,5 µl der zuvor isolierten DNA beigegeben.

Die *Npfs2*-PCR unterschied sich davon nur im Ansatz dieser Mixtur, alle anderen Schritte liefen für beide Verfahren identisch ab. Hierfür wurden je 0,5 µl des zu je 20 µM konzentrierten *Forward*- und *Reverse*-Primers in dH₂O mit einer zum *Col4a3*-Ansatz analogen Nukleotid-Lösung, 2,5 µl 10-fach PCR-Puffer, 2,5 µl 10-fach Ladepuffer und 0,1 µl der zu 5 U/µl konzentrierten DNA-Polymerase zusammengegeben und anschließend mit 17,9 µl dH₂O zu 24,5 µl aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde ebenfalls einem Reaktionsgefäß mit 0,5 µl isolierter DNA beigegeben.

Die Proben wurden anschließend in den PCR-Thermozykler eingebracht. Zunächst wurde die DNA bei 94 °C für 3 min ausgiebig denaturiert. Anschließend wurden die folgenden drei Schritte insgesamt 35 Mal wiederholt. Als erstes wurde die DNA für 30 Sekunden bei 94 °C denaturiert, es folgte bei 60 °C für 30 Sekunden die Primerhybridisierung und anschließend bei 72 °C für 1 min die Elongation. Die PCR war damit beendet und die Proben wurden der Agarosegelelektrophorese zugeführt. Tabelle 2 zählt die verwendeten Materialien auf.

Tabelle 2: Materialien für die Polymerasekettenreaktion

Material/Substanz	Menge	Hersteller
TopTaq PCR für <i>Col4a3</i>		
Primer 1 (<i>forward</i>) (CCA GGC TTA AAG GGA AAT CC) (20 µM)	0,5 µl	Eurofins Genomics 85560 Ebersber
Primer 2 (<i>reverse</i>) (CCT GCT AAT ATA GGG TTC GAG A) (20 µM)	0,5 µl	Eurofins Genomics 85560 Ebersber
Primer 3 (<i>mutant</i>) (AAT CGC CAA TGA CAA GAC G) (20 µM)	0,5 µl	Eurofins Genomics 85560 Ebersber

Material/Substanz	Menge	Hersteller
Nukleotide (ATP, GTP, CTP und TTP zu je 10 mM)	0,5 µl	Thermo Fisher Scientific 02451 Waltham, USA
10x TopTaq-PCR-Puffer	2,5 µl	QIAGEN GmbH 40724 Hilden
10x Corel Load™ (Concentrate, 10x)	2,5 µl	QIAGEN GmbH 40724 Hilden
Top-Taq DNA-Polymerase 5 (5 U/µl)	0,1 µl	QIAGEN GmbH 40724 Hilden
dH ₂ O	<i>Ad</i> 24,5 µl (17,4 µl)	n. a. (nicht angegeben, nicht abrufbar beziehungsweise nicht auswertbar)
TopTaq PCR für <i>Nphs2</i>		
10x TopTaq-PCR-Puffer	2,5 µl	QIAGEN GmbH 40724 Hilden
10x Corel Load™ (Concentrate, 10x)	2,5 µl	QIAGEN GmbH 40724 Hilden
Podocin 3 (<i>forward</i>) (TAA TTA TAG GGC CGG TTG) (20 µM)	0,5 µl	Eurofins Genomics 85560 Ebersber
Podocin 3 (<i>reverse</i>) (TGC CTC TTC TCC CAA CTA) (20 µM)	0,5 µl	Eurofins Genomics 85560 Ebersber
Nukleotide (ATP, GTP, CTP und TTP zu je 10 mM)	0,5 µl	Thermo Fisher Scientific 02451 Waltham, USA
Top-Taq DNA-Polymerase 5 (5 U/µl)	0,1 µl	QIAGEN GmbH 40724 Hilden
dH ₂ O	<i>Ad</i> 24,5 µl (17,9 µl)	n. a.

2.2.3 Agarosegelelektrophorese

Zur Durchführung der Agarosegelelektrophorese wurde zunächst ein Agarosegel aus 30 ml 1-fach TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA (Ethylendiamintetraacetat)), 0,45 g Agarose und

10 μ l Ethidiumbromid hergestellt und für etwa 20 min ausgehärtet. Der 1-fach konzentrierte TAE-Puffer wurde aus in dH₂O auf 1/50 verdünntem 50-fach TAE-Ansatz gewonnen. 50-fach TAE wurde hergestellt, indem zunächst 242 g Tris-Base abgemessen und in dH₂O gelöst wurden. Dazu wurden 57,1 ml Essigsäure und 22,6 g EDTA-Natriumsalz-Tetrahydrat gegeben. Anschließend wurde mit dH₂O auf 1000 ml aufgefüllt.

Die Proben wurden anschließend in die Geltaschen eingefüllt und das Gel an eine Spannungsquelle angeschlossen. Bei einer Spannung von 75 V wurde der Gellauf für etwa 60 min fortgeführt. Das Gel wurde anschließend von der Spannungsquelle getrennt und mittels UV-Transsimulator analysiert und fotografiert.

In Abbildung 1 und Abbildung 2 sind Beispiele für die Ergebnisse der Agarosegelelektrophorese gezeigt. Bei der *Col4a3*-Gelelektrophorese stellt sich in der oberen Bande das mutierte Allel dar, während das gesunde Allel die untere Bande bildet. Ebenso verhielt es sich bei der Auswertung der *Nphs2*-Gelelektrophorese. In Tabelle 3 sind alle für Agarosegelelektrophorese verwendeten Materialien aufgelistet.

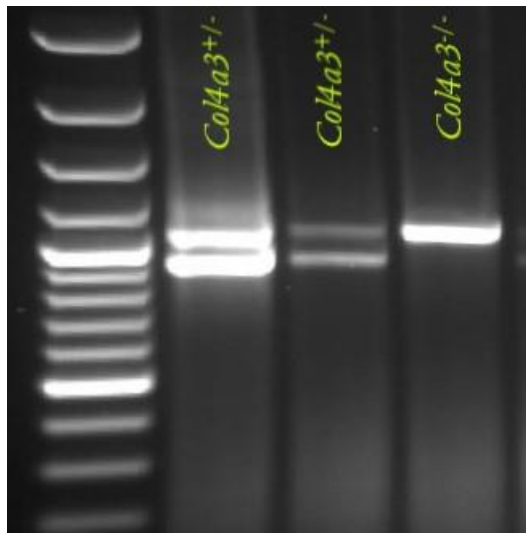


Abbildung 1: *Col4a3*-Gelelektrophorese In der ersten Spur stellt sich der Marker dar. Die zweite und dritte Spur sind sowohl positiv für das gesunde Allel (unten) als auch für das mutierte Allel (oben). Die vierte Spur stellt den Genotyp eines homozygot erkrankten *Col4a3*^{-/-}-Tieres dar.

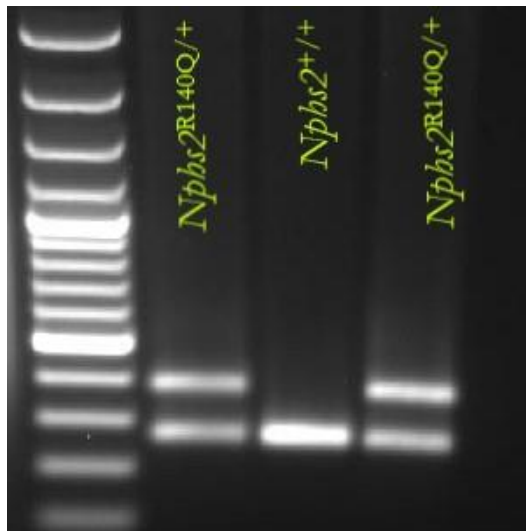


Abbildung 2: *Nphs2*-Gelelektrophorese Die erste Spur stellt die Markerbanden dar. Die zweite sowie vierte Spur sind sowohl positiv für das Wildtyp-Allel (unten) als auch für das punktmutierte Allel (oben). Die dritte Spur stellt das Bandenmuster eines *Nphs2*-Wildtyp-Versuchstieres dar.

Tabelle 3: Materialien für die Agarosegelelektrophorese

Material/Substanz	Menge	Hersteller
DNA-Gelelektrophorese (1,5 %iges Gel)		
Agarose	0,45 g	Biozym Scientific GmbH 31833 Hess. Oldendorf
Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml)	10 µl	Carl Roth GmbH & Co. KG 76185 Karlsruhe
TAE 1x-Puffer	30 ml	Herstellung siehe unten
Ansatz für 50x TAE		
Tris-Base (2 M)	242 g	Roche Diagnostics GmbH 68305 Mannheim
EDTA-Natriumsalz- Tetrahydrat (50 mM)	22,6 g	SIGMA-Aldrich GmbH Jetzt: MERCK KGaA 64293 Darmstadt
Essigsäure (1 M)	57,1 ml	MERCK KGaA 64293 Darmstadt
dH ₂ O	Ad 1000 ml	n. a.

2.3 Operation, Therapie und Präparation der Versuchstiere

2.3.1 Uninephrektomie und ACEi-Therapie

Die Uninephrektomien wurden durch Dipl.-Biol. Diana Rubel unter Einhaltung der Vorgaben des deutschen Rechts in Isofluran-Inhalations-Narkose durchgeführt. Die Versuchstiere erhielten am Tag der Operation zwei subkutan applizierte Injektionen einer Mischung aus Metamizol und Buprenorphin. Die erste Injektion erfolgte bereits etwa 30 min vor der Operation. Zur Herstellung dieser Mischung wurden 0,4 ml Metamizol-Natrium-Lösung mit einer Konzentration von 500 mg/ml entsprechend 200 mg gemeinsam mit 0,333 ml einer Buprenorphinhydrochlorid-Lösung, welche eine Konzentration von 0,324 mg/ml hatte, entsprechend 0,1 mg mit circa 4,267 ml 0,9 %iger Kochsalzlösung zu 5 ml aufgefüllt. Diese Lösung wurde mit 50 µl pro 10 g Körpergewicht der Maus dosiert. Am ersten und zweiten Tag nach der Operation wurde ebenfalls jeweils zwei Mal Schmerzmittel subkutan appliziert. Für diese Injektion wurde eine Lösung bestehend aus 0,4 ml Metamizol-Natrium mit einer Konzentration von 500 mg/ml entsprechend 200 mg und 4,6 ml 0,9 %iger Kochsalzlösung verwendet. Die Dosierung entsprach ebenfalls 50 µl pro 10 g Körpergewicht der Maus. Bei Bedarf wurden diese Injektionen vom dritten bis zum siebten postoperativen Tag fortgeführt. Zur Feststellung eines etwaigen weiteren Analgetikabedarfs wurde der Allgemeinzustand der Mäuse nach klaren Vorgaben entsprechend den Auflagen des Tierversuchsantrags vom ersten bis zum achten Tag nach Operation überprüft und das Körpergewicht erhoben. Ab dem achten postoperativen Tag wurden das Gewicht bis zur Tötung der Versuchstiere wöchentlich und der Allgemeinzustand drei Mal wöchentlich erhoben.

Die Therapie mit ACEi wurde jeweils am 14. postoperativen Tag begonnen. Dafür wurden zunächst 40 mg Ramipril-Pulver in 1 ml unvergälltem Ethanol gelöst. Nachdem sich das Pulver vollständig gelöst hatte, wurde die Lösung zu 1 l sauberem Leitungswasser gegeben und dieses gut geschüttelt. Das erhaltene Produkt erhielten die Mäuse, welche der „ACEi“-Gruppe zugeordnet waren, statt normalen Trinkwassers *ad libitum*. Das ACEi-Trinkwasser wurde bei 4 °C maximal zwei Wochen im Kühlschrank gelagert und danach durch einen frischen Ansatz ersetzt. Die Trinkflaschen mit ACEi-Trinkwasser wurden in einem regelmäßigen Zyklus immer montags, freitags sowie mittwochs der folgenden Woche gewechselt, sodass gewährleistet war, dass kein ACEi-Trinkwasser länger als fünf Tage Raumtemperatur ausgesetzt war. Die Applikation von ACEi in dieser Form über das Trinkwasser bewirkt eine Verringerung der Plasma-Aktivität des *angiotensin-converting enzymes* (Keidar et al. 2000). Die Dosierung der ACEi-Therapie über das Trinkwasser ist innerhalb der Arbeitsgruppe bereits gut etabliert (Gross et al. 2003). Tabelle 4 gibt Aufschluss über die für die erläuterten Prozeduren verwendeten Materialien.

Tabelle 4: Materialien für Analgesie und ACEi-Therapie

Material/Substanz	Menge	Hersteller
Metamizol (Vetalgin®) 200 mg/kg und Buprenorphin (Temgesic®) 0,1 mg/kg		
Metamizol-Natrium-Monohydrat (500 mg/ml)	0,4 ml (200 mg)	Intervet Deutschland GmbH Ein Unternehmen der MSD Tiergesundheit 85716 Unterschleißheim
Buprenorphinhydrochlorid (0,324 mg/ml)	0,333 ml (0,1 mg)	Indivior Inc. 10710 North Chesterfield, USA
NaCl-Lösung (0,9 %)	<i>Ad</i> 5 ml (4,267 ml)	B. Braun Melsungen AG 34212 Melsungen
Metamizol (Vetalgin®) 200 mg/kg		
Metamizol-Natrium-Monohydrat (500 mg/ml)	0,4 ml (200 mg)	Intervet Deutschland GmbH Ein Unternehmen der MSD Tiergesundheit 85716 Unterschleißheim
NaCl-Lösung (0,9 %)	<i>Ad</i> 5 ml (4,6 ml)	B. Braun Melsungen AG 34212 Melsungen
ACEi-Trinkwasser		
Ramipril	40 mg	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH 65926 Frankfurt
Ethanol (unvergällt)	1 ml	MERCK KGaA 64293 Darmstadt
Leitungswasser	<i>Ad</i> 1000 ml	n. a.

2.3.2 Präparation

Um den 180. Lebenstag wurden alle Versuchstiere mittels abrupter zervikaler Dislokation in einer möglichst stressfreien Umgebung getötet. Die Ausnahme bildeten die *Col4a3^{-/-}*-Tiere, welche bereits in einem Alter von 60 Tagen präpariert wurden. Nach Feststellung

des Erfolgs der Tötungsmethode und vorheriger Reinigung der Arbeitsfläche mit 70 %igem Ethanol wurde das Versuchstier fixiert und das Abdomen Y-förmig mit einer scharfen Schere eröffnet. Nach Eröffnung des Brustkorbes wurde Blut mit Hilfe einer Sterican-Kanüle und Transcoject-Einmalspritze mittels Herzpunktion für die spätere Laboruntersuchung von Harnstoff und Cholesterin im Serum abgenommen. Etwaiger Urinabgang der Versuchstiere, wurde mit Hilfe einer Omnican-Spritze aufgenommen und bei -20 °C gelagert. Bevor die Blutprobe eingefroren wurde, wurde das Plasma gewonnen, indem das Blut zunächst etwa 60 min gerann. Nachfolgend wurde es bei Raumtemperatur für 2 min bei 8000 rpm zentrifugiert und die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert, welches erneut mit identischen Einstellungen zentrifugiert wurde. Das isolierte Serum in der oben Phase wurde ein weiteres Mal mit Hilfe einer Pipette abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in welchem die Probe bei -20 °C gelagert wurde.

Die dem Versuchstier nach Nephrektomie oder Scheinoperation verbleibenden Nieren wurden aufgesucht, am Hilum abgetrennt und entfernt. Nachfolgend wurden die Organe halbiert und in Einbettkassetten aufbewahrt. Diese wurden über Nacht bei 4 °C in 4 % PFA (Paraformaldehyd) in PBS (*phosphate-buffered saline*, phosphatgepufferte Salzlösung) mit einem pH-Wert von 7,4 bis 7,6 fixiert, danach ebenfalls bei 4 °C eine Stunde in PBS gewaschen und dann bis zur Einbettung in 70 % Ethanol bei 4 °C gelagert.

Für die Herstellung zweier Liter 10-fach PBS wurden 4 g Kaliumchlorid, 160 g Natriumchlorid, 28,4 g Dinatriumhydrogenphosphat und 4,8 g Kaliumdihydrogenphosphat in dH₂O gelöst, welches bis zur 2000-ml-Marke hinzugegeben wurde. Abschließend wurde der pH-Wert mittels pH-Universalindikator bestimmt, welcher sich typischerweise mit etwa 7,4 darstellte. Zur Gewinnung von 1-fach konzentrierter PBS wurde das Produkt auf 1/10 mit dH₂O verdünnt.

4 % PFA in PBS wurde hergestellt, indem 40 g PFA in einem Liter 1-fach PBS gelöst wurden. Die Lösung des PFA-Pulvers wurde mit Hilfe eines Magnetrührers beschleunigt. Nachfolgend wurde der pH mittels Universalindikator bestimmt, dieser befand sich bei korrekter Vorgehensweise bei 7,4 bis 7,6. Tabelle 5 listet die dafür verwendeten Materialien auf.

Tabelle 5: Materialien für die Präparation der Versuchstiere

Material/Substanz	Menge	Hersteller
Präparation		
Omnican 40	n. a.	B. Braun Melsungen AG 34212 Melsungen
Einmalspritzen 1 ml	n. a.	Transcoject GmbH 24539 Neumünster

Material/Substanz	Menge	Hersteller
Sterican Kanülen 0,55 x 25 mm	n. a.	B. Braun Melsungen AG 34212 Melsungen
Biozym-Reaktionsgefäß 1,6 ml	n. a.	Biozym Biotech Trading GmbH 1200 Wien, Österreich
Herstellung 10x PBS, pH 7,4		
Kaliumchlorid	4 g	Fluka Chemie GmbH 9471 Buchs, Schweiz
Natriumchlorid	160 g	MERCK KGaA 64293 Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	28,4 g	MERCK KGaA 64293 Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	4,8 g	MERCK KGaA 64293 Darmstadt
dH ₂ O	<i>Ad</i> 2000 ml	n. a.
Herstellung von 4 % PFA in PBS, pH 7,4-7,6		
pH-Streifen Universalindikator	n. a.	MERCK KGaA 64293 Darmstadt
Paraformaldehyd	40 g	SIGMA-Aldrich GmbH Jetzt: MERCK KGaA 64293 Darmstadt
1x PBS	n. a.	Herstellung siehe oben
Lagerung der Nieren		
Einbettkassette-Universal	n. a.	K. Lutz 97877 Wertheim
Ethanol vergällt	n. a.	Th. Geyer GmbH & Co. KG 71272 Renningen
dH ₂ O	n. a.	n. a.

2.4 Bestimmung der Proteinurie

Die Untersuchung der Proteinurie diente dem Zweck, sowohl die absolute Proteinurie zu einem bestimmten Zeitpunkt zwischen den verschiedenen Geschlechtern, Genotypen und Therapiegruppen vergleichbar zu machen als auch Unterschiede im Zeitverlauf insbesondere in der mit ACEi behandelten Gruppe sichtbar zu machen.

2.4.1 Probengewinnung

Urinproben wurden ab dem 60. Lebenstag alle 30 Tage bis zum Tod mit 180 Tagen gewonnen. Da nicht von jedem Versuchstier an jedem Tag eine für die Analyse ausreichende Menge akquiriert werden konnte, wurde das Intervall der Probengewinnung auf jeweils drei Tage vor und nach jedem Stichtag erweitert. Jeweils zum Stichtag und zusätzlich am 30. Lebenstag wurde außerdem das Körpergewicht der Versuchstiere zu Zwecken der statistischen Auswertung erhoben. Abweichend davon wurden bei Mäusen mit homozygoter Erkrankung nur in einem Intervall vom 53. Lebenstag bis zur Tötung am 60. Lebenstag Urinproben gewonnen und das Körpergewicht der Versuchstiere nicht statistisch ausgewertet.

Für die Gewinnung der Urinproben wurde kein Stoffwechsellkäfig verwendet, stattdessen wurden die Proben manuell gesammelt. Dafür wurden die Versuchstiere vorsichtig mit einer Hand fixiert, während mit der anderen Hand behutsam Druck über der Blase des Tieres appliziert wurde. Auf diesen Reiz hin ließen die Versuchstiere Urin, der von der zuvor desinfizierten Oberfläche der Arbeitsbank mit Hilfe einer Pipette in ein Reaktionsgefäß überführt wurde. Die auf diese Weise gewonnenen Proben wurden bis zu ihrer Auswertung bei -20 °C eingefroren und gelagert. In Tabelle 6 ist die exakte Bezeichnung und Herkunft der Probengefäße vermerkt.

Tabelle 6: Materialien für die Urinprobengewinnung

Material/Substanz	Menge	Hersteller
Biozym Reaktionsgefäß 1,6 ml	n. a.	Biozym Biotech Trading GmbH 1200 Wien, Österreich

2.4.2 Chloroform-Methanol-Fällung

Die Ausfällung der Proteine im Probenurin wurde mit einer Chloroform-Methanol-Fällung erreicht. Zu diesem Zweck wurde die Urinprobe zunächst bei 4 °C und 3200 rpm für 5 min zentrifugiert, um die Probe von etwaigem Zelldetritus und anderen makroskopischen Verunreinigungen zu befreien. Nach der Zentrifugation wurden mit Hilfe einer Pipette vorsichtig $20\text{ }\mu\text{l}$ Urin entnommen, ohne das Pellet am Boden zu berühren. Diese Probe wurde mit $80\text{ }\mu\text{l}$ dH_2O auf $100\text{ }\mu\text{l}$ aufgefüllt. Nachfolgend waren in folgender Reihenfolge

400 μl Methanol, 100 μl Chloroform und 300 μl dH_2O hinzuzufügen. Nach dem Hinzufügen einer jeden Substanz musste die Probe sorgfältig mit Hilfe eines Vortexmischers durchmischt werden. Als nächstes wurde die erhaltene Probe bei Raumtemperatur und 15.000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Es bildeten sich zwei Phasen, von denen die obere bis auf einen kleinen Rest abzupipettieren war und die untere im Reaktionsgefäß verblieb. Zwischen den Phasen befand sich eine Membran, welche die Proteine der Urinprobe beinhaltete. Erneut wurden 400 μl Methanol hinzugegeben, die Probe gut durchmischt und diese folgend für 2 min bei Raumtemperatur und 15.000 rpm zentrifugiert. Die Proteine sammelten sich nach diesem Schritt am Boden des Reaktionsgefäßes. Ohne das Pellet am Grund zu beschädigen, wurde der Überstand bis auf etwa 20 μl verworfen. Nun wurden ein drittes Mal 400 μl Methanol hinzugegeben und nach Durchmischung bei identischen Einstellungen zentrifugiert. Der Überstand wurde ebenfalls bis auf etwa 20 μl verworfen. Die vollständige Fällung der Proteine war damit erreicht. Tabelle 7 gibt Aufschluss über die dafür verwendeten Materialien.

Tabelle 7: Materialien für die Chloroform-Methanol-Fällung

Material/Substanz	Menge	Hersteller
Safe-Lock Tubes 1,5 ml	n. a.	Eppendorf AG 22331 Hamburg
Methanol	1200 μl	MERCK KGaA 64293 Darmstadt
Chloroform	100 μl	MERCK KGaA 64293 Darmstadt
dH_2O	380 μl	n. a.

2.4.3 Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Aufbereitung der Proben für die SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) wurden diese anschließend unter einer Sterilbank getrocknet. Sobald die Probe vollständig getrocknet war, wurden 25 μl Probenpuffer hinzugegeben. Zur Herstellung von 25 μl Probenpuffer wurden 12,5 μl 2-fach Tris-Glycin-Puffer, 10 μl dH_2O und 2,5 μl Reduktionsmittel miteinander vermischt. Nach Hinzugabe des Probenpuffers wurde die Probe mit Hilfe des Vortexmischers gut durchmischt und danach bei 32 °C in einem Heizblock verstaubt, bis sich alle Proteine gelöst hatten. Währenddessen wurde der BSA-Probenpuffer (bovines Serumalbumin) angesetzt. Dazu wurden 300 ng BSA in 5 μl dH_2O entsprechend einer Konzentration von 60 ng/ μl mit 6,25 μl 2-fach Tris-Glycin-Puffer und 1,25 μl Reduktionsmittel vermischt. Der BSA-Standard und die Reaktionsgefäße mit den Proben

wurden danach für 2 min bei 85 °C auf einem Heizblock erhitzt, danach sofort für etwa eine Minute auf Eis gelegt und anschließend abzentrifugiert. Die Proben und der Standard waren nun bereit, auf das Gel aufgetragen zu werden.

Anschließend wurde die Elektrophoresekammer mit Laufpuffer gefüllt und das Gel eingespannt. Mit Hilfe einer Mikroliterspritze wurde die erste Tasche mit Protein-Marker befüllt. In der zweiten Tasche befand sich bei jedem Gel der BSA-Standard. Die verbleibenden Taschen wurden mit den gefällten und aufbereiteten Proben beladen. Folgend wurde die Elektrophoresekammer mit dem Strom verbunden. Zunächst liefen die Proben bei 85 V für etwa 15 min langsam in das Gel hinein. Anschließend wurde die Spannung auf 100 V erhöht und für etwa 100 min aufrechterhalten. Danach wurde die Elektrophoresekammer von der Spannungsquelle getrennt, das Gel aus der Elektrophoresekammer entfernt und selbiges aus der Gelkassette in ein kleines Gefäß gebracht, welches mit etwa 25 ml Färbelösung befüllt war. Über Nacht wurde das Gel in der Färbelösung belassen und auf einem Wippschüttler in Bewegung gehalten, um ein Verkleben der Färbelösung mit dem Gel und dem Gefäß zu verhindern und eine optimale Färbung des gesamten Gels zu gewährleisten.

Am nächsten Morgen wurde die Färbelösung verworfen und durch dH₂O ersetzt. Das Gel in dH₂O wurde nun eine weitere Stunde mittels Wippschüttler geschwenkt, um überschüssige Reste der Färbelösung zu entfernen. Nach Ablauf der Stunde wurde die Lösung abermals verworfen und durch dH₂O ersetzt. Bis zur Digitalisierung wurde das fertige Gel anschließend bei 4 °C gelagert. Die für diese Methode verwendeten Materialien sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Materialien für die Polyacrylamidgelelektrophorese

Material/Substanz	Menge	Hersteller
Probenpuffer (25 µl)		
2x Tris-Glycine SDS Sample Buffer (Invitrogen™)	12,5 µl	Thermo Fisher Scientific 02451 Waltham, USA
10x NuPAGE Sample Reducing Agent (Invitrogen™)	2,5 µl	Thermo Fisher Scientific 02451 Waltham, USA
dH ₂ O	10 µl	n. a.
BSA-Probenpufferansatz (12,5 µl)		
2x Tris-Glycine SDS Sample Buffer (Invitrogen™)	6,25 µl	Thermo Fisher Scientific 02451 Waltham, USA

Material/Substanz	Menge	Hersteller
10x NuPAGE Sample Reducing Agent (Invitrogen™)	1,25 µl	Thermo Fisher Scientific 02451 Waltham, USA
BSA-Standard in dH ₂ O (60 ng/µl)	5 µl	Herstellung siehe unten
Herstellung BSA-Standard 300 ng/5µl (10 ml)		
BSA (Bovines Serumalbumin)	0,3 mg	MERCK KGaA 64293 Darmstadt
dH ₂ O	<i>Ad</i> 10 ml	n. a.
Gelelektrophorese		
Novex WedgeWell Tris-Glycine Gel (Invitrogen™)	n. a.	Thermo Fisher Scientific 02451 Waltham, USA
ProSieve QuadColor Protein Marker, 4,6-300 kDa	n. a.	Lonza Rockland Inc. 04841 Rockland, USA
Hamilton 700 Serie Microliter #705	n. a.	Hamilton Bonaduz AG 7402 Bonaduz, Schweiz
Novex Tris-Glycine-SDS Running Buffer (10x)	n. a.	Thermo Fisher Scientific 02451 Waltham, USA
InstantBlue™ (Färbelösung)	n. a.	Expedeon Ltd. CB24 5QE Cambridge, UK

2.4.4 Auswertung der Proteingele

Zur Digitalisierung wurde zuerst das Gel zentral auf der *Whitescreen*-Unterlage des Gel-Dokumentations-Systems platziert, folgend fotografiert und schließlich in hoher Qualität abgespeichert. Die Bilddatei wurde nachfolgend mit Hilfe des Programms ImageJ ausgewertet. Dazu wurden die einzelnen Spuren des Gels in Proteine kleiner und größer sowie gleich Albumin unterteilt und einzeln ausgewertet. Die Albuminbande war anhand des Markers sowie des BSA-Standards eindeutig zu identifizieren. Die Intensität der Färbung in den jeweiligen Bereichen der Spur wurde mit Hilfe des Computerprogramms ermittelt. Auch die Intensität der Bande des BSA-Standards wurde auf diese Weise gemessen. Um die Gele untereinander vergleichbar zu machen, wurden die jeweiligen absoluten Intensitäten durch die Intensität des BSA-Standards geteilt, sodass ein relativer

Wert für die Proteinmenge in der Probe errechnet wurde. Es handelte sich demnach um eine semiquantitative Messung, da zwar nicht die absolute Menge an Protein bestimmt wurde, aber die Relativierung auf eine konstante 300 ng Albuminbande Rückschlüsse auf die tatsächliche Höhe der Proteinurie ermöglichte. Die Auswertung der Proteinurie fand ausschließlich mit denen durch den BSA-Standard standardisierten relativen Intensitäten statt. Dieses Vorgehen ist beispielhaft in Abbildung 3 illustriert. Tabelle 9 listet die dafür verwendeten Computerprogramme auf.

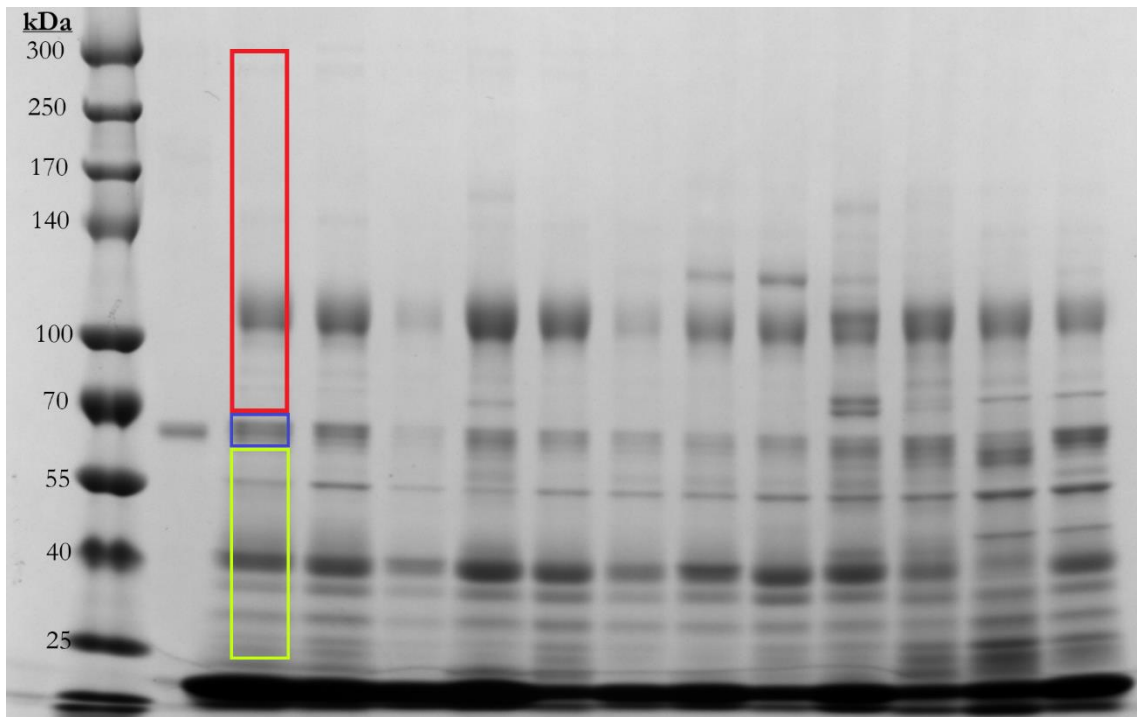


Abbildung 3: Beispielgel für die SDS-PAGE Dargestellt ist ein mittels SDS-PAGE erstelltes Gel zur Analyse der Proteinurie. Die erste Spur stellt den Proteinmarker dar, anhand dessen sich die Größe der bandenbildenden Proteine abschätzen lässt. Größenangaben des Markers sind in kDa links neben der jeweiligen Markerbande eingetragen. In der zweiten Spur befindet sich der BSA-Standard, es handelt sich dementsprechend um eine einzige definierte Bande, welche sich aus 300 ng Albumin zusammensetzt. Die restlichen Spuren stellen die aus den Urinproben gewonnenen Proteine dar. Analysiert wurde die Färbintensität von Bereichen gleicher Größe jeweils für Proteine größer, kleiner oder gleich Albumin. Die erhaltenen Intensitätswerte wurden durch die Intensität der Albuminbande des BSA-Standards des betreffenden Gels geteilt, um sie zwischen mehreren Gelen vergleichbar zu machen. Die Messbereiche sind beispielhaft in der dritten Spur dargestellt. Proteine kleiner als Albumin sind grün umrandet, die Albuminbande ist blau markiert und Proteine größer als Albumin sind rot umrahmt. Die Albuminbande der Urinproteinproben ist außerdem eindeutig anhand der Bande des Standards identifizierbar.

Tabelle 9: Materialien für die Proteingelanalyse

Material/Substanz	Menge	Hersteller
Auswertung der Proteingele		
Image Lab Software	n. a.	Bio-Rad Laboratories GmbH 80939 München
(Fiji Is Just) ImageJ	n. a.	National Institute of Health 9000 Rockville Pike, USA Entwickler: Wayne Rasband

2.5 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz wurde durchgeführt, um strukturelle Unterschiede zwischen Genotypen und Therapiegruppen aufzeigen zu können. Gefärbt wurde einerseits mit Antikörpern gegen Fibronectin und andererseits mit Antikörpern gegen Laminin-111.

2.5.1 Theoretischer Hintergrund

Fibronectin ist ein Glykoprotein, welches im Rahmen von interstitieller Narbenbildung in der Niere frühzeitig nachgewiesen werden kann (Eddy 1996). Daher eignet es sich gut als Fibrosemarker. Durch Proteinurie werden außerdem Myofibroblasten stimuliert, Fibronectin zu exprimieren, wodurch Proteinurie über Fibronectinexpression zur Nierenfibrose führen kann (Wang et al. 2000). Des Weiteren ist die Fibronectin-IF innerhalb unserer sowie anderer Arbeitsgruppen bereits gut als Marker für fibrotische Veränderungen des Nierenparenchyms etabliert (Miner und Sanes 1996; Gross et al. 2003; Gross und Weber 2005; Meehan et al. 2009).

Laminin-111 stellt einen integralen Bestandteil der Basalmembranen dar (Miner und Sanes 1996) und ist deshalb geeignet, die tubuläre und glomeruläre Basalmembran zu markieren. Des Weiteren lässt sich Laminin-111 auch in der mesangialen Matrix nachweisen (Miner 1999) und nimmt Einfluss auf die Mesangialzellproliferation sowie Matrixdeposition (Ning et al. 2014), weshalb die Färbung geeignet ist, um mesangiale Matrixakkumulation darzustellen. Ebenso wie die Fibronectin-IF stellt auch die Laminin-Färbung ein in verschiedenen Arbeitsgruppen bewährtes Mittel zur Darstellung von renaler Matrixakkumulation dar (Miner und Sanes 1996; Gross et al. 2003; Gross und Weber 2005; Meehan et al. 2009).

Das Bewertungssystem, nach welchem die Fibrose und Matrixakkumulation bewertet wurden und das in Kapitel 2.5.6 genauer erläutert wird, orientiert sich grob an der Banff-Klassifikation, welche dazu dient, anhand histologischer Kriterien die Prognose einer

Spenderniere vor der Transplantation vorherzusagen (Liapis et al. 2017; Roufosse et al. 2018). Neben weiteren Läsionstypen werden dabei auch die Fibrose und Matrixakkumulation betrachtet (Roufosse et al. 2018). Eingeteilt wird der Schweregrad der Läsion in vier Kategorien, welche von null bis drei durchnummeriert werden. Null bedeutet dabei, dass kein Schaden nachweisbar ist, während mit drei eine schwere Läsion klassifiziert wird (Liapis et al. 2017; Roufosse et al. 2018). Angelehnt daran wurden auch im Rahmen dieses Versuches Läsionen in diese vier Hauptkategorien eingeteilt.

2.5.2 Paraffineinbettung

Die zuvor bei 4 °C in 70 % Ethanol gelagerten Nierenpräparate wurden mit Hilfe des Einbettautomaten für die Paraffineinbettung vorbereitet. Nach abgeschlossener Vorbereitung wurden die zuvor halbierten Nieren aus ihrer Einbettkassette entfernt und mit der Schnittkante nach unten in ein Einbettförmchen verbracht. In der Ausgießstation wurden diese dann gemeinsam mit der beschrifteten Einbettkassette mit Paraffin ausgegossen und nachfolgend auf der Kühlplatte gekühlt. Sobald das Präparat vollständig abgekühlt war, wurde es vorsichtig aus dem Einbettförmchen entfernt. Die in Paraffin eingebetteten Nierenpräparate waren damit bereit, im nächsten Schritt geschnitten zu werden. Die exakte Bezeichnung der verwendeten Einbettkassetten kann Tabelle 5 entnommen werden.

2.5.3 Anfertigung der Schnitte

Die Paraffinblöcke wurden zur Anfertigung der Schnitte in die Haltevorrichtung des Mikrotoms eingelegt und in jeweils 12 µm dicken Schichten abgetragen, bis das Organ vollständig angeschnitten war. Die 12 µm Schnitte wurden verworfen und es wurden Schnitte mit 3 µm Dicke erstellt, auf welchen sich die Niere vollständig darstellte. Diese wurden im Wasserbad des Mikrotoms vorsichtig an die Objektträger adhärirt, im externen Warmwasserbad bei etwa 40 °C geglättet, kurz abgeklopft und anschließend auf der Heizplatte getrocknet, bis keine Feuchtigkeit mehr auf den Objektträgern erkennbar war. Anschließend wurden die fertigen Schnitte noch einmal über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank getrocknet. Die Paraffinschnitte konnten nun gefärbt werden. Die verwendeten Materialien sind in Tabelle 10 aufgelistet.

Tabelle 10: Materialien für die Anfertigung der Paraffinschnitte

Material/Substanz	Menge	Hersteller
Objektträger Thermo Scientific Menzel- Gläser Superfrost Plus	n. a.	Gerhard Menzel B.V. & Co. KG 38116 Braunschweig
Klingen FEATHER Microtome Blade Stainless Steel S35	n. a.	FEATHER Safety Razor Co., Ltd. 3-70, Ohyodo-Minami 3- Chome, Kita-ku, Osaka 531- 0075, Japan

2.5.4 Färbung

Die Immunfluoreszenzfärbung wird im Folgenden für beide Antikörper-Färbungen gemeinsam erläutert. Die Unterschiede zwischen beiden werden anschließend herausgestellt.

Die Objektträger wurden zunächst für 10 min in Xylol deparaffiniert. Dieser Schritt wurde insgesamt drei Mal durchgeführt. Nachfolgend wurden die Präparate in einer Ethanol-Verdünnungsreihe rehydriert. Die Proben verblieben für jeweils 5 min in den Lösungen. Zunächst wurde zwei Mal mit 100 %igem Ethanol, danach mit 96 %igem Ethanol, anschließend mit 70 %igem Ethanol, folgend mit 50 %igem Ethanol und abschließend in dH₂O hydriert. Die Objektträger wurden vorsichtig abgeklopft, trocken gewischt und in der zuvor mit dH₂O befeuchteten Färbekammer ausgelegt. Anschließend wurde Proteinase K, welche mit 0,05 M Tris-HCl mit dem pH 7,6 auf 1/50 verdünnt worden war, zu jeweils 50 µl auf jeden Schnitt zu Andauung aufgetragen. Für die Herstellung von 0,05 M Tris-HCl mit dem pH 7,6 wurden zunächst 303 mg Tris-Base in dH₂O gelöst und durch Zugabe von HCl auf einen pH von 7,6 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung mit dH₂O zu 50 ml aufgefüllt. Die Schnitte wurden nachfolgend für 5 min bei 37 °C im Inkubationsschrank inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger abgeklopft und drei Mal für jeweils 10 min in TBS (*tris-buffered saline*, trisgepufferte Salzlösung) gewaschen, bevor die Präparate durch Inkubation bei Raumtemperatur für eine Stunde mit 50 µl 5 % BSA in TBS geblockt wurden. Nach einer Stunde wurden die Objektträger abgeklopft, bevor 50 µl des in 5 % BSA in TBS verdünnten ersten Antikörpers hinzugegeben wurden.

Zur Herstellung von TBS wurden 121 g Tris und 175 g NaCl in 1800 ml dH₂O gelöst, mit HCl auf einen pH von 7,6 eingestellt, mit dH₂O auf 2000 ml aufgefüllt und das Produkt anschließend zur Verwendung auf 1/10 verdünnt. Zur Herstellung von 5 % BSA in TBS wurden 50 g BSA in einem Liter TBS gelöst.

Als erster Antikörper wurde entweder der Laminin-111-Antikörper oder der Fibronectin-Antikörper verwendet. Auf einem Objektträger waren für jeden Färbvorgang jeweils zwei Präparate aufgetragen. Eines wurde in diesem Schritt mit dem ersten Antikörper behandelt und das verbleibende Präparat wurde stattdessen mit 50 µl 5 % BSA in TBS behandelt und diente als Negativkontrolle. Die Objektträger wurden nachfolgend erneut für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend abgeklopft. Bevor der zweite Antikörper hinzuzufügen war, wurden die Präparate wie zuvor drei Mal für jeweils 10 min in TBS gewaschen. Die folgenden Schritte wurden aufgrund der Lichtempfindlichkeit des zweiten Antikörpers im Halbdunkeln durchgeführt. Von dem ebenfalls in 5 % BSA in TBS verdünnten zweiten Antikörper, welcher sich gegen den jeweils zuerst verwendeten Antikörper richtete, wurden ebenfalls 50 µl aufgetragen und bei Raumtemperatur für eine Stunde bei Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger ein letztes Mal abgeklopft und drei Mal für je 10 min in TBS gewaschen. Die Präparate wurden im nächsten Schritt trocken abgewischt, bevor sie unter Zuhilfenahme einiger Tropfen Eindeckmediums mit einem Deckglas versehen wurden. Bis zur Digitalisierung der Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden diese bei 4 °C dunkel gelagert.

Die Laminin-IF unterschied sich von der Fibronectin-Färbung nur durch die verwendeten Antikörper. Bei der Fibronectin-IF wurde als erstes ein leporider anti-Fibronectin-Antikörper in einer Verdünnung von 1/100 aufgetragen. Bei dem zweiten Antikörper handelte es sich um einen fluoreszierenden Antikörper kaprinen Ursprungs, welcher sich gegen leporide Antigene richtete und in einer Verdünnung von 1/1000 aufgetragen wurde. Für die Laminin-111-IF wurde zunächst ein anti-Laminin-Antikörper leporider Herkunft auf 1/25 verdünnt eingesetzt, gefolgt von einem kaprinen Fluoreszenz-Antikörper, welcher auf 1/200 verdünnt wurde und sich ebenfalls gegen leporide Antigene richtete. Von der Wahl der Antikörper und ihrer jeweiligen Verdünnung ausgenommen, gab es keine weiteren Unterschiede zwischen den beiden Immunfluoreszenzfärbungen. Tabelle 11 gibt Aufschluss über die für die Färbungen verwendeten Materialien.

Tabelle 11: Materialien für die Immunfluoreszenz-Färbung

Material/Substanz	Menge	Hersteller
Färbekasten Hellendahl	n. a.	Th. Geyer GmbH & Co. KG 71272 Renningen
Färbegestell Bestellnummer: 2481	n. a.	Gerhard Menzel B.V. & Co. KG 38116 Braunschweig

Material/Substanz	Menge	Hersteller
Deckgläser / Cover slips 24 x 60 mm #1	n. a.	Gerhard Menzel B.V. & Co. KG 38116 Braunschweig
Dako Fluorescent Mounting Medium	n. a.	Dako North America Inc. 93013 Carpinteria, USA
Ethanol (99 % vollvergällt)	n. a.	Th. Geyer GmbH & Co. KG 71272 Renningen
Xylol z. A. min. 96 %	n. a.	Th. Geyer GmbH & Co. KG 71272 Renningen
Kimtech Science (Präzisionstücher)	n. a.	Kimberly-Clark GmbH 56070 Koblenz/Rheinhafen
Dako Proteinase K	n. a.	Dako North America Inc. 93013 Carpinteria, USA
BSA (Bovines Serumalbumin)	n. a.	PAA Laboratories GmbH 4061 Pasching, Österreich
Herstellung Tris-HCl		
Tris-Base	0,303 g	Roche Diagnostics GmbH 68305 Mannheim
HCl	Dosieren zu pH 7,6	MERCK KGaA 64293 Darmstadt
dH ₂ O	<i>Ad</i> 50 ml	n. a.
Herstellung 10x TBS pH 7,6		
Tris	121 g	Roche Diagnostics GmbH 68305 Mannheim
Natriumchlorid	175 g	MERCK KGaA 64293 Darmstadt

Material/Substanz	Menge	Hersteller
dH ₂ O	<i>Ad</i> 2000 ml	n. a.
Antikörper für die Laminin-Färbung		
1. Antikörper, Laminin-Ak Rb p-Ab to Laminin (Abcam) Ab11575 rabbit IgG	n. a.	Discovery Drive Cambridge Biomedical Campus CB2 0AX Cambridge, UK
2. Antikörper Goat anti rabbit Alexa488 A11008	n. a.	Thermo Fisher Scientific 02451 Waltham, USA
Antikörper für Fibronectin-Färbung		
1. Antikörper, Fibronectin-Ak Ab2413 anti-Fibronectin rabbit + polyclonal von Abcam (GR3247081-2)	n. a.	Discovery Drive Cambridge Biomedical Campus CB2 0AX Cambridge, UK
2. Antikörper Goat anti rabbit Cy3 (Bestellnummer: 111-165- 144)	n. a.	DIANOVA GmbH 20354 Hamburg

2.5.5 Fluoreszenzmikroskopie

Im ersten Schritt der Fluoreszenzmikroskopie wurde der Objektträger, auf welchem sich die Negativkontrolle befand, begutachtet und es wurde überprüft, ob diese tatsächlich negativ ausgefallen war und die Positivkontrolle auf demselben Objektträger im Vergleich dazu deutlich positiv ausfiel. War dies der Fall, wurde davon ausgegangen, dass die Immunfluoreszenzfärbung erfolgreich verlaufen war. Unter Aufsicht wurden von jedem Präparat mit Hilfe der Kamera des Fluoreszenzmikroskops je sechs Aufnahmen in 100-facher- sowie 400-facher Vergrößerung erstellt. Die Laminin-Präparate wurden dafür 400 ms in 100-facher Vergrößerung und 200 ms in 400-facher Vergrößerung belichtet. Bei den Fibronectin-Präparaten wurden 100-fach vergrößerte Aufnahmen mit einer Belichtungszeit von 600 ms erstellt und bei 400-facher Vergrößerung für 300 ms belichtet. Von diesen Richtwerten wurde in geringem Maße abgewichen, wenn die Färbung deutlich unterschiedlicher Intensität war. Mit Hilfe der Sättigungsanzeige des zugehörigen Computerprogramms konnte sichergestellt werden, dass Aufnahmen weder zu stark noch

zu schwach belichtet waren. So wurde gewährleistet, dass alle Aufnahmen ähnliche Belichtungs- und Sättigungseigenschaften aufwiesen und dementsprechend untereinander vergleichbar waren. Zur Darstellung der Laminin-IF wurde der FITC44-Filter angewandt, während Fibronectin-Aufnahmen mittels TexRed-Filter erstellt wurden. Die genaue Bezeichnung der verwendeten Software ist Tabelle 12 zu entnehmen.

Tabelle 12: Materialien für die Fluoreszenzmikroskopie

Material/Substanz	Menge	Hersteller
Zen2.6 blue pro	n. a.	Carl Zeiss AG 73447 Oberkochen

2.5.6 Scoring

Die mittels Fluoreszenzmikroskop erstellten Aufnahmen wurden zunächst so sortiert, dass sie jederzeit dem einzelnen Versuchstier und damit auch dem Genotyp und der Therapiegruppe zuzuordnen waren. Im nächsten Schritt wurde diese Kennzeichnung durch einen zufälligen Zahlencode ersetzt, der keine Rückschlüsse auf Genotyp oder Therapie mehr zuließ. Die so verblindeten Bilddateien wurden drei Personen ausgehändigt, welche angewiesen waren, die Bilder anhand histologischer Kriterien auf einer Skala von null bis drei in Intervallen von je 0,5 zu bewerten. Die Bewertung wurde anhand der Kriterien in Tabelle 13, Tabelle 14, Tabelle 15 und Tabelle 16 vorgenommen. Die auf diese Weise erhobenen Zahlenwerte wurden im nächsten Schritt entblindet und dem jeweiligen Versuchstier zugeordnet. Aufnahmen der Fibronectin-Färbung in 100-facher Vergrößerung dienten der Einschätzung der tubulointerstitiellen Fibrose, während die 400-fach vergrößerten Bilder zur Begutachtung der glomerulären Fibrose verwendet wurden. Analog dazu wurden 100-fach vergrößerte Laminin-IF-Aufnahmen für die Einschätzung der tubulointerstitiellen Matrixakkumulation verwendet und 400-fach vergrößerte Bilder zur Bewertung der glomerulären Matrixakkumulation herangezogen.

Tabelle 13: Einteilung der tubulointerstitiellen Fibrose

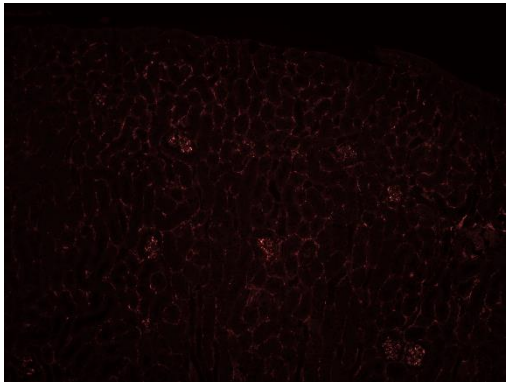
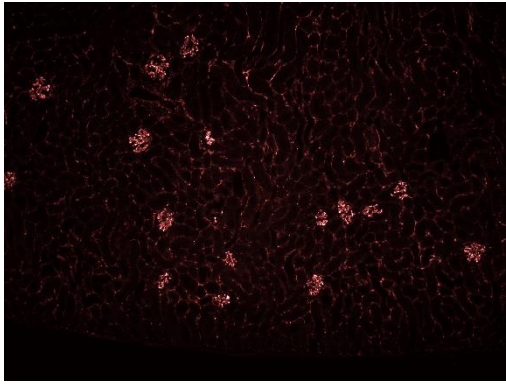
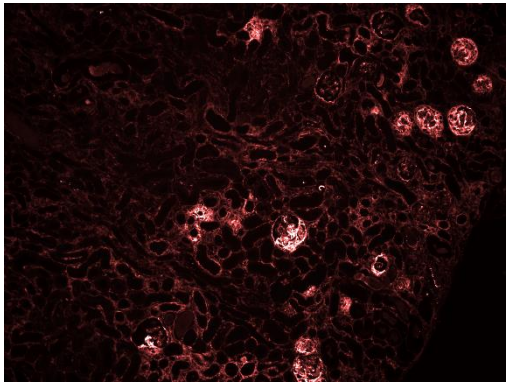
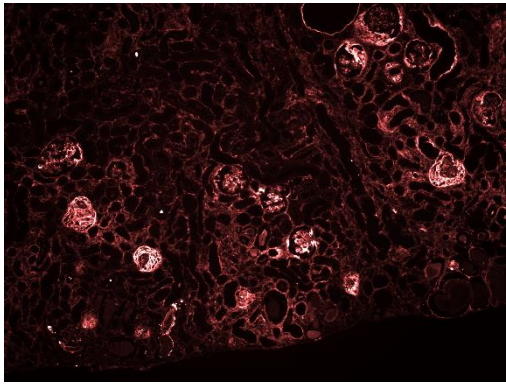
Score	Beispielbild	Beschreibung
Fibronectin-IF, 100-fache Vergrößerung (tubulointerstitielle Fibrose)		
0		Klar erkennbare tubuläre Struktur, vereinzelt zarte Signalanreicherungen, keine Fibroseherde
1		Interstitielle Signalanreicherung bei klar erhaltener tubulointerstitieller Struktur, wenige interstitielle Fibroseherde
2		Deutlich fibrotische Areale mit Signalanreicherung im Interstitium, geordnete tubuläre Struktur teilweise eingeschränkt
3		Ausgedehnte interstitielle Narbengebiete mit sehr deutlicher Signalanreicherung, tubulointerstitielle Struktur großflächig durch fibrotische Areale mit unregelmäßigen Tubuli ersetzt

Tabelle 14: Einteilung der glomerulären Fibrose

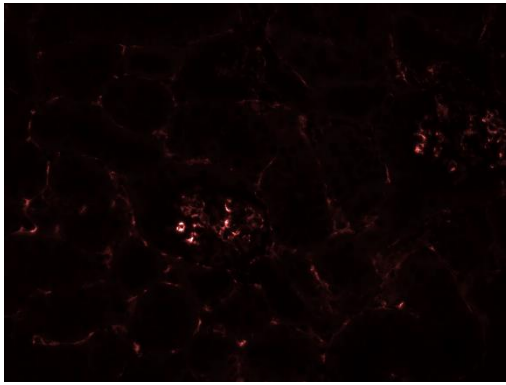
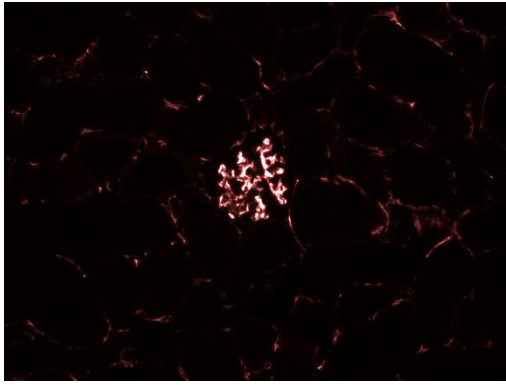
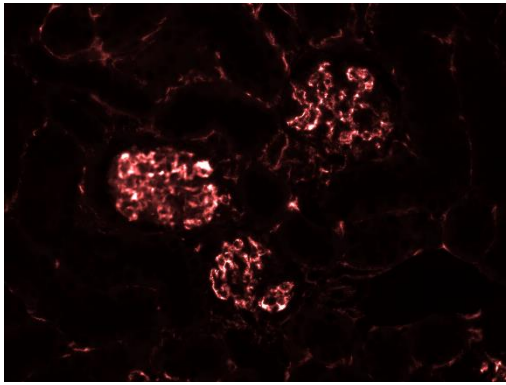
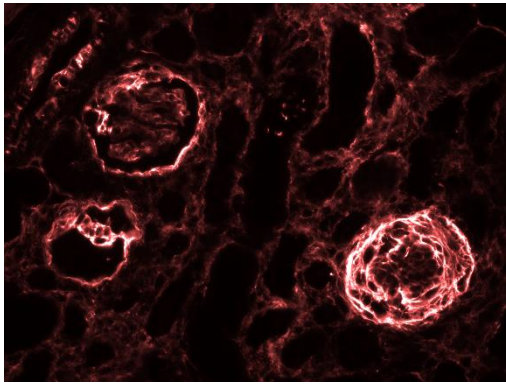
Score	Beispielbild	Beschreibung
Fibronektin-IF, 400-fache Vergrößerung (glomeruläre Fibrose)		
0		Klar erkennbare glomeruläre Struktur mit erhaltenen Kapillaren sowie Bowmankapsel und Kapselraum, vereinzelt mesangiale Signalanreicherungen
1		Mesangial schwache Anreicherung des Signals bei erhaltener Kapillar- und Kapselstruktur
2		Mesangial deutliche Signalanreicherung, Bowmankapselraum teilweise sklerotisch ausgefüllt, Kapillarstruktur teilweise aufgehoben
3		Weitgehend aufgehobene Kapillarstruktur mit unregelmäßigem Bowmankapselraum, deutliche glomeruläre Signalanreicherung und Kapselfibrose

Tabelle 15: Einteilung der tubulointerstitiellen Matrixakkumulation

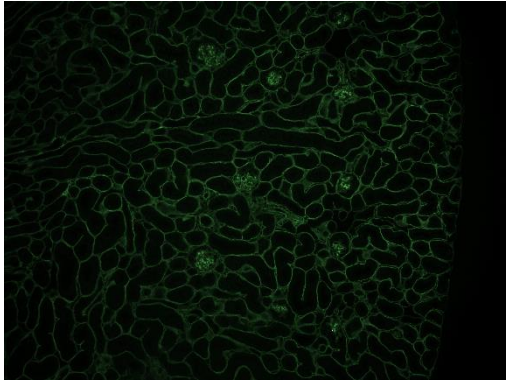
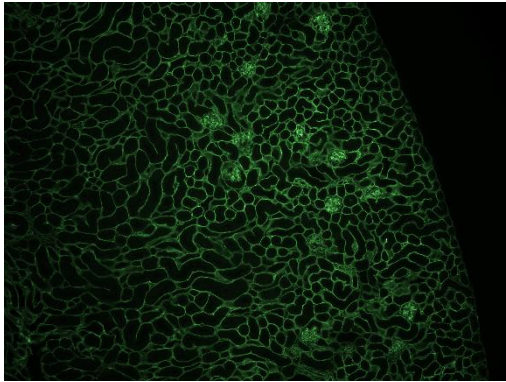
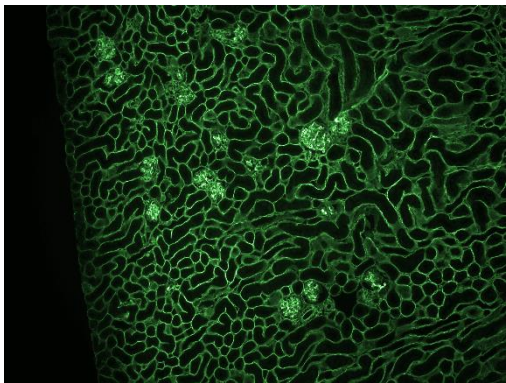
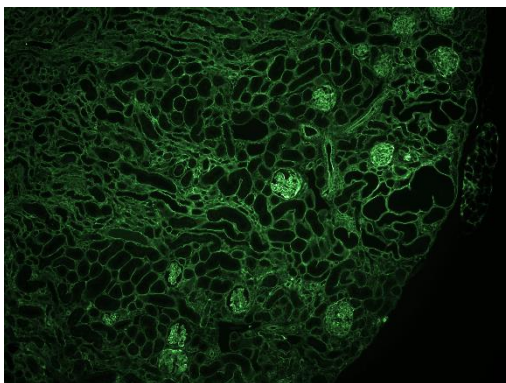
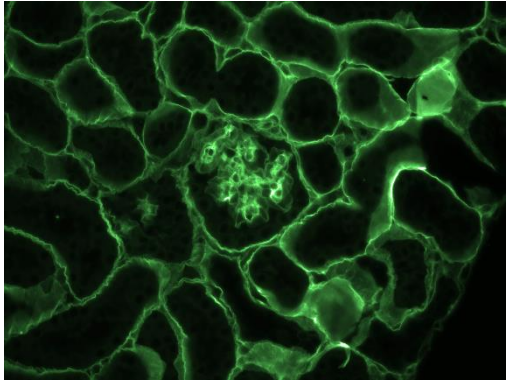
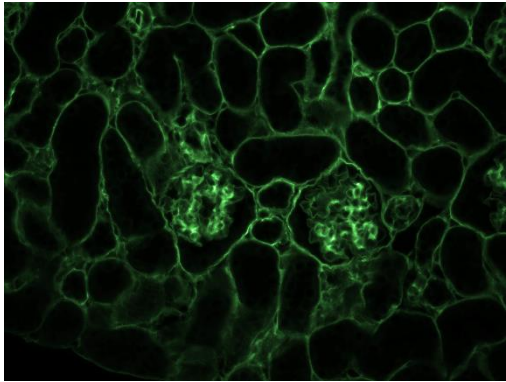
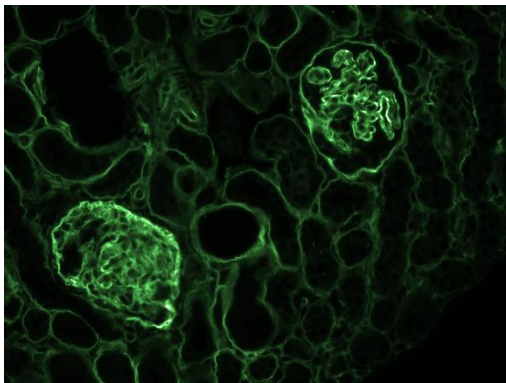
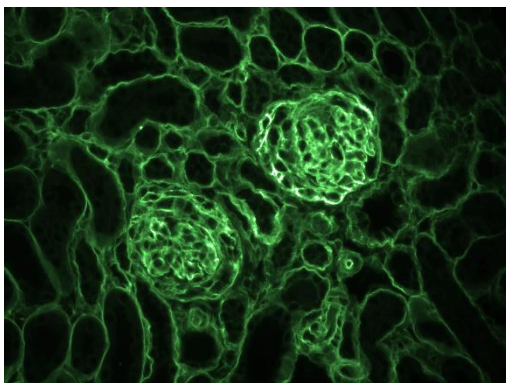
Score	Beispielbild	Beschreibung
Laminin-IF, 100-fache Vergrößerung (tubulointerstitielle Matrixakkumulation)		
0		Schmales Interstitium, erhaltene tubuläre Struktur ohne deutliche Signalanreicherungen
1		Tubuläre Struktur weitgehend erhalten und gleichmäßig, vereinzelt signalanreichernde Areale mit verbreiterem Interstitium
2		Tubuli teilweise unregelmäßig angeordnet, deutlich verbreitertes Tubulointerstitium mit deutlicher Signalanreicherung
3		Strukturelle Ordnung der Tubuli weitgehend aufgehoben, kräftige Signalanreicherungen im stark verbreiterten Interstitium

Tabelle 16: Einteilung der glomerulären Matrixakkumulation

Score	Beispielbild	Beschreibung
Laminin-IF, 400-fache Vergrößerung (glomeruläre Matrixakkumulation)		
0		Klar erkennbare kapilläre Struktur, regelmäßige Struktur der Bowmankapsel und des Kapselraumes
1		Erhaltene Kapillarstruktur, beginnende Unregelmäßigkeiten der Bowmankapsel mit geringer mesangialer Signalanreicherung
2		Kapillarstruktur teilweise aufgehoben, verbreiterte Kapsel, teilweise ausgefüllter Kapselraum, deutliche mesangiale Signalanreicherung
3		Kapillarstruktur weitgehend aufgehoben, Kapselraum vollständig sklerotisch ausgefüllt, starke mesangiale sowie kapsuläre Signalanreicherung

2.6 Harnstoff- und Cholesterinmessung im Serum

Im Rahmen der Präparation wurde Blut mittels Herzpunktion gewonnen. Das Blut gerann anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das geronnene Blut zentrifugiert, woraufhin das Serum im Überstand abpipettiert und erneut zentrifugiert wurde. Das im Überstand befindliche Plasma wurde entnommen und für die Analyse verwendet. Der exakte Ablauf der Plasmagewinnung ist Kapitel 2.3.2 zu entnehmen.

Das auf diese Weise gewonnene Serum wurde in Kooperation mit der Abteilung für klinische Chemie der Universitätsmedizin Göttingen untersucht. Die Analyse erfolgte im Rahmen der Routinelaboranalysen der Abteilung. Gemessen wurden BUN (*blood urea nitrogen*, Blut-Harnstoff-Stickstoff) und das Gesamtcholesterin. Mit Hilfe der BUN-Bestimmung wurde auf die Harnstoff-Konzentration rückgeschlossen. Da ein Mol BUN bei dieser Methode einem Mol Harnstoff entspricht, ist die Angabe der Stoffmengenkonzentration in mmol/l beider Parameter identisch. Die Konzentration der Harnstoffmasse im Serum in mg/dl kann mit Hilfe eines Umrechnungsfaktors errechnet werden.

2.7 Statistische Analyse

Alle statistischen Analysen und Grafiken wurden mit Hilfe von IBM SPSS Statistics (Version 26.0.0.0, 64-Bit-Version) erstellt. Exakte Bezeichnung und Entwickler des Programms sind Tabelle 17 zu entnehmen. Als Signifikanzniveau wurde für alle Variablen und Tests ein p-Wert kleiner als 0,05 vorausgesetzt.

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz wurden ihrem Ordinalskalenniveau entsprechend ausschließlich unter Zuhilfenahme nicht parametrischer Tests interpretiert. Für die Analyse von Unterschieden zwischen den vier verschiedenen Genotypen innerhalb einer Therapiegruppe wurde der Kruskal-Wallis-Test angewandt. Unterschiede zwischen den Therapiegruppen „Neph“ und „ACEi“ wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt.

Für die Variablen Proteinurie, Gewicht, Gewichtsveränderung, Serumharnstoff und Serumcholesterin, welche metrische Eigenschaften haben, wurde ein anderer statistischer Ansatz genutzt.

Die Unterschiede der Proteinurie in Abhängigkeit von dem Geschlecht wurden mittels t-Test für nicht verbundene Stichproben errechnet, insofern Normalverteilung und Varianzhomogenität statistisch angenommen werden konnten. Waren in einer der verglichenen Gruppen die Werte einer Variablen nicht normalverteilt, wurde stattdessen für diese Variable der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Zur Identifikation von nicht normalverteilten Daten wurde der Shapiro-Wilk-Test angewendet. Wiesen die normalverteilten Werte der Gruppen zueinander keine Varianzhomogenität auf, wurde statt

des t-Tests auf den Welch-Test zurückgegriffen. Varianzhomogenität wurde bei einem nicht signifikanten Ergebnis des Levene-Tests angenommen.

Unterschiede bezüglich der Proteinurie, dem Gewicht, der Gewichtsveränderung, dem Harnstoff und des Cholesterins in Abhängigkeit vom Genotyp wurden mittels einfaktorieller ANOVA ohne Messwiederholung bestimmt, wenn die zugehörigen Daten normalverteilt und varianzhomogen waren. Bei fehlender Normalverteilung der Werte, welche mittels Shapiro-Wilk-Test errechnet wurde, wurde für die entsprechende Variable der Kruskal-Wallis-Test genutzt. Waren die Daten normalverteilt bei fehlender Varianzhomogenität nach Levene-Test, wurde mit der Welch-ANOVA gerechnet. Als *Post-hoc*-Tests wurden für die ANOVA der Tukey-Test und bei Anwendung der Welch-ANOVA der Dunnett-T3-Test angewendet. Für den *Post-hoc*-Vergleich signifikanter Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests wurde die Bonferroni-Korrektur genutzt. Analog dazu wurde für den Vergleich von metrischen Variablen in Abhängigkeit von der Therapiegruppe vorgegangen.

Für Versuchstiere, welche nach der Nephrektomie einer Therapie mit ACEi zugeführt wurden, wurde ein weiterer Vergleich gerechnet. Es wurde die Höhe der Proteinurie kurz nach der Operation mit der einen Monat später verglichen. Da es sich hierbei um abhängige Stichproben handelte, mussten für die Analyse andere Tests angewandt werden, als es für unabhängige Stichproben notwendig war. Konnte Normalverteilung für die Differenzen der abhängigen Daten angenommen werden, so wurde mit dem t-Test für abhängige Stichproben gerechnet, ansonsten wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test genutzt.

Die verfolgten statistischen Vorgehensweisen ermöglichten es, für jeden angestrebten Vergleich bei allen Variablen den jeweils stärksten statistischen Test zu verwenden, ohne dabei die mathematischen Voraussetzungen von einem der Tests zu verletzen. Der dargestellte Ansatz wurde im Rahmen der statistischen Beratung für Studierende des Instituts für medizinische Statistik der Universitätsmedizin Göttingen von mir vorgestellt und durch die Mitarbeiter des Instituts in seiner mathematischen Richtigkeit bestätigt.

Daten, welche von Versuchstieren mit *Col4a3^{-/-}*-Genotyp erhoben wurden, wurden aufgrund der nicht vergleichbaren Behandlungen und des unterschiedlichen Alters nicht mit den Tieren der restlichen Gruppen verglichen und dienten lediglich als Referenzgruppe.

Tabelle 17: Materialien für die statistische Analyse

Material/Substanz	Menge	Hersteller
IBM SPSS Statistics (Version 26.0.0.0, 64-Bit-Version)	n. a.	International Business Machines Corporation (IBM) 10504 Armonk, USA

2.8 Geräte

In Tabelle 18 sind im Folgenden alle verwendeten Laborgeräte mit Zuordnung zu den jeweiligen Methoden in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet.

Tabelle 18: Geräte

Gerät	Verwendung	Hersteller
Biometra TProfessional (PCR-Thermozykler)	Polymerasekettenreaktion	Analytik Jena AG 07745 Jena
Bio Rad Model No.: Universal Hood III (Gel-Dokumentations- System)	Digitalisierung der Proteingele	Bio-Rad Laboratories GmbH 80939 München
Centrifuge 5424R	Chloroform-Methanol- Fällung	Eppendorf AG 22339 Hamburg
Duomax 1030 (Wippschüttler)	SDS-PAGE	Heidolph Instruments GmbH & Co. 91126 Schwabach
Eppendorf Thermomixer Compact	DNA-Isolation aus Schwanzbiopsien, Chloroform-Methanol- Fällung	SIGMA-Aldrich GmbH Jetzt: MERCK KGaA 64293 Darmstadt
GE Healthcare EPS 301 Electrophoresis Power Supply	SDS-PAGE	Thermo Fisher Scientific 02451 Waltham, USA
IKA RH basic Magnetrührer	Herstellung von 4 % PFA in PBS	IKA Werke GmbH & Co. KG 79219 Staufen
IKA: Vortex Schüttler VF2	Genotypisierung, Chloroform-Methanol- Fällung, Herstellung des ACEi-Trinkwassers, SDS- PAGE	W. Krannich GmbH & Co. KG 37079 Göttingen

Gerät	Verwendung	Hersteller
Labtherm TR-L 288 (Heizblock)	DNA-Isolation aus Schwanzbiopsien, SDS- PAGE	Liebisch 33649 Bielefeld
Leica EG 1150C (Kühlplatte)	Paraffineinbettung	Leica Biosystems Nussloch GmbH 69226 Nussloch
Leica EG 1150H (Ausgießstation)	Paraffineinbettung	Leica Biosystems Nussloch GmbH 69226 Nussloch
Leica HistoCore Pearl (Einbettautomat)	Paraffineinbettung	Leica Biosystems Nussloch GmbH 69226 Nussloch
Leica RM 2165 (Rotationsmikrotom)	Paraffinschnitte	Leica Biosystems Nussloch GmbH 69226 Nussloch
Mikro 200 R Hettich Zentrifuge	DNA-Isolation aus Schwanzbiopsien, Chloroform-Methanol- Fällung, SDS-PAGE, Herstellung des ACEi- Trinkwassers, Präparation	Andreas Hettich GmbH & Co. KG 78532 Tübingen
Panasonic CO ₂ Incubator MCO-19AIC(UV)-PE (Inkubationsschrank)	IF-Färbung	Panasonic Healthcare Co., Ltd. 1-1-1 Sakata, Oizumi-Machi, Ora-Gunma 370-0596, Japan
SANYO Convection Oven Model MOV-112F (Wärmeschrank)	Paraffinschnitte	SANYO Electric Co., Ltd. 2-1-61 Shiromi, Chuou-ku, Osaka City, Osaka 540- 6226, Japan
Typ 1052 (Wasserbad)	Paraffinschnitte	Gesellschaft für Labortechnik mbH 30938 Burgwedel

Gerät	Verwendung	Hersteller
Typ 12801 (Wärmeplatte)	Paraffinschnitte	MEDAX GmbH & Co. KG 24537 Neumünster
UV-Transsimulator	Agarosegelelektrophorese	Bio Doc Analyze Biometra; Analytik Jena AG 07745 Jena
XCell SureLock Mini-Cell (Elektrophoresekammer)	SDS-PAGE	Thermo Fisher Scientific 02451 Waltham, USA
ZEISS Axiocam 503 mono (Fluoreszenzmikroskop) Laminin: FITC44-Filter Fibronectin: TexRed-Filter	IF-Mikroskopie	Carl Zeiss AG 73447 Oberkochen

3 Ergebnisse

Im Folgenden sollen die Ergebnisse des Experimentes beleuchtet werden. Zunächst werden die Resultate der Proteinuntersuchung im Urin gezeigt. Harnstoffwerte und Cholesterinspiegel im Serum werden anschließend besprochen. Zuletzt werden die Ergebnisse der Bewertung von Matrixakkumulation und Fibrosierung des Nierenparenchyms dargestellt.

Mit Ausnahme der Ergebnisse der Immunfluoreszenz sind alle Daten als Boxplots dargestellt. Hierbei gibt die dunkle Linie in der Mitte der Boxen den Median an. Die Box umfasst die Daten der 25. Perzentile bis zur 75. Perzentile. Die Länge der Fühler der Box ist durch den kleinsten oder größten Wert definiert, es sei denn dieser ist weiter als das Anderthalbfache der Höhe der Box von der 25. beziehungsweise 75. Perzentile entfernt. Derartige Werte sind als Ausreißer in Form von Punkten dargestellt. Für die metrisch skalierten Variablen wird im Text das arithmetische Mittel unter Angabe der Standardabweichung verwendet.

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz sind aufgrund ihres Ordinalskalenniveaus abweichend davon in Häufigkeitspyramiden dargestellt. Zur intuitiveren Interpretation sind für diese Daten im Text zusätzlich das arithmetische Mittel und die Standardabweichung angegeben. Obwohl dies bei ordinal skalierten Daten nicht Mittel der Wahl ist, erleichtert es die Interpretation der Ergebnisse für den Leser erheblich. Für die statistische Analyse der betreffenden Daten hatte die Betrachtung des arithmetischen Mittels keine Bedeutung, da diese dem Skalenniveau entsprechend mit Hilfe nicht parametrischer Tests errechnet wurde. Diese Tests verwenden mittlere Ränge, welche allerdings wenig intuitiv erfassbar sind und nur eine geringe Hilfestellung bei der Dateninterpretation bieten.

Die Farbgebung der Darstellungen ist unabhängig von der Darstellungsform identisch gehalten. Daten von Tieren, welche im Verlauf keiner Nephrektomie unterzogen wurden („Sham“-Gruppe) und Daten, welche vor der Operation erhoben wurden, werden in hellgrün dargestellt. Ergebnisse von nephrektomierten Tieren ohne ACEi-Therapie („Neph“-Gruppe) sind in hellblau und solche von nephrektomierten Tieren mit nachfolgender ACEi-Therapie („ACEi“-Gruppe) rot dargestellt. Wildtypen sind grün, *Col4a3*^{+/-}-Tieren in orange, Podocin heterozygot mutierte Tiere lila, doppelt heterozygote Tiere gelb und homozygot *Col4a3*-deletierte Tiere in dunkelrot kenntlich gemacht.

Signifikante Ergebnisse sind ebenfalls in allen Darstellungen einheitlich durch eine Klammer über den unterschiedlichen Gruppen gekennzeichnet. Diese Klammer selbst ist mit einem Stern versehen, wenn der p-Wert des signifikanten Ergebnisses unter 0,05 lag. Zwei Sterne symbolisieren einen p-Wert von unter 0,01, während drei Sterne für einen p-Wert stehen, welcher kleiner als 0,001 war. Der statistische Test, welcher für die

Errechnung des jeweiligen signifikanten Ergebnisses verwendet wurde, wird in der jeweils zugehörigen Legende aufgeschlüsselt.

3.1 Proteinurie

Alle Daten der Proteingelektrophorese, welche wie in Kapitel 2.4 beschrieben erstellt wurden, sind als Boxplots dargestellt. Die Ordinatenachse ist in jeder der folgenden Grafiken identisch skaliert, um eine optische Vergleichbarkeit der Ergebnisse auch zwischen verschiedenen Abbildungen zu ermöglichen. Die Skalierung der Ordinate ergab sich aus der Höhe der relativen Albuminurie bei *Col4a3*^{-/-}-Versuchstieren, welche geschlechtsunabhängig im Mittel bei $12,59 \pm 0,50$ lag. Aus diesem Grund wurde der Abschnitt der Ordinatenachse in allen Grafiken von null bis 15 gewählt, wodurch diese in etwa einen Wertebereich abdeckt, welcher sich von den Ergebnissen nierengesunder Versuchstiere bis hin zu denen homozygot erkrankter Mäuse erstreckt. Dargestellt sind ausschließlich die Ergebnisse der Bestimmung der Albuminurie. Proteine größer und kleiner als Albumin wurden ebenfalls gemessen und statistisch analysiert. Es zeigte sich jedoch ein mit dem Albumin vergleichbarer Verlauf auch dieser Proteine im Urin, weswegen auf die zusätzliche Darstellung verzichtet wurde.

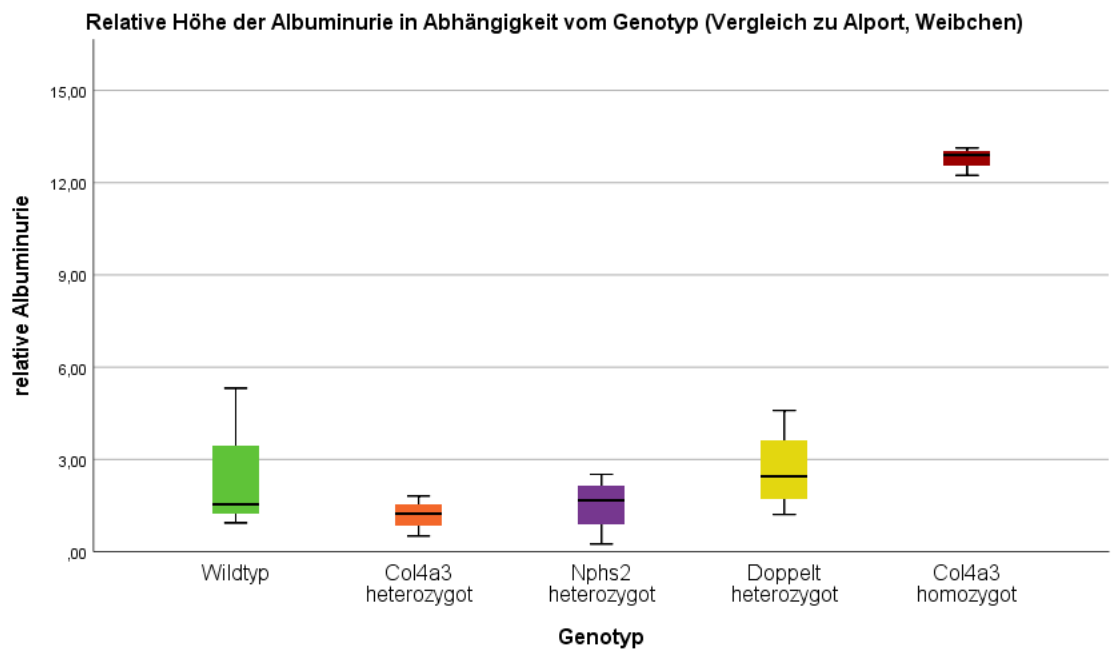


Abbildung 4: Relative Höhe der Albuminurie (Vergleich zu Alport, Weibchen) Dargestellt sind die relativen Werte der Proteinmenge im Urin abhängig vom Genotyp. Eine statistische Analyse wurde mangels Vergleichbarkeit der Versuchsgruppen nicht durchgeführt. Gezeigt sind nur Daten weiblicher Versuchstiere. Daten von Wildtyp-/*Col4a3*^{+/-}-/*Nphs2*^{R140Q/+}- und doppelt heterozygoten Versuchstieren sind ausschließlich von nephrektomierten Tieren ohne ACEi-Therapie im Alter von 180 Tagen erhoben. Die Daten der *Col4a3*^{-/-}-Tiere wurden in einem Alter von 60 Tagen erhoben. *Col4a3*^{-/-}-Tiere wurden nicht nephrektomiert. Die Gruppengröße betrug n = 4 bei *Nphs2*^{R140Q/+}- und doppelt heterozygoten Versuchstieren und n = 3 bei Wildtyp-/*Col4a3*^{+/-}- und homozygot erkrankten Tieren.

Die in Abbildung 4 gezeigten Daten sollen als Referenz zwischen den Versuchsgruppen des Experiments und homozygot erkrankten Tieren dienen. Während *Col4a3*^{-/-}-Versuchstiere geschlechtsunabhängig eine deutlich erhöhte Proteinmenge im Urin aufwiesen ($12,59 \pm 0,50$), bewegten sich die Ergebnisse der vier Versuchsgenotypen in einem großflächig noch physiologischen Rahmen im Vergleich mit nicht nephrektomierten Wildtyp-Versuchstieren (Weibchen: $2,11 \pm 0,58$; Männchen: $6,57 \pm 0,72$).

3.1.1 Geschlechtervergleich

Im Rahmen der statistischen Analyse der Proteinurie, fiel bereits bei der Betrachtung der durch SDS-PAGE erstellten Proteingele auf, dass Spuren männlicher Versuchstiere kräftiger gefärbt waren als die Spuren weiblicher Tiere. Bisher wurden in der Arbeitsgruppe Männchen und Weibchen nicht getrennt betrachtet, da vornehmlich mit Versuchstieren, welche einen deutlich schwereren Phänotyp aufwiesen, gearbeitet wurde. Bei diesen war keine deutliche Abweichung zwischen Weibchen und Männchen zu erkennen gewesen.

Um zu bestimmen, ob es sich bei den beobachteten Anfärbbarkeitsunterschieden um einen statistisch nachweisbaren Zusammenhang handelte, wurde vor dem statistischen Vergleich der verschiedenen Genotypen und Therapiegruppen ein Geschlechtervergleich angestrebt,

da davon abhängig gemacht wurde, ob Männchen und Weibchen in den nachfolgenden Untersuchungen gemeinsam oder getrennt zu betrachten waren.

Abbildung 5, Abbildung 6 und Abbildung 7 geben Aufschluss über die Höhe der Proteinurie vor Durchführung der Nephrektomie in Abhängigkeit vom Geschlecht und dem Genotyp.

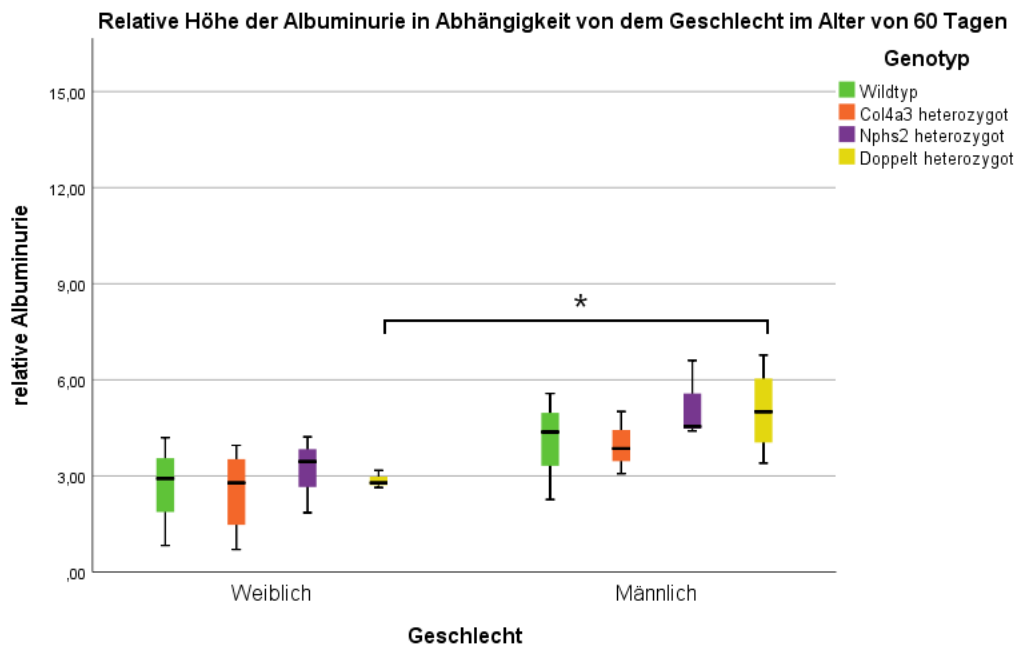


Abbildung 5: Relative Höhe der Albuminurie in Abhängigkeit von dem Geschlecht im Alter von 60 Tagen Gezeigt ist die relative Höhe der Albuminurie vor der Nephrektomie in Abhängigkeit von dem Geschlecht im Alter von 60 Tagen. Weibchen und Männchen gleichen Genotyps und gleichen Alters wurden jeweils miteinander verglichen. Doppelt heterozygote Weibchen ($2,86 \pm 0,28$) und Männchen ($5,04 \pm 1,40$) unterschieden sich signifikant voneinander ($p = 0,049$ nach t-Test). Die Gruppengröße war $n = 7$ für Weibchen mit $Col4a3^{+/-}$ -Genotyp, $n = 4$ für doppelt heterozygote Männchen und $n = 3$ in allen anderen Gruppen.

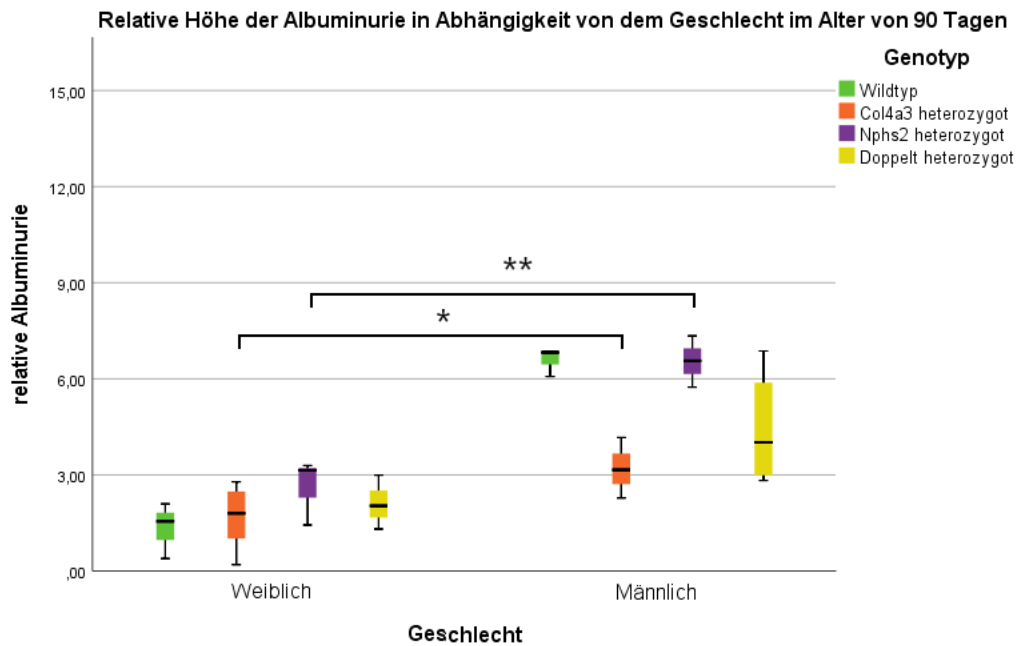


Abbildung 6: Relative Höhe der Albuminurie in Abhängigkeit von dem Geschlecht im Alter von 90 Tagen Gezeigt ist die relative Höhe der Albuminurie vor der Nephrektomie in Abhängigkeit von dem Geschlecht im Alter von 90 Tagen. Weibchen und Männchen gleichen Genotyps und gleichen Alters wurden jeweils miteinander verglichen. *Col4a3*^{+/-}-Weibchen ($1,68 \pm 0,97$) unterschieden sich signifikant von Männchen gleichen Genotyps ($3,19 \pm 0,77$) ($p = 0,027$ nach t-Test). Ebenso gab es signifikante Unterschiede zwischen *Nphs2*^{R140Q/+}-Weibchen ($2,62 \pm 1,03$) und -Männchen ($6,55 \pm 0,80$) ($p = 0,006$ nach t-Test). Die Gruppengröße betrug $n = 7$ für Weibchen mit *Col4a3*^{+/-}-Genotyp, $n = 4$ für doppelt heterozygote- und *Col4a3*^{+/-}-Männchen und $n = 3$ in allen anderen Gruppen.

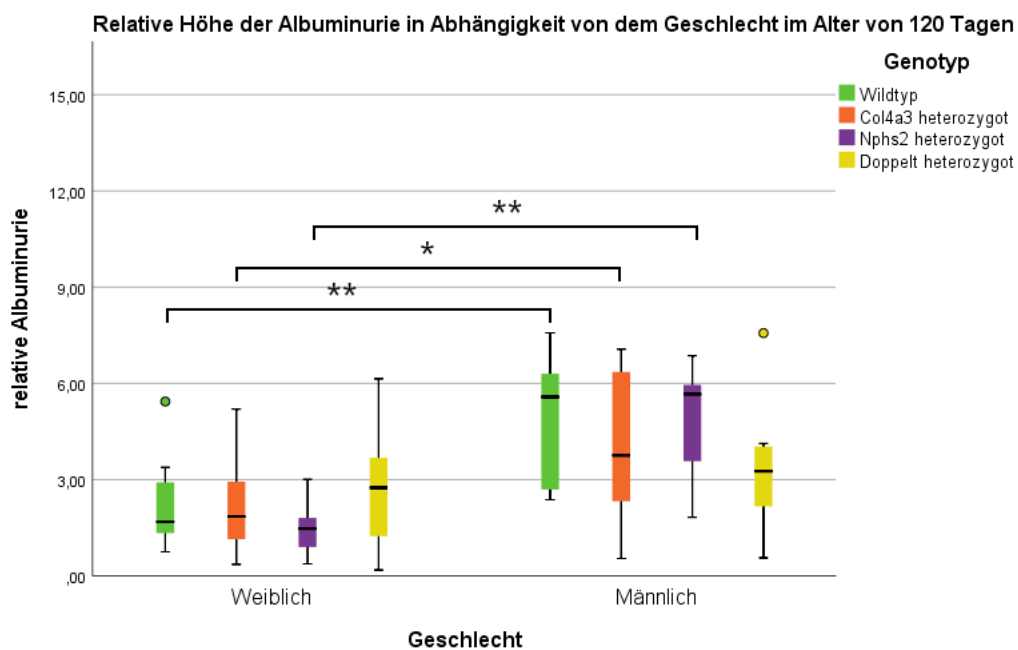


Abbildung 7: Relative Höhe der Albuminurie in Abhängigkeit von dem Geschlecht im Alter von 120 Tagen Gezeigt ist die relative Höhe der Albuminurie vor der Nephrektomie in Abhängigkeit von dem

Geschlecht im Alter von 120 Tagen. Weibchen und Männchen gleichen Genotyps und gleichen Alters wurden jeweils miteinander verglichen. Bei Wildtyp-Tieren unterschieden sich Weibchen ($2,24 \pm 1,46$) und Männchen ($4,94 \pm 1,95$) signifikant ($p = 0,004$ nach t-Test). Ebenso wie *Col4a3*^{+/-}-Weibchen ($2,11 \pm 1,48$) und Männchen identischen Genotyps ($4,14 \pm 2,28$) sich signifikant unterschieden ($p = 0,025$ nach t-Test), so war diese Differenz auch bei *Nphs2*^{R140Q/+}-Weibchen ($1,53 \pm 0,83$) und -Männchen ($4,78 \pm 1,86$) signifikant ($p = 0,001$ nach Welch-Test). Die Gruppengröße war $n = 11$ bei *Col4a3*^{+/-}-Weibchen, $n = 10$ bei *Col4a3*^{+/-}-Männchen und allen doppelt heterozygoten Tieren und $n = 9$ bei allen Wildtyp- und *Nphs2*^{R140Q/+}-Tieren.

Bereits im Alter von 60 bis 120 Tagen und damit vor Nephrektomie zeigten sich relevante Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen Versuchstieren, was in den oben dargestellten Abbildungen veranschaulicht ist. Der Zusammenhang war nicht bei allen Genotypen und Altersstufen signifikant, dennoch zeigte sich eine eindeutige Tendenz dazu, dass Männchen grundsätzlich mehr Proteine im Urin aufwiesen als vergleichbare Weibchen. Die Höhe der Proteinurie aller genetisch beeinträchtigten Tiere war betrachtet in Relation zu den Wildtyp-Versuchstieren zu keinem dieser drei Messzeitpunkte als pathologisch einzustufen.

In Abbildung 8, Abbildung 9 und Abbildung 10 stellt sich die relative Höhe der Proteinurie zum Messzeitpunkt kurz nach der Operation dar. Die Grafiken stellen die Ergebnisse für jede Therapiegruppe einzeln dar.

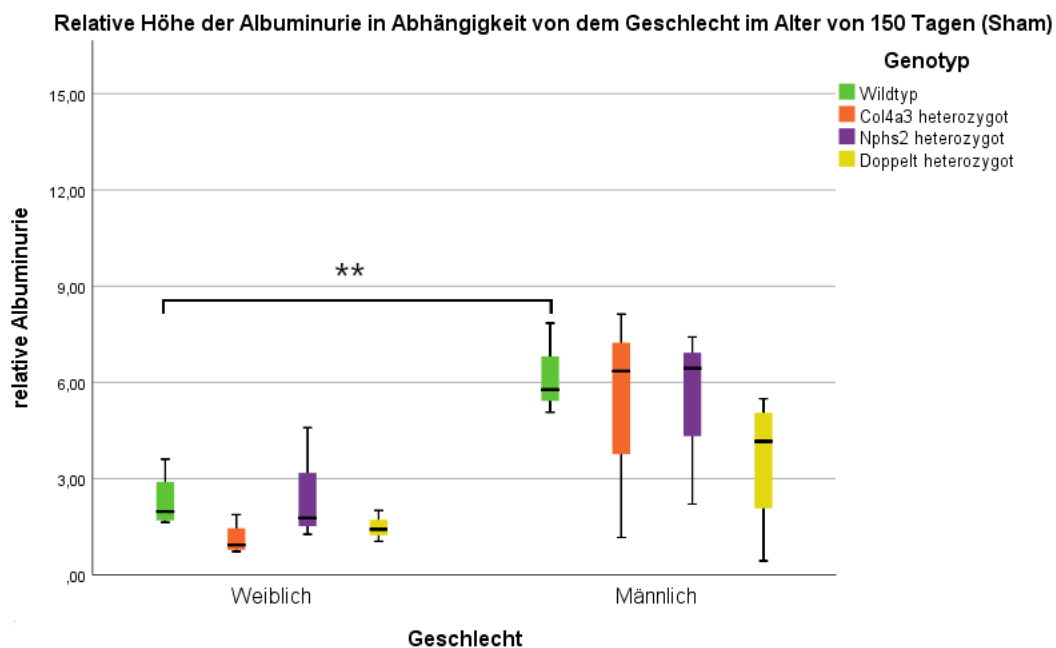


Abbildung 8: Relative Höhe der Albuminurie in Abhängigkeit von dem Geschlecht im Alter von 150 Tagen (Sham) Gezeigt ist die relative Höhe der Albuminurie der scheinoperierten Tiere in Abhängigkeit von dem Geschlecht im Alter von 150 Tagen. Weibchen und Männchen mit identischem Genotyp, gleicher Therapie und gleichen Alters wurden jeweils miteinander verglichen. Bei Wildtyp-Tieren unterschieden sich Weibchen ($2,30 \pm 0,90$) und Männchen ($6,23 \pm 1,45$) signifikant voneinander ($p = 0,007$ nach t-Test). Die Gruppengröße betrug $n = 4$ für Wildtyp- und *Col4a3*^{+/-}-Weibchen und doppelt heterozygote Männchen und $n = 3$ in allen anderen Gruppen.

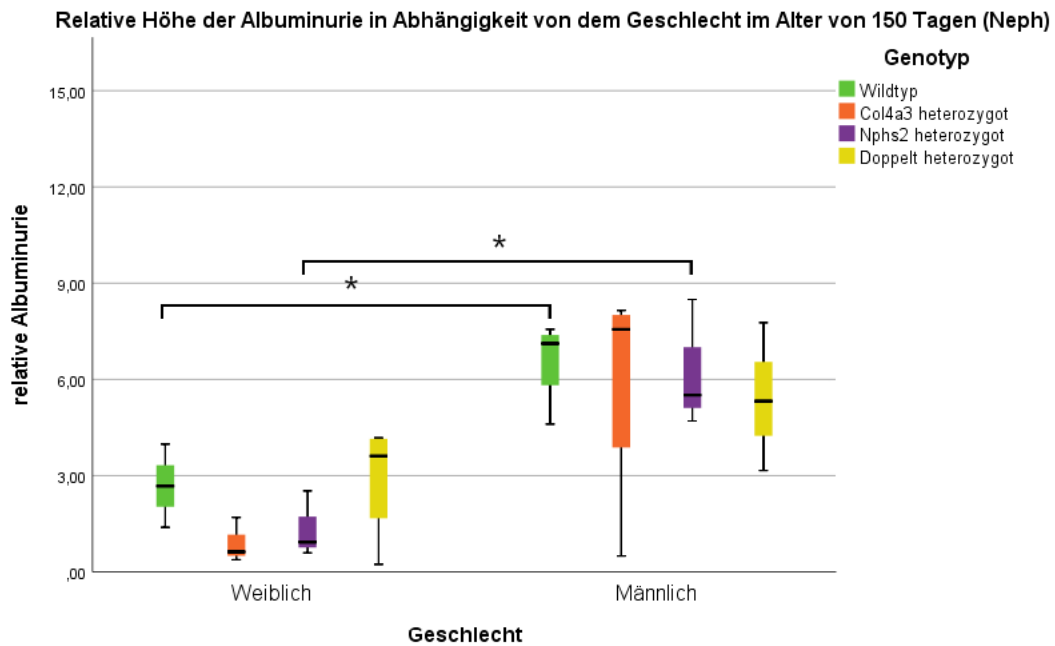


Abbildung 9: Relative Höhe der Albuminurie in Abhängigkeit von dem Geschlecht im Alter von 150 Tagen (Neph) Gezeigt ist die relative Höhe der Albuminurie der nephrektomierten Tiere ohne nachfolgende ACEi-Therapie in Abhängigkeit von dem Geschlecht im Alter von 150 Tagen. Weibchen und Männchen mit identischem Genotyp, gleicher Therapie und gleichen Alters wurden jeweils miteinander verglichen. Wildtyp-Weibchen ($2,68 \pm 1,29$) unterschieden sich signifikant von vergleichbaren Männchen ($6,60 \pm 1,35$) ($p = 0,012$ nach t-Test). Ebenso unterschieden sich *Nphs2*^{R140Q/+}-Weibchen ($1,35 \pm 1,03$) und vergleichbare Männchen ($6,24 \pm 1,99$) signifikant ($p = 0,020$ nach t-Test). Die Gruppengröße betrug $n = 4$ für Wildtyp- und *Col4a3*^{+/-}-Männchen und doppelt heterozygote Weibchen und $n = 3$ in allen anderen Gruppen.

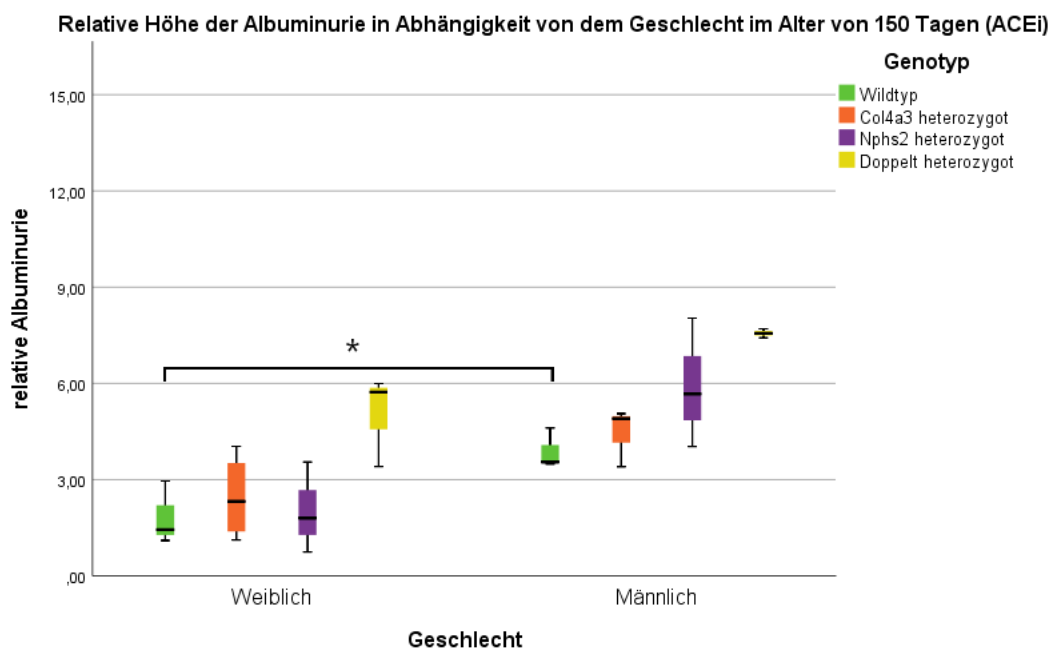


Abbildung 10: Relative Höhe der Albuminurie in Abhängigkeit von dem Geschlecht im Alter von 150 Tagen (ACEi) Gezeigt ist die relative Höhe der Albuminurie der mit ACEi behandelten Tiere in Abhängigkeit von dem Geschlecht im Alter von 150 Tagen. Weibchen und Männchen mit identischem

Genotyp, gleicher Therapie und gleichen Alters wurden jeweils miteinander verglichen. Bei diesen unterschieden sich Wildtyp-Weibchen ($1,83 \pm 0,99$) und -Männchen ($3,88 \pm 0,63$) signifikant voneinander ($p = 0,039$ nach t-Test). Die Gruppengröße betrug $n = 4$ für *Col4a3*^{+/-}-Weibchen und $n = 3$ in allen anderen Gruppen.

In den oben dargestellten Abbildungen ist gezeigt, dass sich der zuvor beobachtete Trend auch nach erfolgter Operation fortsetzte. Wie auch vor der Operation war dieser Zusammenhang nicht für alle Gruppen jederzeit signifikant. Die klare Tendenz, dass männliche Versuchstiere im Vergleich zu weiblichen Tieren gleichen Genotyps und gleicher Therapiegruppe mehr Proteine im Urin aufwiesen, war jedoch weiterhin konsistent.

Abbildung 11, Abbildung 12 und Abbildung 13 stellen die relative Albuminmenge im Urin einen Monat später und damit kurz vor der Tötung der Versuchstiere dar.

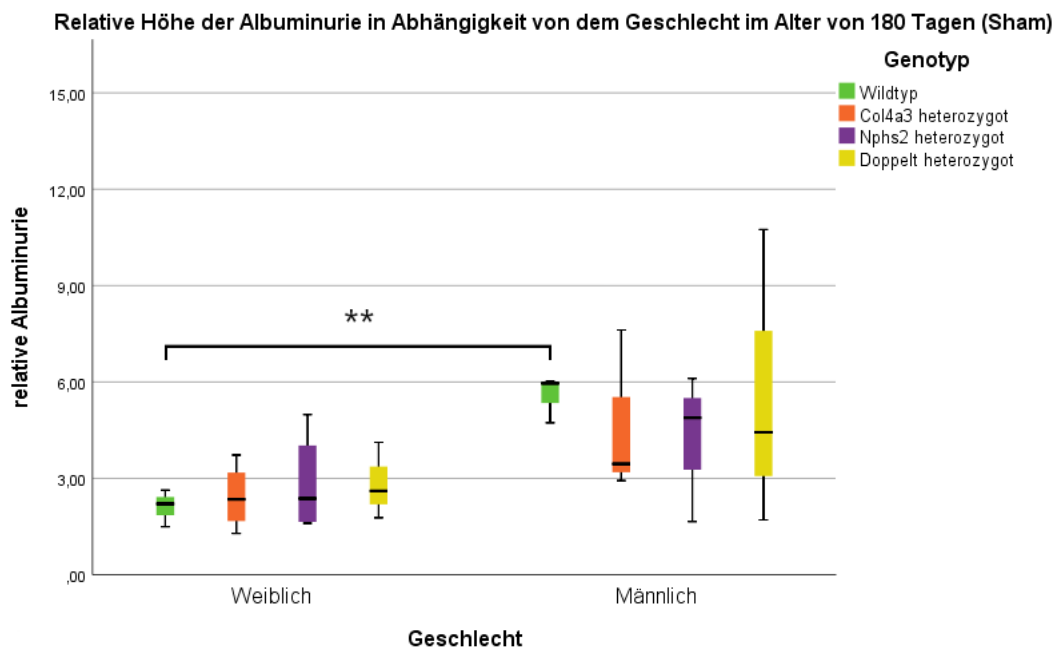


Abbildung 11: Relative Höhe der Albuminurie in Abhängigkeit von dem Geschlecht im Alter von 180 Tagen (Sham) Gezeigt ist die relative Höhe der Albuminurie der scheinoperierten Tiere in Abhängigkeit von dem Geschlecht im Alter von 180 Tagen. Weibchen und Männchen mit identischem Genotyp, gleicher Therapie und gleichen Alters wurden jeweils miteinander verglichen. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp-Weibchen ($2,11 \pm 0,58$) und -Männchen ($5,57 \pm 0,72$) ($p = 0,003$ nach t-Test). Die Gruppengröße betrug $n = 4$ für Wildtyp-/*Col4a3*^{+/-}- und *Nphs2*^{R140Q/+}-Weibchen und $n = 3$ in allen anderen Gruppen.

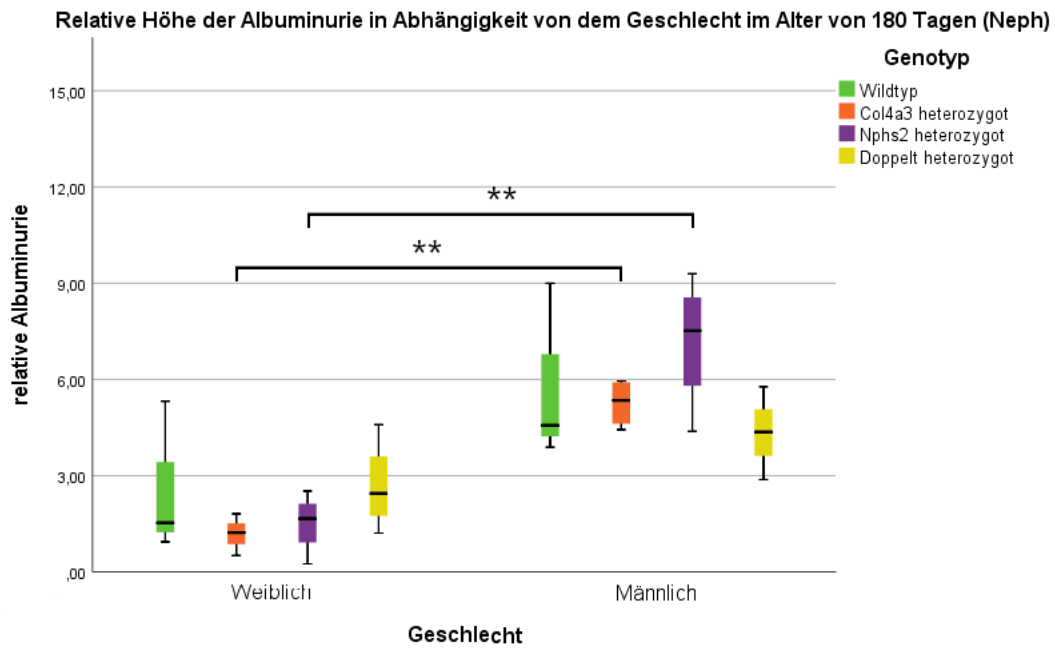


Abbildung 12: Relative Höhe der Albuminurie in Abhängigkeit von dem Geschlecht im Alter von 180 Tagen (Neph) Gezeigt ist die relative Höhe der Albuminurie der nephrektomierten Tiere ohne nachfolgende ACEi-Therapie in Abhängigkeit von dem Geschlecht im Alter von 180 Tagen. Weibchen und Männchen mit identischem Genotyp, gleicher Therapie und gleichen Alters wurden jeweils miteinander verglichen. *Col4a3*^{+/-}-Weibchen ($1,18 \pm 0,65$) wiesen eine signifikant geringere Albuminmenge im Urin auf als Männchen ($5,27 \pm 0,76$) mit gleichem Genotyp ($p = 0,001$ nach t-Test). Selbiges zeigte sich bei *Nphs2*^{R140Q/+}-Weibchen ($1,52 \pm 0,94$) im Vergleich zu den Männchen ($7,18 \pm 2,06$) identischen Genotyps ($p = 0,002$ nach t-Test). Die Gruppengröße war $n = 4$ für alle *Nphs2*^{R140Q/+}-Tiere, doppelt heterozygote Weibchen sowie Männchen mit *Col4a3*^{+/-}-Genotyp und betrug $n = 3$ für alle anderen Gruppen.

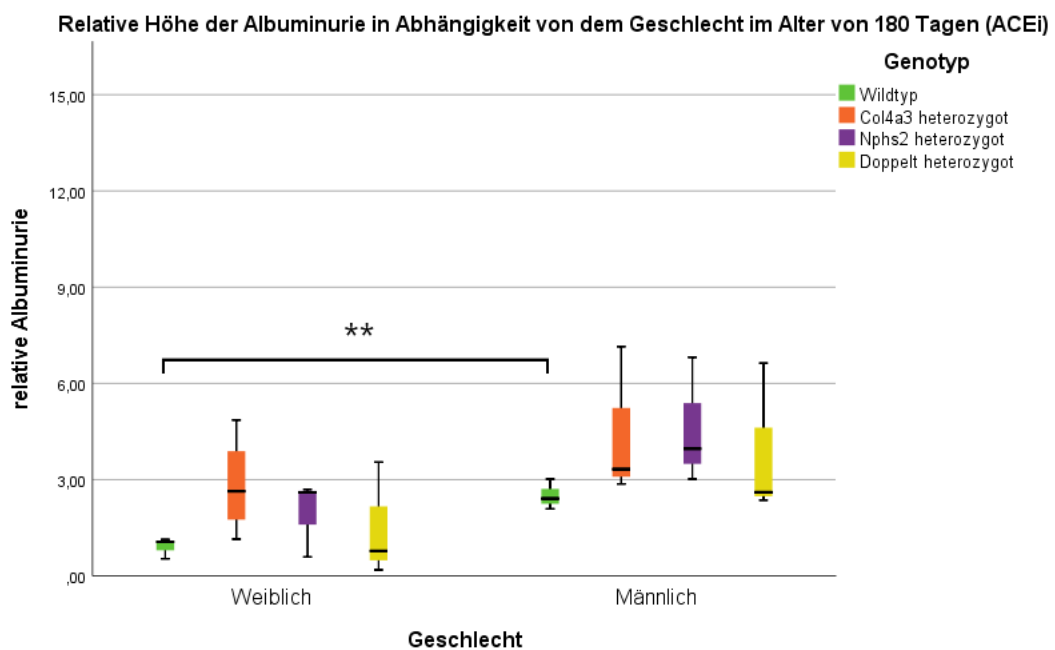


Abbildung 13: Relative Höhe der Albuminurie in Abhängigkeit von dem Geschlecht im Alter von 180 Tagen (ACEi) Gezeigt ist die relative Höhe der Albuminurie der mit ACEi behandelten Tiere in Abhängigkeit von dem Geschlecht im Alter von 180 Tagen. Weibchen und Männchen mit identischem

Genotyp, gleicher Therapie und gleichen Alters wurden jeweils miteinander verglichen. Wildtyp-Weibchen ($1,96 \pm 1,18$) unterschieden sich signifikant von ihren männlichen ($4,60 \pm 1,99$) Gegenstücken ($p = 0,009$ nach t-Test). Die Gruppengröße war $n = 4$ für *Col4a3^{+/-}*-Weibchen und $n = 3$ in allen anderen Gruppen.

In den obigen Abbildungen lässt sich die beobachtete Tendenz weiter verfolgen. Auch nach Operation und postoperativer Therapie lagen weiterhin erkennbare und häufig signifikante Unterschiede in Abhängigkeit von dem Geschlecht vor.

Aufgrund der Beobachtung, dass die Albuminmenge von Männchen im Urin unabhängig vom Genotyp, von der Therapie und vom Alter höher war als die von vergleichbaren Weibchen, wurden Vergleiche bezüglich der Unterschiede zwischen Genotypen und Therapie-Gruppen nach Geschlechtern getrennt durchgeführt. Auf diese Weise wurde die Streuung der Daten reduziert, wodurch präzisere Angaben und statistische Berechnungen möglich wurden, sodass häufiger stärkere statistische Tests angewandt und Unterschiede besser sichtbar gemacht werden konnten.

3.1.2 Genotypen- und Therapievergleich

Von größerem wissenschaftlichem und klinischem Interesse als die Unterschiede zwischen Weibchen und Männchen bezüglich der Albuminurie waren die Einflüsse der unterschiedlichen Genotypen und Therapiegruppen auf die Nierenfunktion. Diese werden im Folgenden gemeinsam dargestellt. Weibchen und Männchen wurden separat betrachtet. Für die Altersgruppen bis einschließlich 120 Tage wurden alle Versuchstiere eines Genotyps und gleichen Geschlechts gemeinsam betrachtet, da bis dahin noch keine unterschiedlichen Therapien eingeleitet wurden. Ab dem Alter von 150 Tagen wurden die Versuchstiere zusätzlich zum Genotyp in Abhängigkeit ihrer Therapiegruppe dargestellt und analysiert.

Abbildung 14 ist zu entnehmen, dass sich die Albuminmenge im Urin bei jungen Versuchstieren im Alter von 60 Tagen nicht abhängig vom Genotyp unterschied. Bei keiner Gruppe lag eine pathologische Albuminurie vor, was den geringen und nicht signifikanten Unterschieden zu vergleichbaren und gesunden Wildtyp-Versuchstieren zu entnehmen war.

In einem Alter von 90 Tagen kamen, wie Abbildung 15 zu entnehmen ist, ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zur Darstellung. Auch in diesem Alter wies keine Gruppe eine pathologische Albuminurie verglichen mit gesunden Wildtyp-Versuchstieren auf.

Auch im Alter von 120 Tagen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit vom Genotyp. Abbildung 16 kann ebenfalls entnommen werden, dass weder Weibchen noch Männchen bis zum Alter von 120 Tagen eine pathologische Albuminurie im Vergleich zu unbehandelten, gesunden Wildtyp-Mäusen entwickelt hatten.

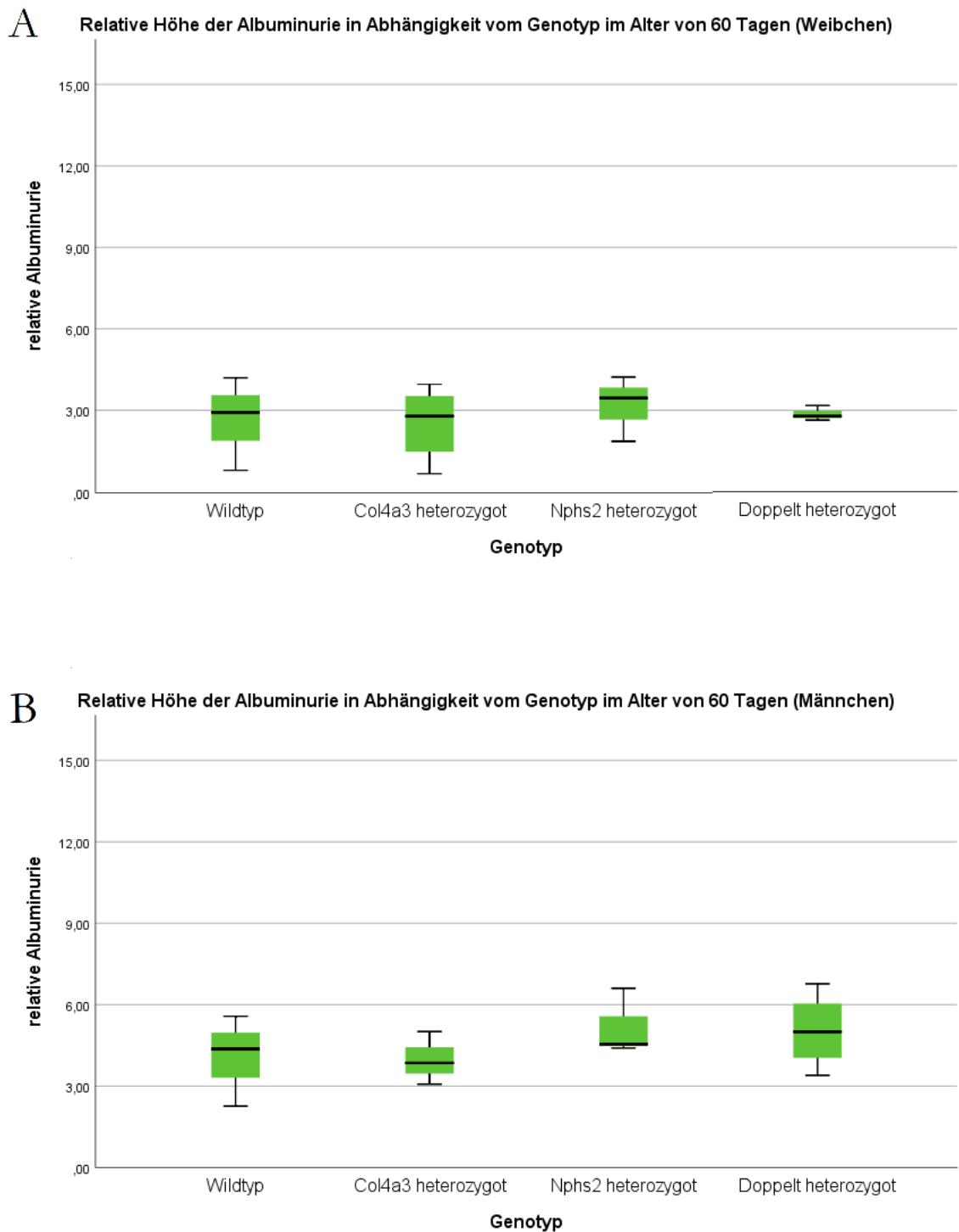


Abbildung 14: Relative Höhe der Albuminurie in Abhängigkeit vom Genotyp im Alter von 60 Tagen
Gezeigt ist die relative Höhe der Albuminurie in Abhängigkeit vom Genotyp. Weibchen und Männchen wurden jeweils getrennt auf Unterschiede zwischen den Genotypen untersucht. (A) Höhe der Albuminurie bei 60 Tage alten Weibchen. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Die Gruppengröße betrug $n = 7$ für *Col4a3*^{+/-}-Weibchen und $n = 3$ bei allen anderen Gruppen. (B) Höhe der Albuminurie bei 60 Tage alten Männchen. Wie auch bei den weiblichen Versuchstieren zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Die Gruppengröße betrug $n = 4$ bei doppelt heterozygoten Männchen und $n = 3$ bei allen anderen Gruppen.

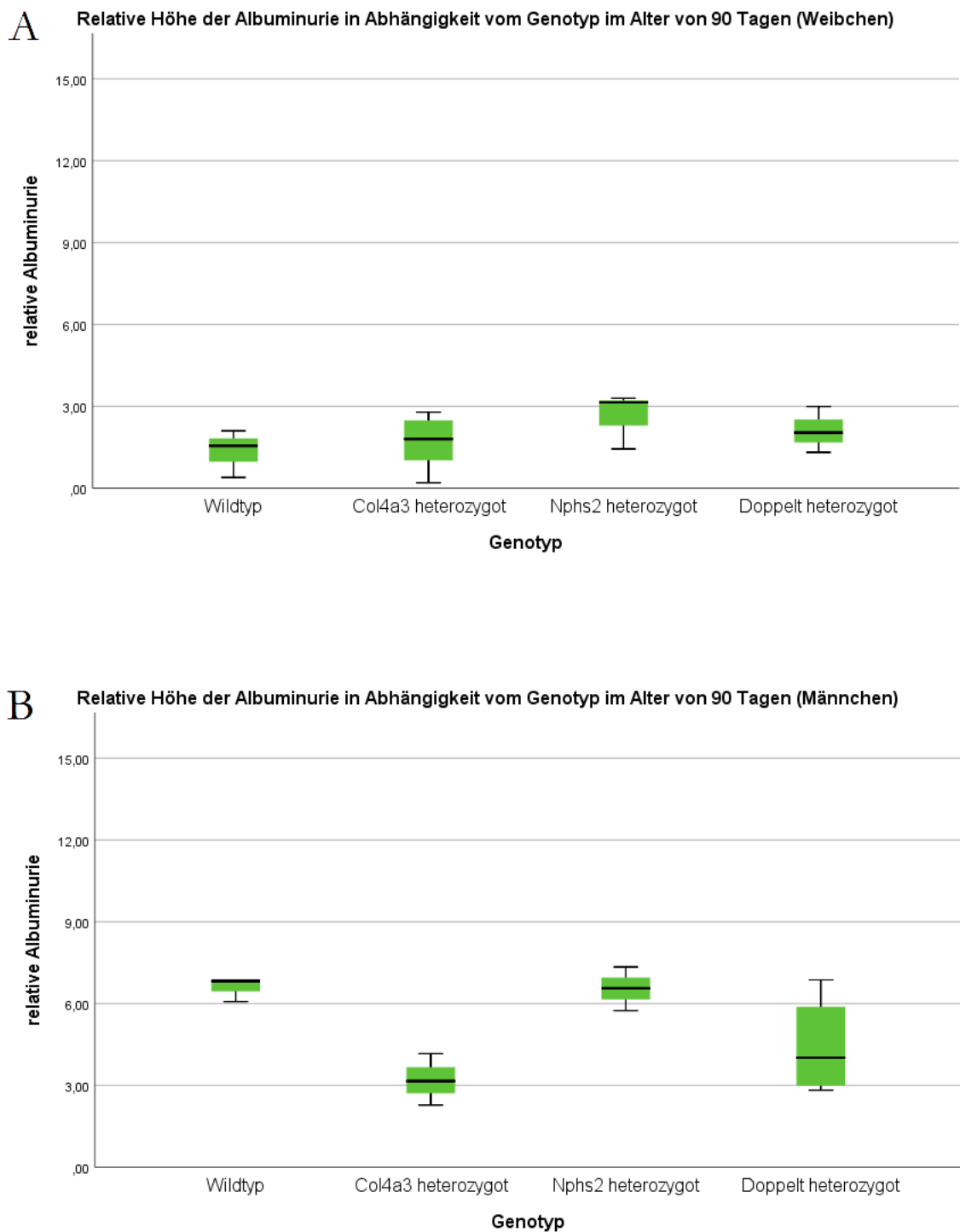


Abbildung 15: Relative Höhe der Albuminurie in Abhängigkeit vom Genotyp im Alter von 90 Tagen
Gezeigt ist die relative Höhe der Albuminurie in Abhängigkeit vom Genotyp. Weibchen und Männchen wurden jeweils getrennt auf Unterschiede zwischen den Genotypen untersucht. (A) Höhe der Albuminurie bei 90 Tage alten Weibchen. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Die Gruppengröße betrug $n = 7$ für $Col4a3^{+/-}$ -Weibchen und $n = 3$ bei allen anderen Gruppen. (B) Höhe der Albuminurie bei 90 Tage alten Männchen. Trotz einer gewissen Schwankungsbreite der Gruppen zueinander zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Die Gruppengröße betrug $n = 4$ bei $Col4a3^{+/-}$ und doppelt heterozygoten Männchen und $n = 3$ bei allen anderen Gruppen.

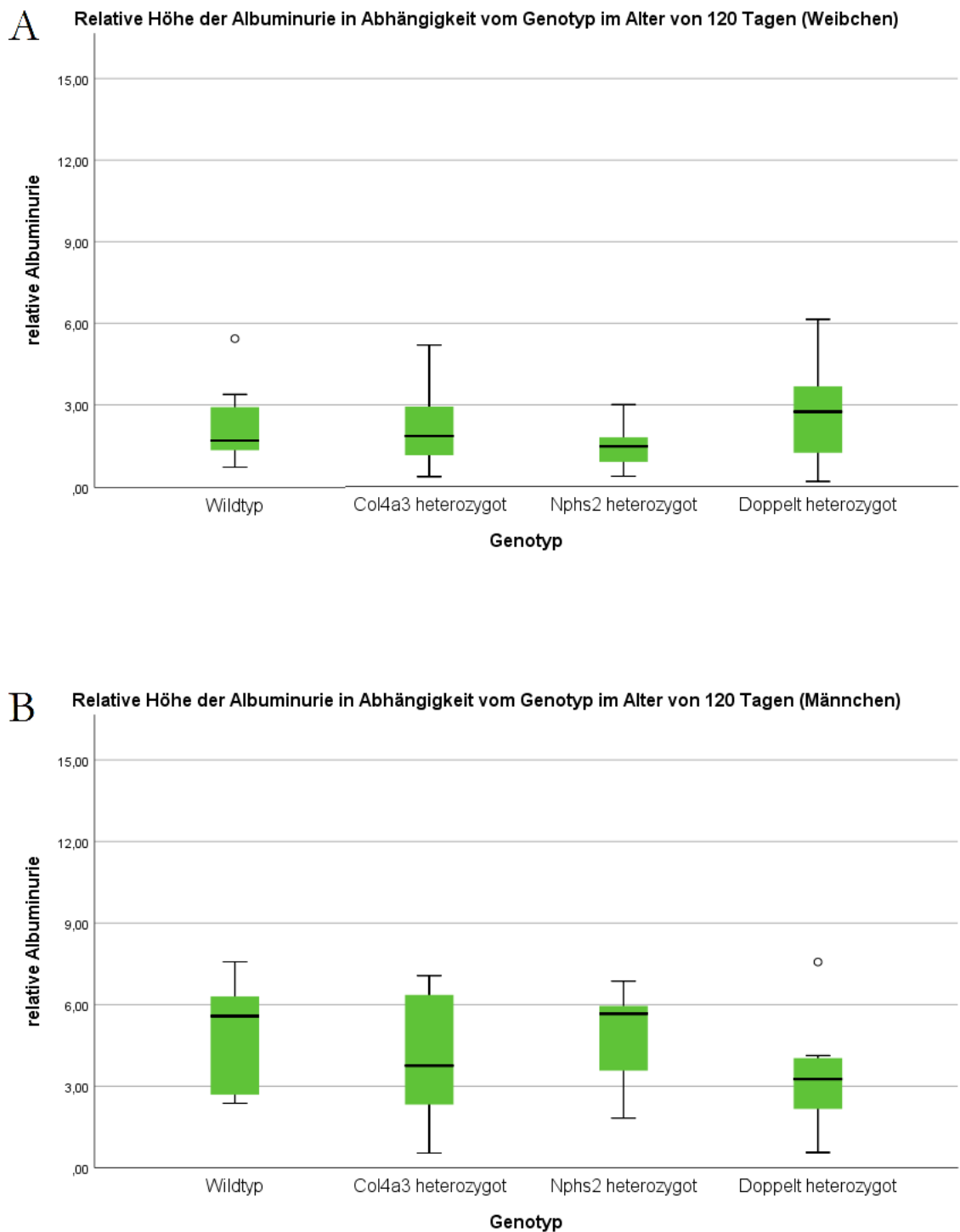
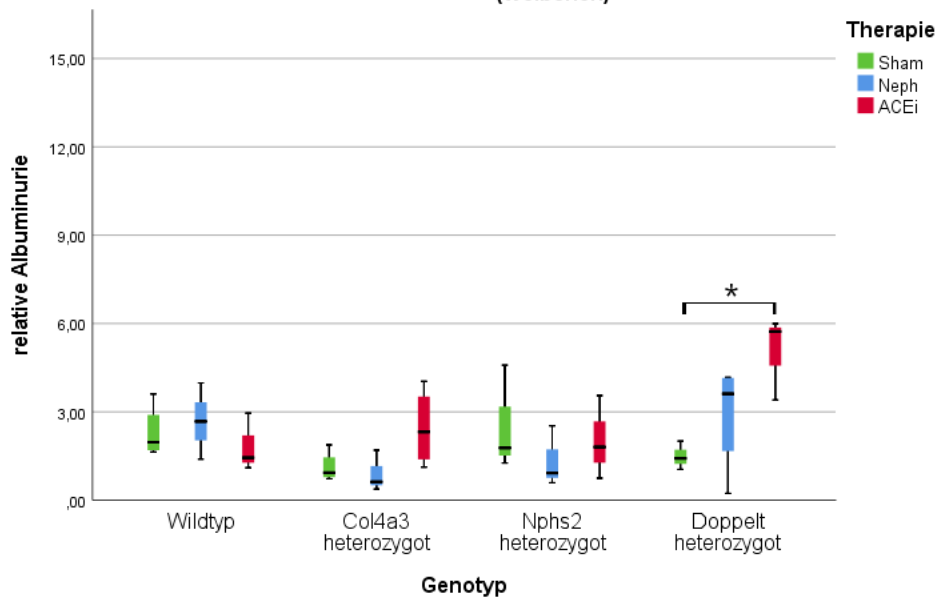


Abbildung 16: Relative Höhe der Albuminurie in Abhängigkeit vom Genotyp im Alter von 120 Tagen

Gezeigt ist die relative Höhe der Albuminurie in Abhängigkeit vom Genotyp. Weibchen und Männchen wurden jeweils getrennt auf Unterschiede zwischen den Genotypen untersucht. (A) Höhe der Albuminurie bei 120 Tage alten Weibchen. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Die Gruppengröße betrug $n = 11$ bei *Col4a3*^{+/-}-Weibchen, $n = 10$ bei doppelt heterozygoten Weibchen und $n = 9$ bei den restlichen Gruppen. (B) Höhe der Albuminurie bei 120 Tage alten Männchen. Erneut konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die Gruppengröße betrug $n = 10$ bei *Col4a3*^{+/-}- und doppelt heterozygoten Männchen und $n = 9$ in den restlichen Gruppen.

A Relative Höhe der Albuminurie in Abhängigkeit vom Genotyp und der Therapie im Alter von 150 Tagen (Weibchen)



B Relative Höhe der Albuminurie in Abhängigkeit vom Genotyp und der Therapie im Alter von 150 Tagen (Männchen)

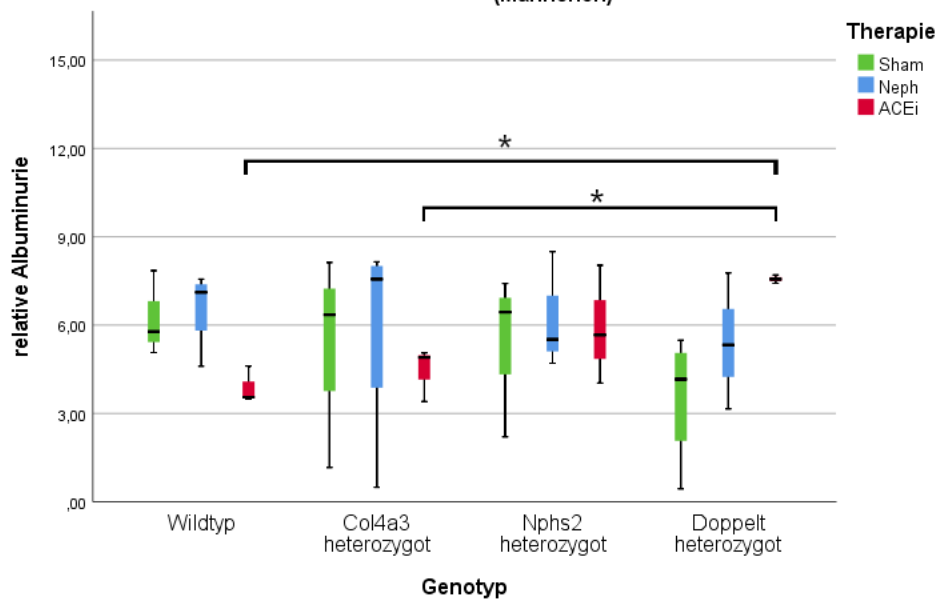
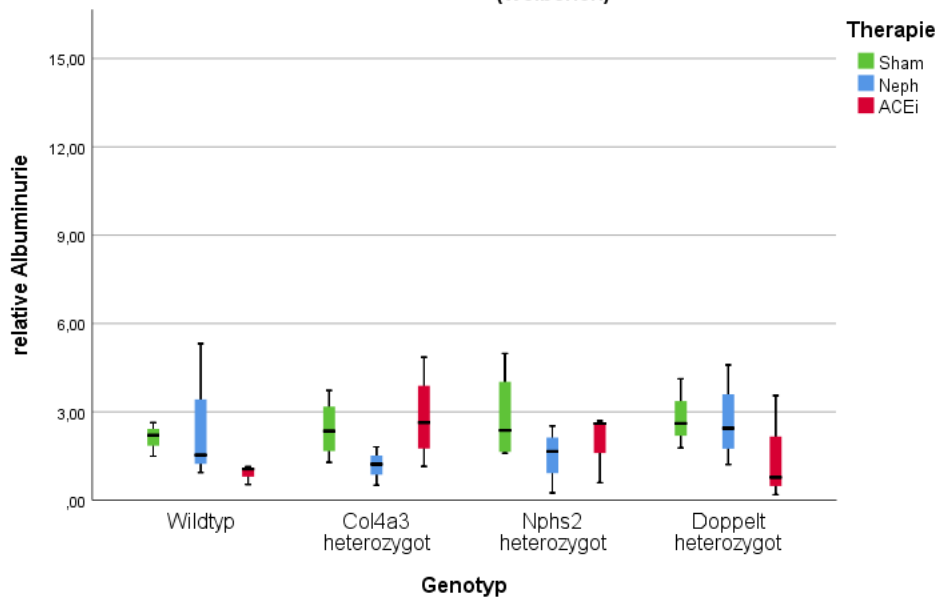


Abbildung 17: Relative Höhe der Albuminurie in Abhängigkeit vom Genotyp und der Therapie im Alter von 150 Tagen Gezeigt ist die relative Höhe der Albuminurie in Abhängigkeit von der Therapie und dem Genotyp. Weibchen und Männchen wurden jeweils getrennt auf Unterschiede zwischen den Genotypen und Therapiegruppen untersucht. (A) Höhe der Albuminurie bei 150 Tage alten Weibchen. Zwischen den Genotypen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Bei doppelt heterozygoten Versuchstieren zeigte sich allerdings eine Steigerung der Albuminurie nach der Nephrektomie im Vergleich zur Sham-Gruppe ($1,49 \pm 0,48$), welche für die Tiere der ACEi-Gruppe ($5,04 \pm 1,42$) signifikant war ($p = 0,047$ nach ANOVA mit Tukey-*post-hoc*-Test). Die Gruppengröße betrug $n = 4$ bei Wildtyp- und *Col4a3*^{+/-}-Weibchen der Sham-Gruppe, doppelt heterozygoten Weibchen der Neph-Gruppe und *Col4a3*^{+/-}-ACEi-Weibchen. Für alle

anderen Gruppen war $n = 3$. (B) Höhe der Albuminurie bei 150 Tage alten Männchen. Der Albuminurieanstieg zeigte sich ebenfalls bei doppelt heterozygoten Männchen, war jedoch bei diesen nicht signifikant. Allerdings war die Albuminmenge im Urin bei *Col4a3^{+/-}*-Tieren der ACEi-Gruppe ($4,45 \pm 0,91$) signifikant niedriger als bei doppelt heterozygoten Tieren ($7,56 \pm 0,14$) ($p = 0,043$ nach ANOVA mit Tukey-*post-hoc*-Test) ebenso wie die Albuminurie von Wildtyp-Männchen ($3,88 \pm 0,63$) im Vergleich zu doppelt heterozygoten Tieren der ACEi-Gruppe ($7,56 \pm 0,14$) signifikant erniedrigt war ($p = 0,019$ nach ANOVA mit Tukey-*post-hoc*-Test). Die Gruppengröße betrug $n = 4$ bei doppelt heterozygoten Sham-Männchen und Wildtyp- sowie *Col4a3^{+/-}*-Neph-Männchen und $n = 3$ in allen anderen Gruppen.

Abbildung 17 zeigt die Albuminurie der Versuchstiere kurz nach der Operation. Sham-Versuchstiere wurden einer Scheinoperation unterzogen, während die Tiere der Neph- und ACEi-Gruppen nephrektomiert wurden. Die 14 Tage nach der Operation begonnene ACEi-Therapie war zu diesem Zeitpunkt entweder gerade erst begonnen worden oder begann in den nächsten Tagen nach dem 150. Lebenstag. Diese Unterschiede innerhalb der Gruppe kamen dadurch zu Stande, dass aus logistischen Gründen nicht alle Mäuse im auf den Tag genau gleichen Alter operiert werden konnten. Die ACEi-Therapie wurde hingegen immer am 14. Tag nach der Operation begonnen, welcher im Regelfall in den Tagen um den 150. Lebenstag des Versuchstieres lag. Ein Effekt der Therapie mit ACEi auf die Albuminurie konnte zu diesem Zeitpunkt aufgrund der beschriebenen Problematik noch nicht gezeigt werden. Auch wurde es zum Zeitpunkt der Planung des Experiments als unwahrscheinlich betrachtet, dass die ACEi-Therapie bereits innerhalb weniger Tage einen messbaren Effekt zeigen würde. Ein Anstieg der Albuminurie nach Nephrektomie im Vergleich zur Scheinoperation bei doppelt heterozygoten Tieren, welcher sich sehr deutlich bei den Weibchen zeigte, kam dennoch zur Darstellung.

A Relative Höhe der Albuminurie in Abhängigkeit vom Genotyp und der Therapie im Alter von 180 Tagen (Weibchen)



B Relative Höhe der Albuminurie in Abhängigkeit vom Genotyp und der Therapie im Alter von 180 Tagen (Männchen)

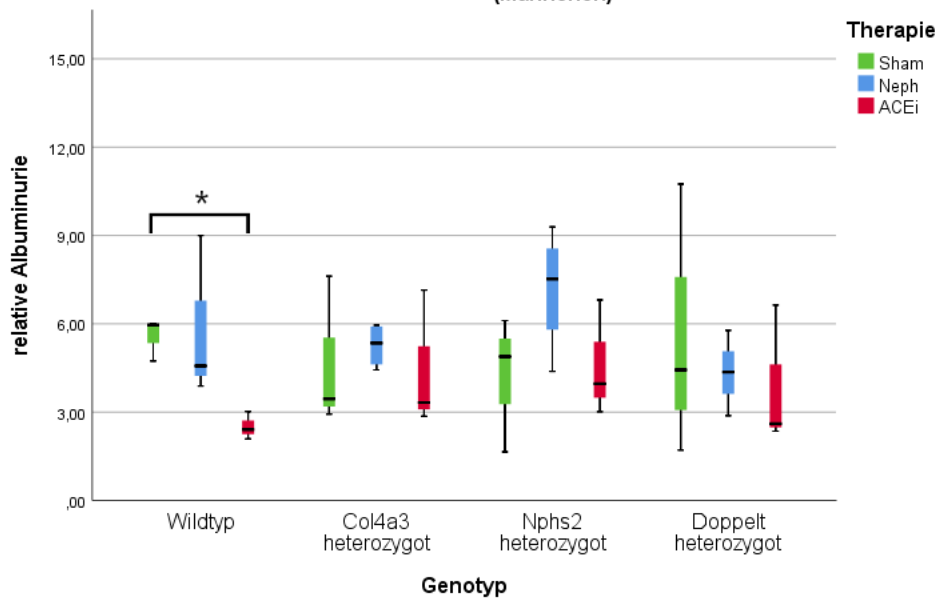


Abbildung 18: Relative Höhe der Albuminurie in Abhängigkeit vom Genotyp und der Therapie im Alter von 180 Tagen Gezeigt ist die relative Höhe der Albuminurie in Abhängigkeit von der Therapie und dem Genotyp. Weibchen und Männchen wurden jeweils getrennt auf Unterschiede zwischen den Genotypen und Therapiegruppen untersucht. (A) Höhe der Albuminurie bei 180 Tage alten Weibchen. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Die Gruppengröße betrug $n = 4$ bei *Col4a3*^{+/-} und *Nphs2*^{2R140Q/+}-Sham-Weibchen, *Nphs2*^{2R140Q/+} und doppelt heterozygoten Neph-Weibchen sowie *Col4a3*^{+/-}-ACEi-Weibchen. In den restlichen Gruppen betrug $n = 3$. (B) Höhe der Albuminurie bei 180 Tage alten Männchen. Zwischen den verschiedenen Genotypen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Die Albuminmenge im Urin war allerdings bei Wildtyp-Männchen der ACEi-Gruppe ($2,51 \pm 0,47$) niedriger als bei den anderen Therapie-Gruppen des gleichen Genotyps. Im Vergleich zu Sham-Tieren ($5,57 \pm 0,72$) war dieser Unterschied

signifikant ($p = 0,014$ nach Welch-ANOVA mit Dunnett-T3-*post-hoc*-Test). Die Gruppengröße betrug $n = 4$ bei *Col4a3*^{+/-} und *Nphs2*^{R140Q/+}-Neph-Männchen und $n = 3$ in allen anderen Gruppen.

Die Albuminurie im Alter von 180 Tagen ist in Abbildung 18 dargestellt. Erkennbar war, dass der kurz nach der Operation insbesondere bei doppelt heterozygoten Versuchstieren erkennbare Anstieg der Albuminmenge im Urin rückläufig war. Besonders stark war dieser Rückgang bei den mit ACEi behandelten Versuchstieren. Bei männlichen Versuchstieren war eindrucksvoll zu sehen, dass die mit ACEi behandelten Versuchstiere allesamt eine niedrigere Albuminurie aufwiesen als die nephrektomierten Tiere jeweils gleichen Genotyps, welche keiner Therapie mit ACEi zugeführt wurden. Bei den Weibchen, welche grundsätzlich eine geringere Albuminurie aufwiesen, konnte dieser Zusammenhang hingegen nicht beobachtet werden.

Von großem Interesse war auch der Verlauf der Proteinurie innerhalb der ACEi-Therapiegruppe. Die Daten der Urinanalyse im Alter von 150 Tagen wurden mit denen im Alter von 180 Tagen verglichen. Für diesen Vergleich wurden Männchen und Weibchen gemeinsam betrachtet, weil für die Auswahl des stärksten statistischen Testes beim Vergleich zweier abhängiger Stichproben im Gegensatz zu unabhängigen Stichproben nicht die Normalverteilung der Werte des Datensatzes sondern stattdessen die Normalverteilung der Differenzen zwischen den beiden Zeitpunkten relevant ist. Durch die gemeinsame Betrachtung beider Geschlechter konnte eine größere Anzahl von Individuen miteinander verglichen werden, wodurch eine höhere statistische Präzision erreicht wurde. Durch die dargelegten Besonderheiten der Tests und des Datensatzes war es so möglich, die statistische Analyse mit starken statistischen Tests bei erhöhter Gruppengröße durchzuführen und so die Möglichkeit zu maximieren, existierende Unterschiede signifikant nachweisen zu können, ohne Testvoraussetzungen zu verletzen.

Deutlich wurde anhand dieser Daten, welche in Abbildung 19 dargestellt sind, dass der zunächst beobachtete Anstieg der Proteinurie kurz nach der Operation bei doppelt heterozygoten Versuchstieren durch die Applikation von ACEi innerhalb eines Monats vollständig reversibel war. Auch bei den anderen Genotypen war einer Verringerung der Albuminausscheidung im Urin nachweisbar, wobei diese neben dem signifikanten Unterschied bei doppelt heterozygoten Tieren nur noch bei Wildtyp-Versuchstieren signifikant war. Deutlich wurde insbesondere auch, dass die im Vergleich zu den anderen Genotypen hohe Albuminausscheidung der doppelt heterozygoten Versuchstiere im Verlauf des folgenden Monats wieder auf ein mit diesen vergleichbares Niveau sank.

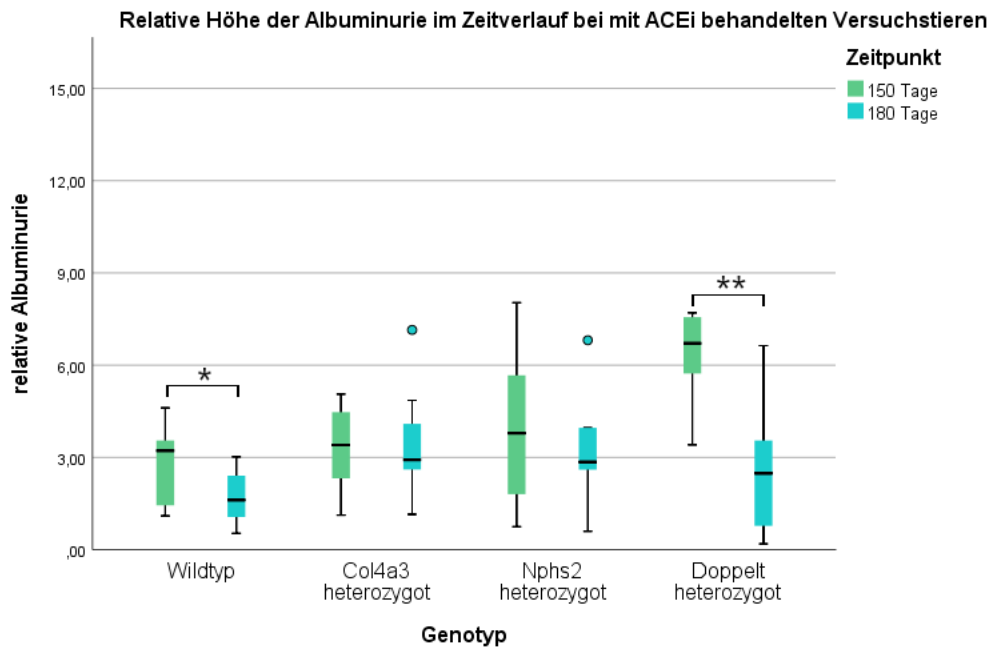


Abbildung 19: Relative Höhe der Albuminurie im Zeitverlauf (ACEi-Gruppe) Gezeigt ist der Verlauf der Albuminurie bei mit ACEi behandelten Versuchstieren in Abhängigkeit vom Genotyp. Bei allen Genotypen war eine Verringerung der Albuminausscheidung im Urin nachweisbar. Bei Wildtyp-Versuchstieren war vom 150. Tag ($2,86 \pm 1,34$) auf den 180. Lebenstag ($1,71 \pm 0,95$) eine signifikante Verringerung messbar ($p = 0,013$ nach t-Test für abhängige Stichproben). Noch deutlicher war der Effekt bei doppelt heterozygoten Tieren ($p = 0,008$ nach t-Test für abhängige Stichproben), bei welchen sich die Albuminurie vom 150. Lebenstag ($6,30 \pm 1,65$) bis zum Alter von 180 Tagen ($2,68 \pm 2,29$) stark rückläufig zeigte. Die Gruppen setzten sich aus je drei Weibchen und drei Männchen zu einer Gruppengröße von $n = 6$ zusammen. Die einzige Ausnahme stellten die *Col4a3*^{+/-}-Tiere dar, dort ergab sich aus vier Weibchen und drei Männchen eine Gruppengröße von $n = 7$.

3.2 Serumharnstoff

Der Serumharnstoff wurde in Zusammenarbeit mit der Abteilung für klinische Chemie der Universitätsmedizin Göttingen bestimmt. Dies ist in Kapitel 2.6 dargestellt. Es wurden geschlechtsunabhängig jeweils Unterschiede zwischen den Genotypen und den Therapiegruppen untersucht. Die in Abbildung 20 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass Tiere, die einer Uninephrektomie unterzogen wurden, im Vergleich zu scheinoperierten Tieren einen erhöhten Serumharnstoff aufwiesen. ACEi-behandelte Versuchstiere ohne Mutationen oder mit doppelt heterozygotem Genotyp zeigten zudem eine weitere deutliche Steigerung des Serumharnstoffs. Die Steigerung des Harnstoffs im Serum unter ACEi-Therapie sprach für den nephroprotektiven Effekt der medikamentösen Therapie mit Senkung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und damit Schonung der verbleibenden Niere. Bei *Col4a3*^{+/-}- und *Nphs2*^{R140Q/+}-Tieren konnte diese Beobachtung hingegen nicht gemacht werden.

Insgesamt ließ sich den Daten des Datensatzes aus Abbildung 20 entnehmen, dass eine Nephrektomie zu einer generellen Erhöhung des Serumharnstoffs führte und dass eine

zusätzliche postoperative Therapie mit ACEi bei Wildtyp-Versuchstieren und doppelt heterozygoten Mäusen eine weitere Erhöhung des Harnstoffs nach sich zog.

Die Harnstoffmessungen von *Col4a3*^{-/-}-Versuchstieren ergaben im Mittel einen Wert von $72,25 \pm 66,24$ mg/dl und lagen damit bei breiter Streuung um diesen Mittelwert über den mittleren Werten der Tiere anderer Genotypen. Aus der statistischen Analyse wurden diese Daten ausgeschlossen, da die *Col4a3*^{-/-}-Mäuse weder scheinoperiert noch nephrektomiert wurden. Einer Therapie mit ACEi wurden diese Versuchstiere ebenfalls nicht zugeführt.

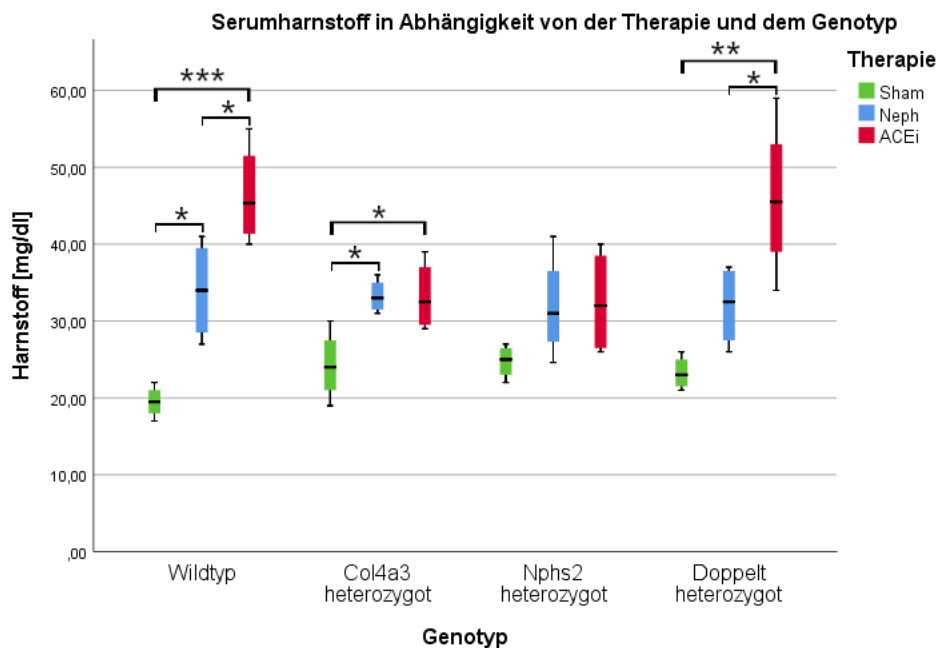


Abbildung 20: Serumharnstoff in Abhängigkeit von der Therapie und dem Genotyp Gezeigt ist der Serumharnstoff in mg/dl im Alter von 180 Tagen in Abhängigkeit von der Therapie und dem Genotyp. Zwischen Tieren einer Therapiegruppe, aber unterschiedlichen Genotyps, gab es keine signifikanten Unterschiede. Auffällig war der Anstieg des Harnstoffs bei Wildtypen und doppelt heterozygoten Versuchstieren unter Therapie mit ACEi. Zwischen Versuchstieren eines Genotyps, aber unterschiedlicher Therapiegruppe, konnten signifikante Unterschiede gezeigt werden. Bemerkenswert war zunächst der Anstieg des Harnstoffs aller nephrektomierten Tiere im Vergleich zu den scheinoperierten Versuchstieren, welcher unabhängig vom Genotyp in seiner Tendenz sichtbar war. Bei Wildtyp-Tieren war der Serumharnstoff von Neph-Tieren ($34,00 \pm 6,58$ mg/dl) und ACEi behandelten Tieren ($46,42 \pm 6,62$ mg/dl) im Vergleich zu Sham-Tieren ($19,50 \pm 2,08$ mg/dl) signifikant erhöht (für Neph gegen Sham: $p = 0,012$ nach ANOVA mit Tukey-*post-hoc*-Test, für ACEi gegen Sham: $p = 0,000$ nach ANOVA mit Tukey-*post-hoc*-Test). Des Weiteren zeigte sich eine signifikante Harnstofferrhöhung von mit ACEi behandelten Wildtyp-Tieren ($46,42 \pm 6,62$ mg/dl) im Vergleich zu nephrektomierten Tieren gleichen Genotyps ohne ACEi-Therapie ($34,00 \pm 6,58$ mg/dl) ($p = 0,027$ nach ANOVA mit Tukey-*post-hoc*-Test). Auch bei *Col4a3*^{+/-}-Versuchstieren war der Serumharnstoff bei Sham-Tieren ($24,25 \pm 4,57$ mg/dl) signifikant niedriger als bei Neph-Tieren ($33,25 \pm 2,22$ mg/dl) ($p = 0,026$ nach ANOVA mit Tukey-*post-hoc*-Test) und bei mit ACEi behandelten Tieren ($33,25 \pm 4,65$ mg/dl) ($p = 0,026$ nach ANOVA mit Tukey-*post-hoc*-Test). Bei *Nphs2*^{R140Q/+}-Tieren zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, ein Anstieg des Serumharnstoffs nach Nephrektomie war dennoch erkennbar. Bei den doppelt heterozygoten Versuchstieren stellte sich der Harnstoffwert der ACEi-Gruppe ($46 \pm 10,30$ mg/dl) signifikant höher dar als bei Sham- ($23,25 \pm 2,22$ mg/dl) ($p = 0,003$ nach ANOVA mit Tukey-

post-hoc-Test) und Neph-Tieren ($32,00 \pm 5,35$ mg/dl) ($p = 0,042$ nach ANOVA mit Tukey-*post-hoc*-Test). Die Gruppengröße betrug in allen Gruppen $n = 4$.

3.3 Serumcholesterin

Wie der Harnstoffwert wurde auch das Serumcholesterin in Zusammenarbeit mit der Abteilung für klinische Chemie der Universitätsmedizin Göttingen bestimmt, was in Kapitel 2.6 dargestellt ist. Signifikante Unterschiede, welche in Abhängigkeit von dem Genotyp stünden, wurden nicht beobachtet. Der Einfluss der Therapie mit ACEi auf das Serumcholesterin war allerdings sehr deutlich. Über alle Genotypen hinweg zeichnete sich ab, dass die Applikation von ACEi zu einer Erhöhung des Cholesterinspiegels im Serum führte. Bei Wildtyp- und *Col4a3*^{+/-}-Versuchstieren war dieser Zusammenhang statistisch signifikant, während er bei den anderen Genotypen nicht signifikant, aber klar erkennbar war. Der zugehörige Datensatz ist in Abbildung 21 dargestellt.

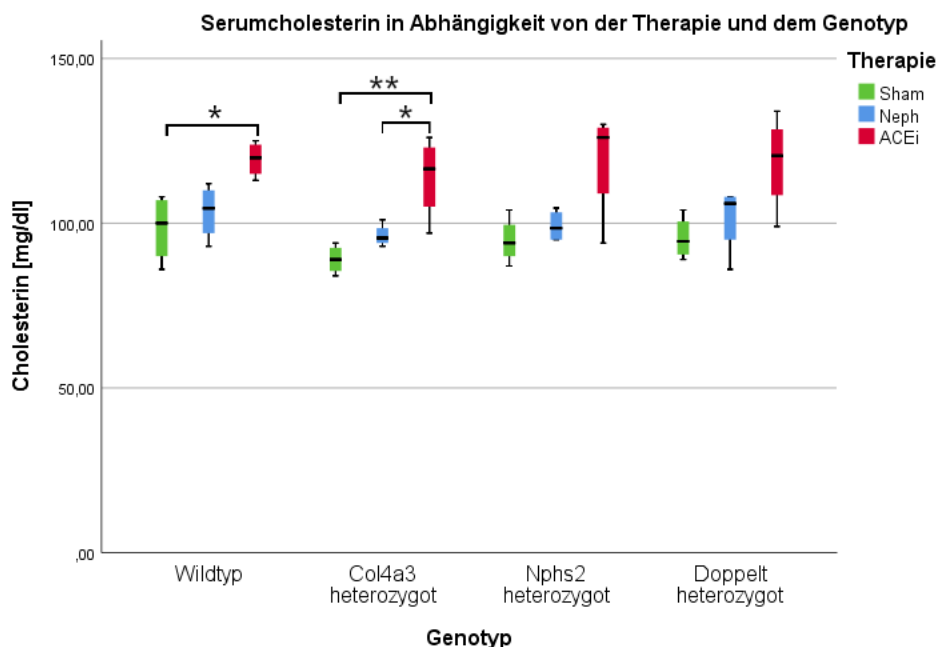


Abbildung 21: Serumcholesterin in Abhängigkeit von der Therapie und dem Genotyp Gezeigt ist das Serumcholesterin in mg/dl im Alter von 180 Tagen in Abhängigkeit von der Therapie und dem Genotyp. Tiere der gleichen Therapiegruppe und unterschiedlichen Genotyps unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Insgesamt zeigte sich, dass Tiere, die mit ACEi behandelt waren, einen höheren Cholesterinspiegel hatten als solche, die keine medikamentöse Therapie erhielten. Tiere nach Nephrektomie und ohne ACEi-Therapie wiesen einen geringfügig höheren Cholesterinwert auf als scheinoperierte Versuchstiere. Die Cholesterinerhöhung unter ACEi-Therapie war signifikant bei den Wildtyp-Tieren ($119,42 \pm 5,44$ mg/dl) im Vergleich zu scheinoperierten Tieren gleichen Genotyps ($98,50 \pm 10,38$ mg/dl) ($p = 0,015$ nach ANOVA mit Tukey-*post-hoc*-Test). Ebenso wiesen *Col4a3*^{+/-}-Tiere unter ACEi-Therapie ($114,00 \pm 12,52$ mg/dl) einen statistisch signifikant erhöhten Cholesterinwert im Vergleich zu Neph- ($96,25 \pm 3,40$ mg/dl) ($p = 0,028$ nach ANOVA mit Tukey-*post-hoc*-Test) und Sham-Tieren ($89,00 \pm 4,40$ mg/dl) ($p = 0,004$ nach ANOVA mit Tukey-*post-hoc*-Test) gleichen Genotyps auf. Die Gruppengrößen waren $n = 4$.

Neben der Erhöhung des Cholesterinspiegels unter ACEi-Therapie war auch ein geringer Anstieg des Serumcholesterins bei nephrektomierten Tieren im Vergleich zu Sham-Tieren beobachtbar. Dieser war nicht statistisch signifikant, zeigte sich dafür gleichartig bei Tieren aller Genotypen.

Tiere mit *Col4a3*^{-/-}-Genotyp wurden aufgrund der Unvergleichbarkeit bezüglich der Therapie, da sie weder operiert noch einer ACEi-Therapie zugeführt wurden, nicht in die statistische Datenanalyse eingeschlossen. Der Cholesterinwert betrug bei diesen Tieren $134,24 \pm 45,87$ mg/dl und war damit höher als bei anderen Genotypen, wobei die Daten weit um diesen Mittelwert streuten.

3.4 Immunfluoreszenz

Die Färbungen sind in Kapitel 2.5 erläutert. An dieser Stelle befindet sich auch ein Abschnitt, welcher den theoretischen Hintergrund der Färbungen und insbesondere auch die Eignung der verwendeten Antikörper darstellt. Auch die jeweiligen Kriterien, nach denen die Aufnahmen der Immunfluoreszenzmikroskopie bewertet wurden, können diesem Kapitel entnommen werden.

Die Darstellung der Ergebnisse der Immunfluoreszenz wird jeweils zweigeteilt vorgenommen. Zunächst sollen die Daten hinsichtlich der Unterschiede zwischen den Genotypen innerhalb einer Therapiegruppe dargestellt werden. Anschließend werden die Daten der Versuchstiere der Neph- und ACEi-Gruppe jeweils gleichen Genotyps gegenübergestellt. Die Daten wurden geschlechtsunabhängig ausgewertet. Die Wildtyp-Gruppen bestanden je aus einem Weibchen und zwei Männchen. Bei doppelt heterozygoten- und homozygot erkrankten Tieren wurden je zwei Weibchen und ein Männchen untersucht. Für die *Col4a3*^{+/-}-Versuchstiere wurden innerhalb der Neph-Gruppe zwei Weibchen und ein Männchen analysiert, innerhalb der ACEi-Gruppe stellte sich das Verhältnis umgekehrt dar. Bei *Nphys2*^{R140Q/+}-Tieren der Neph-Gruppe wurden ein Weibchen und zwei Männchen begutachtet, während in der mit ACEi behandelten Gruppe zwei Weibchen und ein Männchen untersucht wurden. Daten für Versuchstiere der Sham-Gruppe wurden nicht erhoben. Die Farbgebung jeweiliger Genotypen und Therapiegruppen ist analog zu den vorherigen Kapiteln. Die Ordinatenachse skaliert entsprechend den minimal und maximal möglichen Werten des Bewertungssystems jeweils von null bis drei. Auf den Abszissen, welche in jeder Darstellung einheitlich von null bis 40 skalieren, sind die Bewertungshäufigkeiten dargestellt. Diese geben an, wie häufig die jeweilige Note von den Bewertenden insgesamt für Aufnahmen von Präparaten der Tiere der jeweiligen Gruppe gegeben wurde. Die in Abbildung 22 dargestellten Daten wurden keiner statistischen Analyse unterzogen, da die Ergebnisse der homozygot erkrankten Tiere wie zuvor aufgrund der Unvergleichbarkeit bezüglich der Therapie von der Analyse ausgeschlossen wurden. Sie sollen lediglich als Referenz dienen.

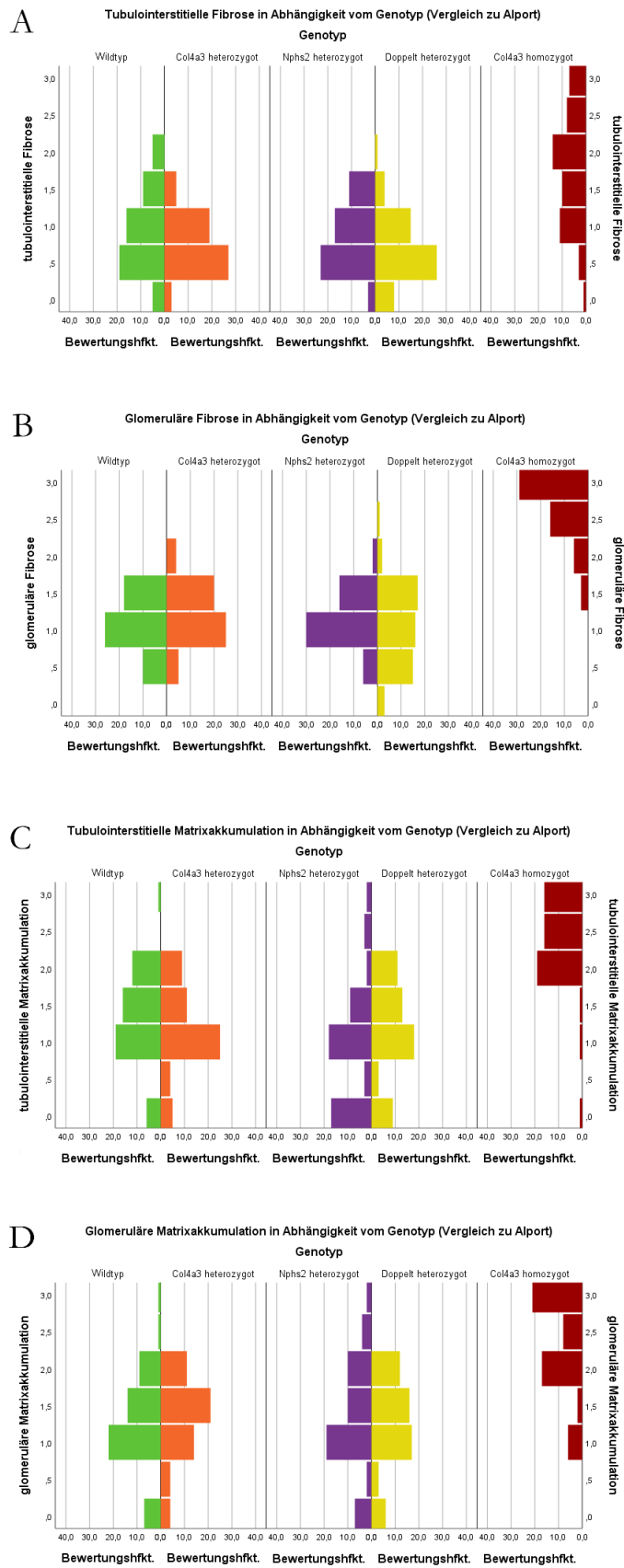


Abbildung 22: Ergebnisse der Immunfluoreszenz (Vergleich zu Alport) Gezeigt sind die Ergebnisse der Immunfluoreszenz. Gegenübergestellt sind die Daten der Versuchstiere der Neph-Gruppe und der *Col4a3*^{-/-}-Tiere, welche als Referenz dienen sollen und aufgrund der nicht vergleichbaren Behandlung aus der

statistischen Analyse ausgeschlossen wurden. (A) Bewertung der tubulointerstitiellen Fibrose in Abhängigkeit vom Genotyp. (B) Bewertung der glomerulären Fibrose in Abhängigkeit vom Genotyp. (C) Bewertung der tubulointerstitiellen Matrixakkumulation in Abhängigkeit vom Genotyp. (D) Bewertung der glomerulären Matrixakkumulation in Abhängigkeit vom Genotyp.

Es zeigte sich klar, dass homozygot erkrankte Versuchstiere im Schnitt deutlich schlechter abschnitten als die Tiere aller anderen Genotypen. Dies war konsistent für beide Färbungen und Vergrößerungen erkennbar. Es ließ sich dementsprechend deutlich ablesen, dass die renale Struktur der *Col4a3*^{-/-}-Versuchstiere als ungünstiger zu bewerten war als bei den vier Genotypen des Versuches, obwohl diese keiner Uninephrektomie unterzogen wurden und mit einem Alter von 60 Tagen deutlich jünger waren als die Versuchstiere der anderen Genotypen, welche in einem Alter von 180 Tagen getötet wurden. Für die Betrachtung und Interpretation der folgenden Datensätze ist also zu bedenken, dass sich die Ergebnisse aller Versuchsgruppen im Vergleich zu homozygot erkrankten Versuchstieren deutlich besser darstellten und trotz Uninephrektomie keine dieser Gruppen einen im Mittel vergleichbaren Grad der Nierenschädigung erreichte.

3.4.1 Tubulointerstitielle Fibrose

Die Einschätzung der tubulointerstitiellen Fibrose ergab sich aus der Bewertung der 100-fach vergrößerten Aufnahmen der gegen Fibronectin gefärbten Präparate. Die Bewertung erfolgte entsprechend den in Tabelle 13 dargestellten Vorgaben.

Die in Abbildung 23 gezeigten Daten machen deutlich, dass der Genotyp nach Nephrektomie keinen entscheidenden Einfluss auf die tubulointerstitielle Fibrose nahm, wenn keine ACEi-Therapie appliziert wurde. Innerhalb der ACEi-Gruppe schnitten Wildtypen und *Nphs2*^{R140Q/+}-Tiere hingegen signifikant besser ab als doppelt heterozygote Tiere und *Col4a3*^{+/-}-Versuchstiere.

In Abbildung 24 zeigt sich ein ähnliches Bild. Wildtypen und Podocin heterozygot mutierte Tiere wiesen eine erhebliche Verbesserung der renalen Struktur hinsichtlich der tubulointerstitiellen Fibrose auf. Bei den *Col4a3*^{+/-}-Mäusen war dieser Effekt deutlich schwächer ausgeprägt, während die doppelt heterozygoten Versuchstiere diesbezüglich nicht signifikant von der ACEi-Therapie profitieren konnten.

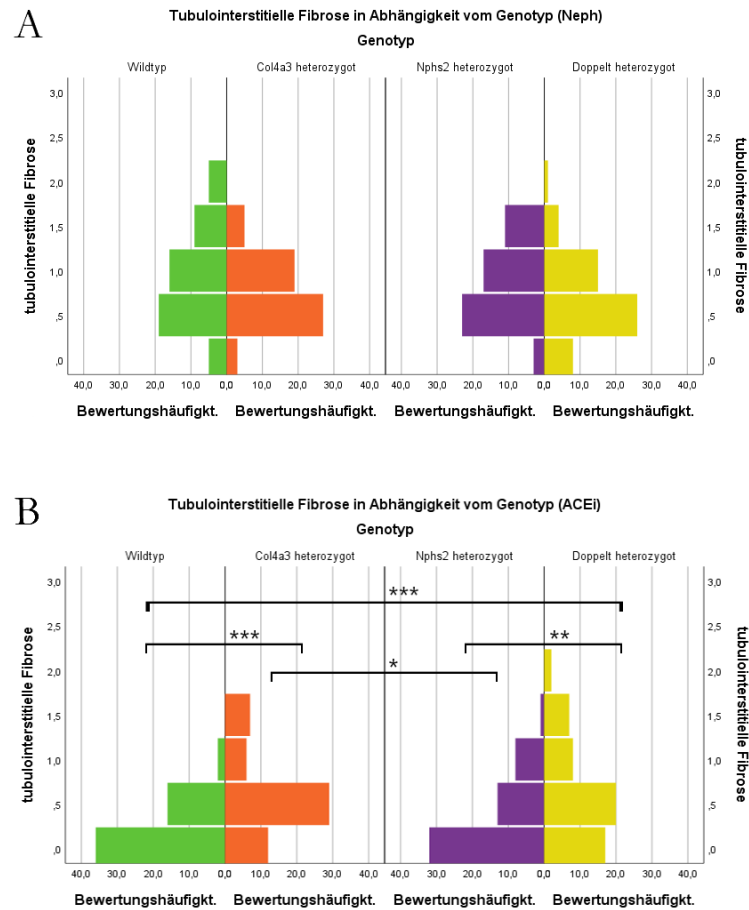


Abbildung 23: Tubulointerstitielle Fibrose in Abhängigkeit vom Genotyp Gezeigt sind die Ergebnisse der Bewertung der tubulointerstitiellen Fibrose in Abhängigkeit vom Genotyp. (A) Daten der Neph-Versuchstiere. Es ergaben sich bei diesen in Abhängigkeit vom Genotyp keine signifikanten Unterschiede. (B) Ergebnisse der Tiere der ACEi-Gruppe. Unter ACEi-Therapie zeigten sich deutliche Unterschiede abhängig vom Genotyp. Wildtyp-Tiere ($0,19 \pm 0,28$) wiesen eine signifikant geringere tubulointerstitielle Fibrose als *Col4a3*^{+/-}-Mäuse ($0,59 \pm 0,35$) ($p = 0,000$ nach Kruskal-Wallis-Test) und doppelt heterozygote Tiere ($0,60 \pm 0,57$) ($p = 0,000$ nach Kruskal-Wallis-Test) auf. Ebenso wurde die tubulointerstitielle Fibrose auch bei Versuchstieren mit *Nphs2*^{R140Q/+}-Genotyp ($0,30 \pm 0,41$) signifikant niedriger eingeschätzt als bei *Col4a3*^{+/-}-Tieren ($0,59 \pm 0,35$) ($p = 0,01$ nach Kruskal-Wallis-Test) und doppelt heterozygoten Versuchstieren ($0,60 \pm 0,57$) ($p = 0,004$ nach Kruskal-Wallis-Test).

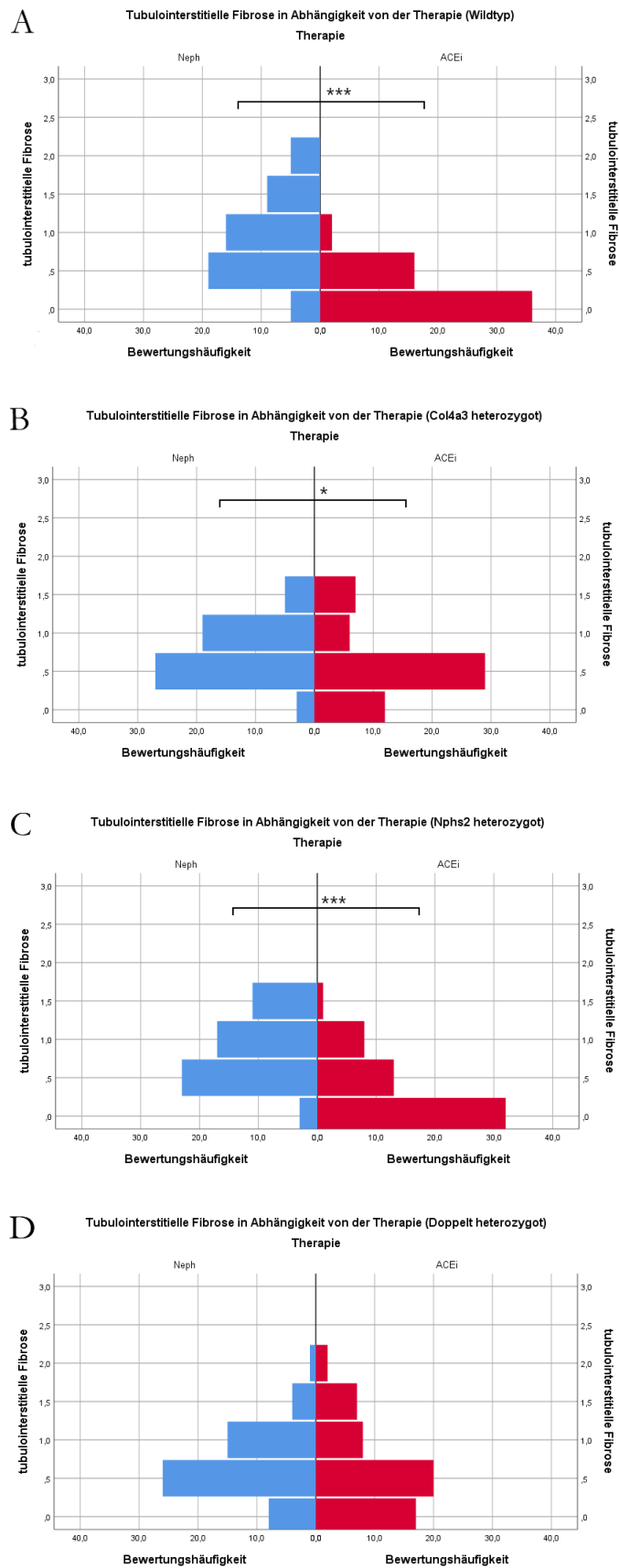


Abbildung 24: Tubulointerstitielle Fibrose in Abhängigkeit von der Therapie Gezeigt sind die Ergebnisse der Bewertung der tubulointerstitiellen Fibrose in Abhängigkeit von der Therapie. (A) Daten der Wildtyp-Versuchstiere. Mäuse mit ACEi-Therapie ($0,19 \pm 0,28$) wiesen eine signifikant bessere renale

Struktur auf als Neph-Tiere ($0,91 \pm 0,56$) ($p = 0,000$ nach Mann-Whitney-U-Test). (B) Therapievergleich der *Col4a3*^{+/-}-Tiere. Auch hier wurden Tiere der ACEi-Gruppe ($0,57 \pm 0,46$) signifikant besser bewertet als Neph-Tiere ($0,74 \pm 0,37$) gleichen Genotyps ($p = 0,015$ nach Mann-Whitney-U-Test). (C) Daten der *Nphs2*^{R140Q/+}-Mäuse. Wie zuvor zeigte sich unter ACEi-Therapie ($0,27 \pm 0,41$) eine signifikante Verbesserung der tubulointerstitiellen Struktur im Vergleich zu Neph-Mäusen ($0,83 \pm 0,43$) ($p = 0,000$ nach Mann-Whitney-U-Test). (D) Therapievergleich bei doppelt heterozygotem Genotyp. Hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

3.4.2 Glomeruläre Fibrose

Die Einschätzung der glomerulären Fibrose ergab sich aus der Bewertung der 400-fach vergrößerten Aufnahmen der gegen Fibronectin gefärbten Präparate. Die Bewertung erfolgte entsprechend den in Tabelle 14 dargestellten Vorgaben.

Abbildung 25 zeigt die Bewertung der glomerulären Fibrose und ein grundsätzlich mit der Bewertung der tubulointerstitiellen Fibrose vergleichbares Bild. Auch in der 400-fachen Vergrößerung zeigten sich in der Neph-Gruppe keine signifikanten Unterschiede, während Wildtypen und *Nphs2*^{R140Q/+}-Versuchstiere unter Therapie mit ACEi signifikant besser eingeschätzt wurden als doppelt heterozygote Versuchstiere. Das Ergebnis der *Col4a3*^{+/-}-Tiere lag im Mittelfeld zwischen diesen Polen und unterschied sich von keinem der anderen Genotypen signifikant.

Bezüglich der glomerulären Fibrose profitierten, wie in Abbildung 26 zu sehen ist, die Mäuse aller Genotypen von der Therapie mit ACEi. Bei Wildtyp-, *Col4a3*^{+/-}- und *Nphs2*^{R140Q/+}-Versuchstieren war dieser Effekt jedoch stärker ausgeprägt als bei den doppelt heterozygoten Versuchstieren. Bei doppelt heterozygotem Genotyp ließ sich entsprechend nur eine spärliche Verringerung der Fibrosierung unter ACEi-Therapie verzeichnen. Mit abnehmender genetischer Beeinträchtigung wurde der Therapieeffekt bezüglich der Reduktion der tubulointerstitiellen und glomerulären Fibrosierung deutlicher.

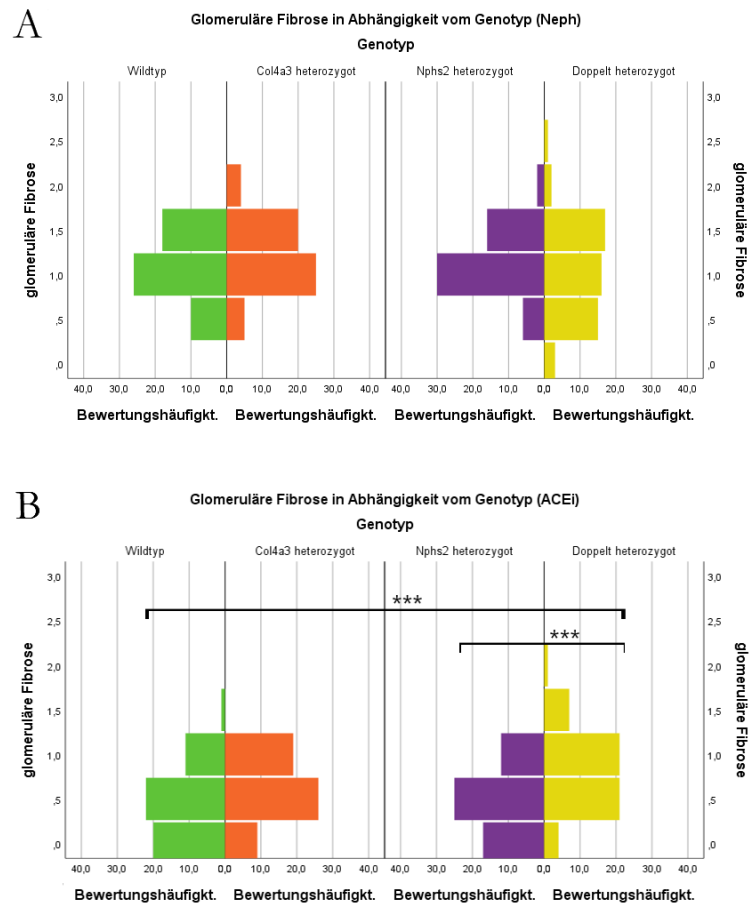


Abbildung 25: Glomeruläre Fibrose in Abhängigkeit vom Genotyp Gezeigt sind die Ergebnisse der Bewertung der glomerulären Fibrose in Abhängigkeit vom Genotyp. (A) Daten für Tiere der Neph-Gruppe. Für diese ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. (B) Genotypenvergleich für mit ACEi behandelte Tiere. Doppelt heterozygote Versuchstiere ($0,82 \pm 0,44$) wiesen eine signifikant stärkere glomeruläre Fibrosierung auf als Wildtypen ($0,44 \pm 0,40$) ($p = 0,000$ nach Kruskal-Wallis-Test) und *Nphs2*^{R140Q/+}-Tiere ($0,45 \pm 0,37$) ($p = 0,000$ nach Kruskal-Wallis-Test).

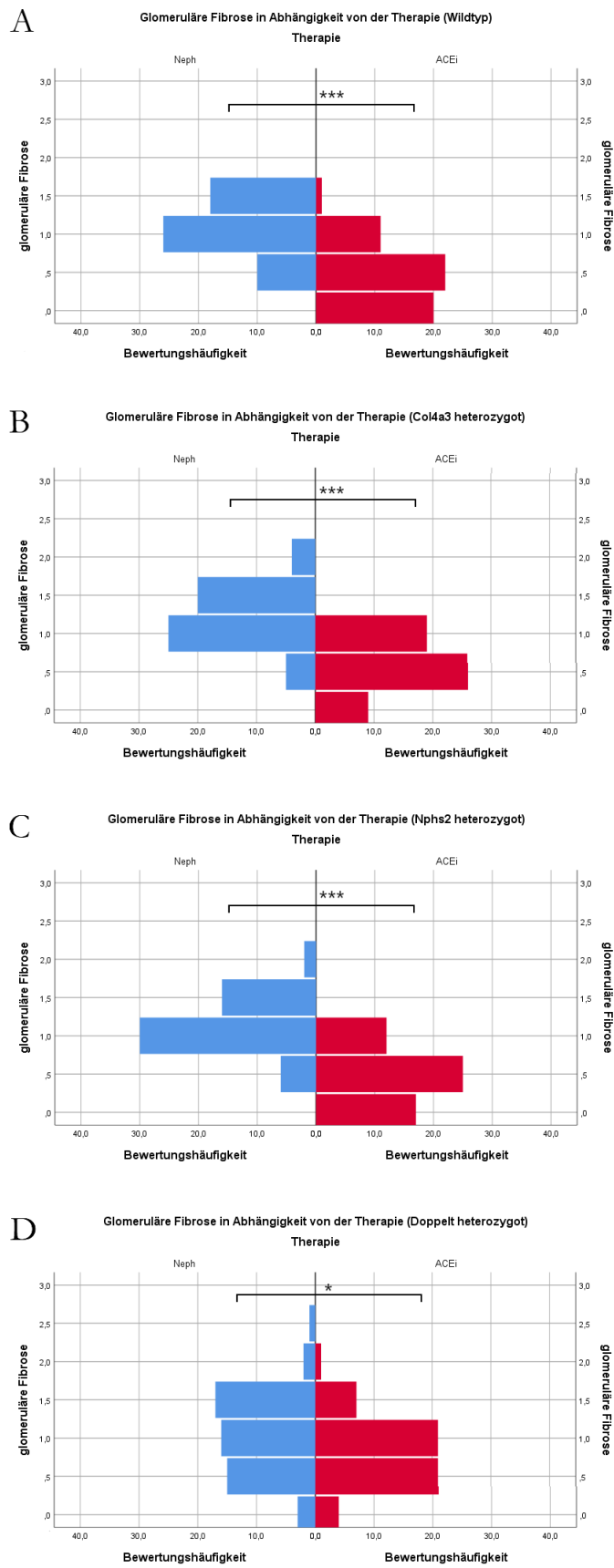


Abbildung 26: Glomeruläre Fibrose in Abhängigkeit von der Therapie Gezeigt sind die Ergebnisse der Bewertung der glomerulären Fibrose in Abhängigkeit von der Therapie. (A) Daten der Wildtyp-Versuchstiere. Unter ACEi-Therapie ($0,59 \pm 0,35$) wurden Versuchstiere signifikant besser eingeschätzt als Neph-Tiere (1,10)

$\pm 0,36$) gleichen Genotyps ($p = 0,000$ nach Mann-Whitney-U-Test). (B) Therapievergleich der *Col4a3*^{+/-}-Tiere. Die medikamentöse Therapie mit ACEi bewirkte eine signifikante Verringerung ($0,59 \pm 0,35$) der glomerulären Fibrose verglichen mit Tieren der Neph-Gruppe ($1,21 \pm 0,38$) ($p = 0,000$ nach Mann-Whitney-U-Test). (C) Daten der *Nphs2*^{R140Q/+}-Mäuse. Wie zuvor auch zeigte sich eine signifikant bessere Einschätzung der renalen Struktur bei Tieren mit ACEi-Therapie ($0,45 \pm 0,37$) im Vergleich zu denen ohne medikamentöse Folgetherapie ($1,13 \pm 0,35$) ($p = 0,000$ nach Mann-Whitney-U-Test). (D) Therapievergleich bei doppelt heterozygotem Genotyp. Es ergab sich eine signifikante Erniedrigung der glomerulären Fibrose unter ACEi-Therapie ($0,82 \pm 0,44$) verglichen mit der Neph-Gruppe ($1,03 \pm 0,54$) ($p = 0,031$ nach Mann-Whitney-U-Test).

3.4.3 Tubulointerstitielle Matrixakkumulation

Die Einschätzung der tubulointerstitiellen Matrixakkumulation ergab sich aus der Bewertung der 100-fach vergrößerten Aufnahmen der gegen Laminin gefärbten Präparate. Die Bewertung erfolgte entsprechend den in Tabelle 15 dargestellten Vorgaben.

Auch für die Einschätzung der tubulointerstitiellen Matrixakkumulation ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bei Neph-Versuchstieren, wie Abbildung 27 zeigt. Innerhalb der ACEi-Therapiegruppe zeigte sich eine signifikant niedrigere tubulointerstitielle Matrixakkumulation bei Wildtypen im Vergleich zu *Col4a3*-mutierten Versuchstieren mit oder ohne zusätzliche heterozygote *Nphs2*-Mutation.

Die in Abbildung 28 dargestellten Daten ermöglichten keine klare Einordnung des Therapieeffekts der ACEi-Behandlung. Während Wildtyp-Tiere von der Therapie profitierten, zeigte sich bei *Col4a3*^{+/-}- und *Nphs2*^{R140Q/+}-Versuchstieren eine leichte, aber signifikante Verschlechterung der renalen Struktur unter Therapie mit ACEi. Bei den doppelt heterozygoten Versuchstieren wurde unter der Therapie hingegen weder eine signifikante Verbesserung noch eine Verschlechterung der tubulointerstitiellen Matrixakkumulation beobachtet.

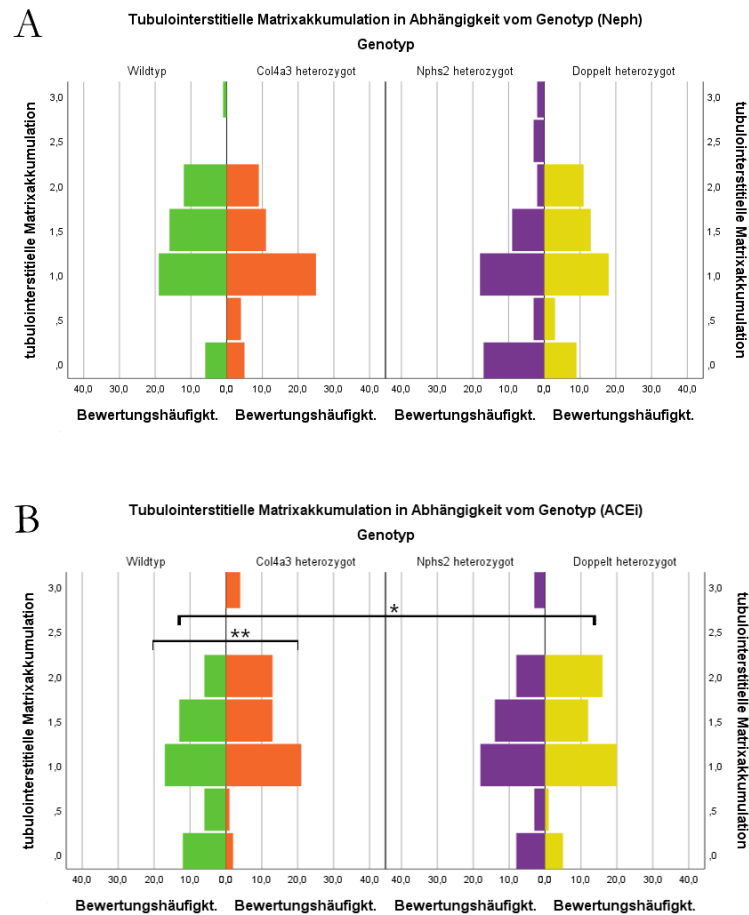


Abbildung 27: Tubulointerstitielle Matrixakkumulation in Abhängigkeit vom Genotyp Gezeigt sind die Ergebnisse der Bewertung der tubulointerstitiellen Matrixakkumulation in Abhängigkeit vom Genotyp. (A) Daten der nephrektomierten Versuchstiere, die keine ACEi-Therapie erhielten. Bei diesen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. (B) Genotypenvergleich der ACEi-Gruppe. Hierbei wurde die tubulointerstitielle Matrixakkumulation bei Wildtyp-Tieren ($0,95 \pm 0,65$) signifikant niedriger eingeschätzt als bei *Col4a3*^{+/-} ($1,46 \pm 0,66$) ($p = 0,003$ nach Kruskal-Wallis-Test) und *Col4a3*^{+/-}/*Nphs2*^{R140Q/+}-Versuchstieren ($1,44 \pm 0,65$) ($p = 0,039$ nach Kruskal-Wallis-Test).

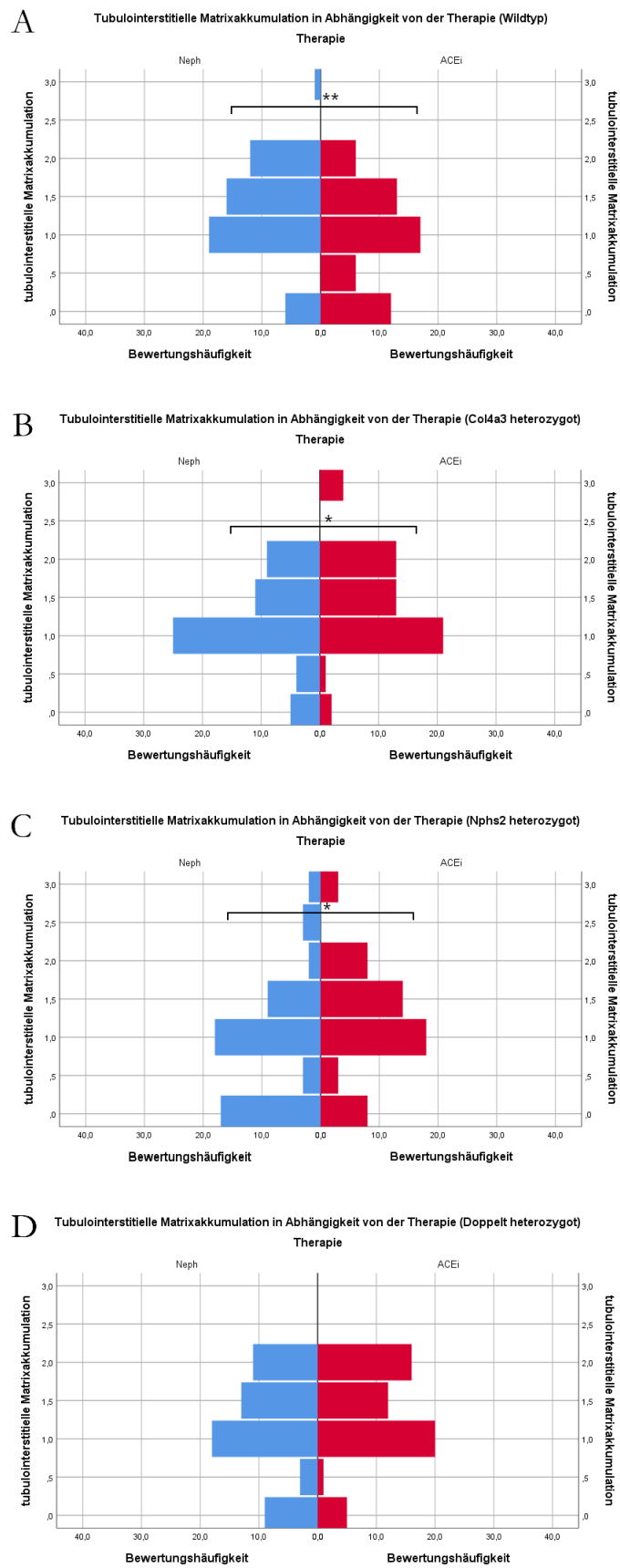


Abbildung 28: Tubulointerstitielle Matrixakkumulation in Abhängigkeit von der Therapie Gezeigt sind die Ergebnisse der Bewertung der tubulointerstitiellen Matrixakkumulation in Abhängigkeit von der Therapie. (A) Daten der Wildtyp-Versuchstiere. ACEi-Tiere ($0,95 \pm 0,65$) wiesen eine signifikant geringere

tubulointerstitielle Matrixakkumulation auf als Tiere ohne ACEi-Therapie ($1,30 \pm 0,63$) ($p = 0,009$ nach Mann-Whitney-U-Test). (B) Therapievergleich der *Col4a3^{+/-}*-Tiere. In diesem Falle zeigten Neph-Tiere ($1,14 \pm 0,56$) eine bessere Bewertung der renalen Struktur als mit ACEi behandelte Tiere gleichen Genotyps ($1,46 \pm 0,66$) ($p = 0,014$ nach Mann-Whitney-U-Test). (C) Daten der *Nphs2^{R140Q/+}*-Mäuse. Auch bei diesen wurden Tiere ohne ACEi-Therapie besser eingeschätzt ($0,94 \pm 0,83$) als solche mit ACEi-Therapie ($1,21 \pm 0,75$) ($p = 0,039$ nach Mann-Whitney-U-Test). (D) Therapievergleich bei doppelt heterozygotem Genotyp. Dort ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit von der Therapie.

3.4.4 Glomeruläre Matrixakkumulation

Die Einschätzung der glomerulären Matrixakkumulation ergab sich aus der Bewertung der 400-fach vergrößerten Aufnahmen der gegen Laminin gefärbten Präparate. Die Bewertung erfolgte entsprechend den in Tabelle 16 dargestellten Vorgaben.

Innerhalb der Neph-Gruppe konnte auch bezüglich der glomerulären Matrixakkumulation kein signifikanter Unterschied in Abhängigkeit vom Genotyp beobachtet werden, wie in Abbildung 29 gezeigt ist. Auch zwischen den mit ACEi behandelten Versuchstieren zeigten sich nur wenige Unterschiede. Mit Ausnahme der signifikant geringeren glomerulären Matrixakkumulation von Wildtyp-Tieren im Vergleich zu doppelt heterozygoten Versuchstieren zeigten sich keine weiteren signifikanten Unterschiede.

Entsprechend zeigt Abbildung 30 den Therapievergleich im Hinblick auf die glomeruläre Matrixakkumulation. Dieser Vergleich ergab kein signifikantes Ergebnis. Bei allen vier Genotypen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in Abhängigkeit von der Therapie.

Der Einfluss der ACEi-Therapie auf die tubulointerstitielle Matrixakkumulation war, wie dem Datensatz zu entnehmen ist, uneindeutig. Die glomeruläre Matrixakkumulation ließ sich durch die Applikation von ACEi nicht beeinflussen.

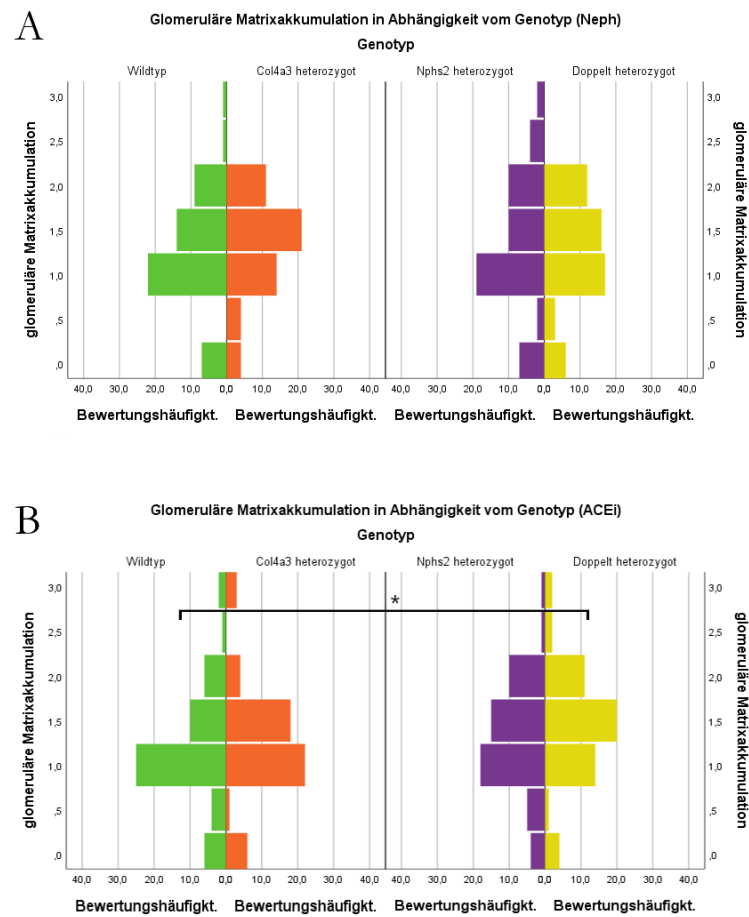


Abbildung 29: Glomeruläre Matrixakkumulation in Abhängigkeit vom Genotyp Gezeigt sind die Ergebnisse der Bewertung der glomerulären Matrixakkumulation in Abhängigkeit vom Genotyp. (A) Genotypenvergleich innerhalb der Neph-Gruppe. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. (B) Daten der mit ACEi behandelten Tiere. Wildtyp-Tiere ($1,16 \pm 0,68$) wiesen eine signifikant geringere glomeruläre Matrixakkumulation auf als doppelt heterozygote Versuchstiere ($1,44 \pm 0,65$) ($p = 0,04$ nach Kruskal-Wallis-Test).

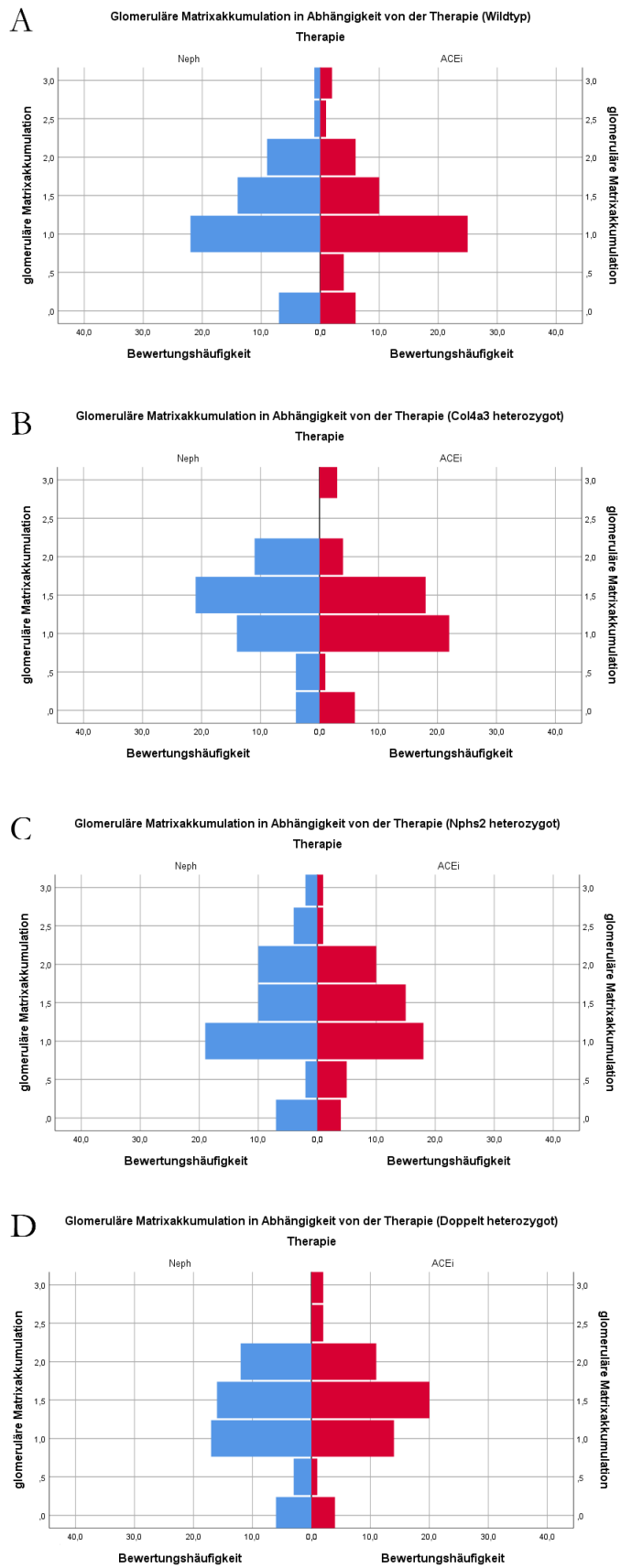


Abbildung 30: Glomeruläre Matrixakkumulation in Abhängigkeit von der Therapie Gezeigt sind die Ergebnisse der Bewertung der glomerulären Matrixakkumulation in Abhängigkeit von der Therapie. Über alle Genotypen hinweg ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, welche durch die Unterschiede in der

Therapie zu erklären waren. (A) Daten der Wildtyp-Versuchstiere. (B) Therapievergleich der *Col4a3^{+/-}*-Tiere. (C) Daten der *Nphs2^{R140Q/+}*-Mäuse. (D) Therapievergleich bei doppelt heterozygotem Genotyp.

3.5 Körpergewicht

Das Körpergewicht wurde zu statistischen Zwecken im Alter von 60 Tagen, zum Zeitpunkt der Operation, sowie 14, 21, 35 und 42 Tage nach der Operation erhoben. Die relative Veränderung des Gewichts wurde für das Alter von 60 Tagen bis zum Operationstermin, sowie zum Zeitpunkt der Operation bis zum 14. und 42. postoperativen Tag bestimmt. Ebenso wurde die Veränderung des Gewichts vom 14. bis zum 42. postoperativen Tag errechnet. Diese Daten wurden allesamt statistisch analysiert. Verglichen wurden die Einflüsse des Geschlechts, der Genotypen und der Therapien auf das absolute Körpergewicht sowie die Veränderung dessen in den definierten Zeitintervallen.

Mit Ausnahme der Erkenntnis, dass Männchen im Mittel signifikant schwerer waren als Weibchen gleichen Genotyps und gleicher Therapie, ergaben sich keine weiteren Ergebnisse. Insbesondere zeigte sich kein signifikanter Einfluss der ACEi-Therapie oder des Genotyps auf das Körpergewicht oder die Veränderung dessen vor oder nach der Operation. Aus diesem Grund wurde auf eine grafische Darstellung dieser Daten verzichtet.

4 Diskussion

Im Folgenden sollen die Ergebnisse interpretiert und diskutiert werden. Den Schwerpunkt bilden dabei die einleitend formulierten Fragestellungen an den Versuch. Sowohl der Einfluss einer zusätzlichen Podocin Variante bei Versuchstieren mit vorbestehender *Col4a3*-Mutation als auch die Bedeutung der Therapie mit ACEi sind führende Themen der Diskussion. Anschließend werden die Ergebnisse des Vergleiches der Albuminurie zwischen den Geschlechtern kurz dargestellt. Im darauffolgenden Kapitel sollen die angewandten Methoden sowie der Versuchsaufbau kritisch hinterfragt und Limitationen des Experimentes aufgezeigt werden. Den Abschluss bildet ein Abschnitt, welcher die Ergebnisse einerseits in einen klinischen Kontext rücken sowie andererseits einen möglichen wissenschaftlichen Ausblick liefern soll.

4.1 Einfluss der Therapie auf die Nierenfunktion in Abhängigkeit vom Genotyp

In den folgenden Kapiteln werden die Effekte der ACEi-Therapie im Hinblick auf den Einfluss der verschiedenen Genotypen besprochen. Zunächst sollen die Ergebnisse der verschiedenen Methoden einzeln diskutiert werden. Den Abschluss bildet eine Synopsis aller Ergebnisse, die die Bedeutung der R140Q-Podocin-Variante als *modifizier* bei heterozygoter Trägerschaft einer Alport-Variante in seiner Gesamtheit beleuchten soll.

4.1.1 Proteinurie

Die Untersuchung der Proteine im Urin stellt gemeinsam mit der IF-Mikroskopie den Mittelpunkt des Experimentes dar. Die Ergebnisse wurden im Zeitverlauf erfasst und miteinander bezüglich Unterschieden in Abhängigkeit von der Therapie und dem Genotyp analysiert. Zunächst lässt sich festhalten, dass keine Versuchstiergruppe eine vergleichbar hohe Proteinmenge im Urin aufwies wie *Col4a3*^{-/-}-Tiere. Konsistent mit den Beobachtungen, die mit Hilfe der anderen Methoden gemacht wurden, ist also erkennbar, dass Tiere der vier Versuchsgenotypen auch nach Nephrektomie kein mit homozygot erkrankten Mäusen vergleichbar schweres Krankheitsbild entwickeln. Zusätzlich lässt sich erkennen, dass auch die Menge von Proteinen im Urin selbst bei doppelt heterozygoten Versuchstieren nach simulierter Lebendnierenspende nicht so sehr ansteigt, dass sie vergleichbar mit der Proteinurie von homozygot erkrankten Tieren wäre, obwohl diese zum einen deutlich jünger waren und zum anderen nicht nephrektomiert wurden. Verglichen mit scheinoperierten Wildtypen ist dieser Anstieg eher gering ausgeprägt, weswegen die Ergebnisse der Proteinuntersuchung in Urin nicht als deutlich pathologische Proteinurie sondern eher als Veränderungen der Ausscheidungsmenge von Proteinen im

Urin innerhalb des physiologischen Rahmens zu verstehen sind. Dennoch ist die Proteinuntersuchung keineswegs ergebnislos geblieben. Insbesondere nach Nephrektomie und unter Therapie mit ACEi sind deutliche Unterschiede in Abhängigkeit vom Genotyp erkennbar.

Zunächst soll jedoch die Entwicklung der Proteinurie in Abhängigkeit der Therapie im Zeitraum vor der Nephrektomie besprochen werden. Da bis zur Operation keinerlei Therapie unternommen wurde, ist dieser Zeitraum ausschließlich in Abhängigkeit vom Genotyp untersucht worden. Es wurde dabei sehr deutlich, dass es zwar eine gewisse Schwankungsbreite der Proteinausscheidung im Urin gibt, diese jedoch weder eine klare Tendenz in abhängig vom Genotyp zeigt noch einen pathologischen Bereich verglichen mit den gesunden Wildtyp-Mäusen erreicht. Dies ist nicht unerwartet, da sich Mäuse, die eine heterozygote *Col4a3*-Variante tragen, auch in vergleichbaren Versuchen, bei welchen jedoch keine Nephrektomie vorgenommen wurde, diesbezüglich erst in einem Alter von sechs Monaten signifikant von Wildtyp-Mäusen unterschieden (Beirowski et al. 2006). Beim Menschen zeichnet sich ein ähnliches Bild, da heterozygote Träger einer Alport-Variante ebenfalls erst deutlich später renal erkranken als homo- oder hemizygot erkrankte Patienten (Jais et al. 2003). Auch ist bekannt, dass *Nphs2*^{R140Q/+}-Tiere bis zum ersten Lebensjahr keine pathologische Albuminurie entwickeln (Philippe et al. 2008). Diesen vorbekannten Zusammenhängen kann anhand der erhobenen Daten hinzugefügt werden, dass auch die heterozygote Trägerschaft eines *Col4a3*-*knock-outs* und einer zusätzlichen heterozygoten *Nphs2*-Variante im Mausmodell nicht zur frühzeitigen Entwicklung von pathologischer Proteinurie führt.

Bei der Messung der Proteinurie kurz nach Durchführung der Nephrektomien und Scheinoperationen zeigt sich im Vergleich mit den jeweiligen Sham-Tieren kein regelhafter Anstieg der Proteinurie für Wildtypen, *Nphs2*^{R140Q/+}- sowie *Col4a3*^{+/-}-Versuchstiere. Einzig sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Tieren mit doppelt heterozygotem Genotyp ist eine klare Anstiegstendenz nach Nephrektomie erkennbar. Im Vergleich zu den scheinoperierten Versuchstieren gleichen Genotyps war der Anstieg bei den doppelt heterozygoten Tieren mit Abstand am deutlichsten. In Relation gesetzt zu homozygot erkrankten Tieren sowie scheinoperierten Wildtypen ist jedoch auch hier nicht von einer stark pathologischen Proteinurie auszugehen. Wahrscheinlich ist, dass es nach Entfernung einer Niere zu einer konsekutiven Erhöhung des Filtrationsdrucks in der verbleibenden Niere entsprechend einer glomerulären Hyperfiltration gekommen ist. Der Anstieg des glomerulären Filtrationsdrucks mit daraus resultierender Hyperfiltration ist bei Lebendnierenspendern bereits beschrieben (Lenihan et al. 2015). Bei zunehmender Vorschädigung der GFB könnten auf diese Weise mehr Proteine im Urin ausgeschieden werden als bei geringerem Filtrationsdruck. Dass die renale Struktur bei doppelt heterozygoten Versuchstieren im Vergleich zu den einfach heterozygoten Tieren und Wildtypen beeinträchtigt ist, zeigt sich konsequent auch in den Ergebnissen der Beurteilung der Fibrose mittels IF. Eine Darstellung mit Fokus auf die strukturelle Beeinträchtigung

des glomerulären Filters, beispielsweise mittels Elektronenmikroskopie, sollte bei zukünftigen Versuchen unbedingt durchgeführt werden, um diese Ergebnisse weiter zu untermauern.

Die letzte Messung der Proteine im Urin im Alter von 180 Tagen zeigt im Vergleich zur Vormessung eine Reduktion der durch Hyperfiltration ausgelösten Proteinausscheidung. Alle Gruppen befinden sich zu diesem Zeitpunkt, unabhängig von ihrer Therapie oder dem Genotyp, in einem mit den scheinoperierten Wildtypen gleichen Geschlechts vergleichbaren Rahmen. Die Entwicklung einer pathologischen Proteinurie kann dementsprechend nicht angenommen werden. Da sich dieser relative Rückgang bei allen nephrektomierten Tieren zeigt, ist davon auszugehen, dass sich die verbleibende Niere über diesen Zeitraum bis zu einem gewissen Maße an die Hyperfiltration anpassen konnte. Diese These untermauernd ist bekannt, dass die GFR der verbleibenden Niere bei Lebendnierenspendern erhöht ist und auch dauerhaft erhöht bleibt, um den Verlust der zweiten Niere auszugleichen (Lenihan et al. 2015). Die im Spender verbleibende Niere ist einem höheren Blutfluss ausgesetzt (Lenihan et al. 2015), was mit glomerulärer Hyperfiltration einhergeht. Es ist allerdings auch beschrieben, dass sich die verbleibenden Glomeruli durch Hypertrophie und Hyperplasie an diese Bedingungen anpassen können, nachdem ein Teil der Glomeruli ausgefallen ist (Hayslett 1979).

Besonders deutlich war die Reduktion der Proteinmenge im Urin im Vergleich zum Zeitpunkt kurz nach der Operation zum letzten Messzeitpunkt bei den mit ACEi behandelten doppelt heterozygoten Tieren. Unter ACEi-Therapie zeigt sich bei allen Gruppen im Mittel eine Verringerung der Proteinmenge im Urin. Bei Wildtypen kann die Proteinausscheidung signifikant gesenkt werden, während der Effekt bei *Nphs2*^{R140Q/+}- sowie *Col4a3*^{+/-}-Versuchstieren nicht signifikant ausgeprägt ist. Gut erkennbar ist allerdings der Therapieeffekt bei den doppelt heterozygoten Versuchstieren. Diese hatten nach der Operation eine deutliche Steigerung der Proteinausscheidung im Urin erlebt. Nach etwa 30-tägiger Therapie mit ACEi befindet sich die Proteinausscheidung wieder im sicher physiologischen Bereich verglichen mit nicht nephrektomierten Wildtyp-Versuchstieren. Dass der Therapieeffekt gerade bei den doppelt heterozygoten Versuchstieren so stark ausfällt, spricht dafür, dass die deutlicher strukturell beeinträchtigte Niere durch die auftretende Hyperfiltration entsprechend stärker geschädigt wurde. Die vorliegende glomeruläre Hyperfiltration ließ sich durch die Gabe des ACEi anschließend effektiv behandeln. Einschränkend muss allerdings auch erwähnt werden, dass auch bei nicht mit ACEi behandelten, nephrektomierten Versuchstieren ein Rückgang der Proteinmenge im Urin zu verzeichnen ist. Der positive Effekt auf die Proteinurie kann demnach nicht ausschließlich der Applikation des ACEi zugeschrieben werden. Eine präzise Aufschlüsselung des jeweiligen attributiven Effekts von ACEi-Therapie und glomerulärer Anpassung ist aufgrund der geringen Gruppengröße nur schwerlich möglich.

Bei zukünftigen Versuchen sollte die Bedeutsamkeit der Schwankungsbreite von Ergebnissen der SDS-PAGE, insbesondere bei relativ geringer Proteinmenge, im Probenurin bedacht und dementsprechend große Gruppen angestrebt werden, dadurch könnte eine genauere Zuordnung der Effekte gelingen. Zusätzlich sollte bedacht werden, dass bei vergleichbaren Experimenten *Col4a3*^{+/-}-Mäuse ohne Durchführung einer Nephrektomie erst in einem Alter von sechs Monaten eine mit Wildtypen verglichen signifikante Erhöhung der Proteinurie mit einem weiterem Anstieg bis zum Tod mit etwa 22 Monaten entwickelten (Beirowski et al. 2006). Da gezeigt werden konnte, dass das zusätzliche Vorliegen der *Nphs2*^{R140Q/+}-Variante bei heterozygoten Trägern einer Alport-Variante im Mausmodell keinen drastischen Anstieg der Proteinurie nach Nephrektomie nach sich zieht, sollte es in Betracht gezogen werden, zukünftig bei vergleichbaren Versuchen von vornherein einen späteren Tötungszeitpunkt auszuwählen oder das Gesamtüberleben als zusätzlichen Endpunkt zu definieren.

4.1.2 Fibrose und Matrixakkumulation

Neben den Ergebnissen der Proteinuntersuchung haben auch die Beurteilung von renaler Matrixakkumulation und Fibrose mittels Immunfluoreszenz dazu beigetragen, die Bedeutung der R140Q-Podocin-Variante als möglichen *modifier* der Erkrankung bei heterozygoter Trägerschaft einer Alport-Variante weiter zu entschlüsseln. Wie auch bei der Messung der Proteinurie ist auch hier zunächst darauf hinzuweisen, dass die Tiere der Versuchsgenotypen im Mittel immer deutlich besser eingeschätzt wurden als homozygot erkrankte Versuchstiere. Es lässt sich wie zuvor daraus ableiten, dass sich auch mit Nephrektomie und zusätzlicher Trägerschaft einer Podocin-Variante nicht die Entwicklung eines mit homozygot erkrankten Tieren vergleichbar schweren Krankheitsbildes einstellt. In ähnlichen Versuchen führten ebenfalls weder *Col4a3*^{+/-}- noch *Nphs2*^{R140Q/+}-Genotyp zu einer frühzeitigen drastischen Verschlechterung der renalen Struktur im Vergleich mit Wildtyp-Versuchstieren (Beirowski et al. 2006; Philippe et al. 2008). Die jetzt gesammelten Daten belegen, dass auch eine doppelt heterozygote Trägerschaft dieser Merkmale keinen rapiden Verfall der renalen Struktur nach sich zieht. Dennoch nimmt das Vorliegen einer zusätzlichen Podocin-Variante Einfluss auf die renale Struktur, was insbesondere bei genauer Betrachtung des Ansprechens auf die ACEi-Therapie deutlich wird.

Beim Vergleich der Bewertungen der nephrektomierten Tiere, die keiner ACEi-Therapie zugeführt wurden, ergeben sich weder signifikante Unterschiede im Fibrosegrad noch in der Ausprägung der interstitiellen Matrixakkumulation. Es lässt sich dementsprechend ableiten, dass sich die renale Struktur primär nicht abhängig vom Genotyp verändert. Auch bei doppelt heterozygotem Genotyp kam es zu keiner deutlichen Verschlechterung der Nierenstruktur verglichen mit den Tieren der anderen Genotypen. Dem ist jedoch hinzuzufügen, dass sich der Genotyp eindeutig auf das Therapieansprechen auswirkt, wenngleich primär keine verstärkte Fibrosierung und Matrixakkumulierung verursacht wurde.

Dass die Nephrektomie mit resultierender Belastung der verbleibenden Niere durch Hyperfiltration einen strukturellen Schaden der verbleibenden Niere nach sich zieht, lässt sich daran erkennen, dass nephrektomierte Wildtyp-Versuchstiere unter ACEi-Therapie deutlich besser eingeschätzt wurden als ohne postoperative ACEi-Applikation. Unter der Annahme, dass die Gabe eines ACEi keinen Zustand herstellen kann, der besser ist als der Zustand völliger Nierengesundheit, welcher bei nicht nephrektomierten Wildtyp-Versuchstieren zu erwarten wäre, kann angenommen werden, dass die Verbesserung der Nierenstruktur durch ACEi bei Wildtyp-Tieren wenigstens teilweise den durch die Nephrektomie gesetzten strukturellen Schaden widerspiegelt. Es kann geschlussfolgert werden, dass die absolut durch die simulierte Lebendnierenspende gesetzte Schädigung unabhängig vom Genotyp in etwa gleich schwer ausfällt. Dass es sich dabei wahrscheinlich um keinen kritischen Nierenschaden handelt, lässt sich erahnen, wenn die jeweiligen Ergebnisse der Versuchsgruppen mit den Daten der *Col4a3^{-/-}*-Tiere verglichen werden. Zur besseren Einschätzung der Auswirkung einer Nephrektomie auf die Nierenstruktur sollte in zukünftigen Versuchen die Anfertigung von IF-Präparaten von nicht operierten Versuchstieren in Betracht gezogen werden.

Der Therapieeffekt des ACEi ist deutlich erkennbar auf die interstitielle und glomeruläre Fibrosierung, uneindeutig bezüglich der tubulointerstitiellen Matrixakkumulation und nicht mehr messbar bei der Bewertung der glomerulären Matrixakkumulation. Dies ist erklärbar dadurch, dass die Fibrosierung des Gewebes einer deutlich messbaren Matrixakkumulation im Krankheitsverlauf in der Regel vorausgeht und eine starke Vermehrung der interstitiellen Matrix bereits auf einen fortgeschrittenen Nierenschaden hinweist.¹ Dass es durch Fortschreiten der Nierenerkrankung im Verlauf zu einer Vermehrung der interstitiellen Matrix kommt, zeigt die Einschätzung der Präparate der homozygot erkrankten Versuchstiere, die zum einen eine deutlich verstärkte Fibrosierung, aber zum anderen auch eine starke glomeruläre sowie tubulointerstitielle Akkumulation von extrazellulärer Matrix aufweisen. Es lässt sich schlussfolgern, dass die Versuchstiere bis zu ihrer Tötung keine deutliche Matrixakkumulation entwickeln und sich dementsprechend auch kein Effekt einer ACEi-Therapie zeigen kann.

Besonders interessant sind die Ergebnisse des Vergleiches von Neph- gegen ACEi-Tiere, da hierbei deutliche Unterschiede abhängig vom Genotyp zu beobachten waren. Zunächst soll dieser Zusammenhang am Beispiel der tubulointerstitiellen und glomerulären Fibrose dargestellt werden. Bei der Betrachtung der Bewertung der tubulointerstitiellen Fibrose ist gut nachvollziehbar, dass das Therapieansprechen mit zunehmender genetischer Belastung abnimmt. Wildtypen und *Npbs2^{R140Q/+}*-Tiere zeigen eine sehr starke Verbesserung der Struktur unter ACEi-Therapie, bei *Col4a3^{+/-}*-Versuchstieren ist der Effekt schwächer und bei doppelt heterozygoten Versuchstieren nicht mehr signifikant nachweisbar. Die

¹ Diese Information verdanke ich Herrn Prof. Dr. med. O. Gross, der mich am 11. Februar 2020 in einem persönlichen Gespräch über diesen Zusammenhang unterrichtete.

Ergebnisse dieses Vergleiches bei stärkerer mikroskopischer Vergrößerung entsprechend der glomerulären Fibrose zeichnen ein sehr ähnliches Bild. Hierbei findet sich bei den Mäusen aller Genotypen außer den doppelt heterozygoten Tieren ein sehr starker Effekt auf die Reduktion der glomerulären Fibrose unter Therapie mit ACEi. Die doppelt heterozygoten Tiere zeigen ein schwächeres Therapieansprechen, welches jedoch im Gegensatz zum Ergebnis der tubulointerstitiellen Fibrose noch signifikant ist. Möglicherweise ist der Effekt erst bei höherer Vergrößerung sichtbar, weil dort auch geringere Veränderungen besser beurteilt werden konnten. Es folgt demnach, dass die Therapie mit ACEi grundsätzlich zu einer deutlichen Verringerung der renalen Fibrosierung führt. Dieser Effekt ist stärker ausgeprägt je weniger genetisch beeinträchtigt die Versuchstiere sind. Insbesondere die zusätzliche Trägerschaft einer Podocin-Variante bei Vorliegen der heterozygoten Trägerschaft einer Alport-Variante bewirkt ein stark reduziertes, aber nicht aufgehobenes Ansprechen auf die ACEi-Therapie.

Anders verhält sich der Effekt der ACEi-Therapie auf die Matrixakkumulation. Die Einschätzung der glomerulären Matrixakkumulation unterscheidet sich nicht in Abhängigkeit von der Therapie. Die Ergebnisse der tubulointerstitiellen Matrixakkumulation zeigen eine Verbesserung der Struktur durch ACEi bei Wildtypen, eine leichte Verschlechterung unter Therapie bei *Col4a3*^{+/-}- und *Nphs2*^{R140Q/+}-Versuchstieren und keinen Effekt bei doppelt heterozygoten Versuchstieren. Diese widersprüchlich erscheinenden Ergebnisse kommen wahrscheinlich dadurch zu Stande, dass die Versuchstiere insgesamt relativ gesund waren und eine deutliche Vermehrung der interstitiellen Matrix, wie zuvor dargelegt, erst in späteren Krankheitsstadien zu erwarten gewesen wäre. Untermauert wird dies durch vergleichbare Ergebnisse von Studien an homozygot erkrankten Mäusen, deren Erkrankung deutlich schneller fortschreitet und bei denen es unter ACEi-Therapie neben der Verringerung der Fibrose auch zu einer Minderung der Matrixakkumulation kommt (Gross et al. 2003). Bei schwereren renalen Strukturschäden wäre demnach auch hier ein klarer Effekt der ACEi-Therapie zu erwarten gewesen. So dient das Ergebnis als Hinweis darauf, dass die strukturelle Beeinträchtigung der verbleibenden Niere innerhalb der kurzen Zeit zwischen Operation und Präparation nicht drastisch zunimmt. Die nachgewiesene Verschlechterung der Struktur hinsichtlich der tubulointerstitiellen Matrixakkumulation bei *Col4a3*^{+/-}- und *Nphs2*^{R140Q/+}-Versuchstieren beruht mit größter Wahrscheinlichkeit auf einer gewissen interindividuellen Schwankungsbreite und nicht auf einem tatsächlichen Schaden ausgelöst durch die ACEi-Therapie. Unterstützt wird diese Annahme dadurch, dass bei einer tatsächlichen Schädigung durch ACEi in Abhängigkeit vom Genotyp bei *Col4a3*^{+/-}- und *Nphs2*^{R140Q/+}-Versuchstieren ebenfalls eine deutliche Verschlechterung der Struktur unter Therapie bei doppelt heterozygoten Tieren zu erwarten gewesen wäre, welche beide Merkmale auf sich vereinen. Da dies nicht der Fall ist und sich bei doppelt heterozygoten Versuchstieren stattdessen kein Effekt der Therapie zeigt, ist dieses Szenario sehr unwahrscheinlich. Dass es sich um eine interindividuelle Schwankung im physiologischen Rahmen handelt, wird

weiterhin unterstützt durch den Vergleich mit den *Col4a3^{-/-}*-Tieren, die deutlich schlechter eingeschätzt wurden, und durch das Wissen darum, dass der angewandte statistische Test aufgrund der hohen Gruppenstärke eine hohe Empfindlichkeit besitzt und demnach fähig ist, auch geringe Abweichungen als statistisch signifikant nachzuweisen. Da von jedem Präparat sechs Aufnahmen erstellt wurden und diese von jeweils drei verblindeten Probanden eingeschätzt wurden, ist die statistische Gruppengröße deutlich höher als die tatsächliche Anzahl der Versuchstiere der jeweiligen Gruppe.

Ebenso erscheint es zunächst widersprüchlich, dass gerade die heterozygoten Tiere, bei welchen die Proteinurie sehr stark gesenkt werden konnte, den geringsten Therapieeffekt bezüglich der Reduktion der renalen Fibrose aufweisen. Schließlich ist bekannt, dass TGF- β eine zentrale Rolle bei der fibrotischen Prozessen in der Niere zukommt (Loboda et al. 2016) und dieses im Rahmen von Proteinurie in das glomeruläre Ultrafiltrat gelangt und zu interstitieller Fibrosierung führen kann (Wang et al. 2000). Zusätzlich weiß man, dass TGF- β unter anderem beim Vorliegen von Alport- sowie Podocin-Varianten in der Niere verstärkt exprimiert wird (Beirowski et al. 2006; Philippe et al. 2008). Des Weiteren ist nachgewiesen worden, dass die Gabe von ACEi die erhöhte TGF- β -Expression wiederum senken und die Fibrosierung reduzieren kann (Mezzano et al. 2001; Gross et al. 2003; Beirowski et al. 2006; Gross et al. 2009). Neueren Erkenntnissen zufolge korrelieren jedoch bei Alport-Patienten die interstitielle Fibrose und die Proteinurie dennoch nicht gut miteinander (Gross et al. 2014). Eingedenk dieser Tatsache lässt es sich durchaus nachvollziehen, dass die Verringerung der im Urin ausgeschiedenen Proteinmenge bei den doppelt heterozygoten Versuchstieren nicht unbedingt mit einer ebenso deutlichen Reduktion der renalen Fibrosierung einhergehen muss, obwohl es biochemische Modelle gibt, die einen solchen Zusammenhang naheliegend erscheinen lassen. Hinzu kommt, dass der Fibrosegrad den besseren Langzeitprognoseparameter verglichen mit der Proteinurie darstellt (Gross et al. 2014). Es ist also zu erwarten, dass die Prognose der doppelt heterozygoten Tiere auf lange Sicht schlechter ist als die der anderen Versuchstiere, da die zusätzliche Podocin-Variante zu einer Verringerung des Therapieansprechens bezüglich der Fibrosierung führt, obwohl die Proteinausscheidung im Urin unter Therapie mit ACEi im Normbereich liegt. Untermauern ließe sich diese These in zukünftigen Experimenten einerseits durch die Festlegung des Gesamtüberlebens als primären Endpunkt und andererseits durch die Anfertigung von Präparaten zu einem definierten, aber späteren Zeitpunkt als 180 Tagen, um zu überprüfen, ob sich das beobachtete schlechtere Therapieansprechen der doppelt heterozygoten Versuchstiere auch auf lange Sicht so fortsetzen wird.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das zusätzliche Vorliegen einer Podocin-Variante bei Vorliegen einer heterozygoten Trägerschaft einer Alport-Variante zwar nicht primär zu einer Verschlechterung der renalen Struktur führt, aber dennoch einen prognostisch bedeutsamen Faktor darstellt. Das schlechtere Therapieansprechen bezüglich der Reduktion der renalen Fibrosierung, die als valider Prognosemarker gilt (Gross et al. 2014),

von Tieren mit doppelt heterozygotem Genotyp im Vergleich zu den anderen Versuchstieren wird voraussichtlich auch eine schlechtere Langzeitprognose dieser Tiere bedingen.

4.1.3 Harnstoff

Veränderungen der Harnstoffkonzentration im Serum waren abhängig von der Therapie und dem Genotyp. Zunächst lässt sich anhand der Ergebnisse festhalten, dass eine Nephrektomie unabhängig vom Genotyp grundsätzlich zu einer Erhöhung des Harnstoffs beiträgt. Signifikante Unterschiede der Sham- und Neph-Versuchstiere in Abhängigkeit des Genotyps ergaben sich nicht, es kann also davon ausgegangen werden, dass keiner der untersuchten Genotypen allein eine deutliche Erhöhung der Harnstoffkonzentration bedingt. Auch doppelt heterozygote Versuchstiere zeigen nach Nephrektomie keine stärkere Zunahme des Harnstoffs als Tiere anderer Genotypen. Im Kontrast dazu ist zu sehen, dass die *Col4a3^{-/-}*-Tiere einen deutlich erhöhten Wert aufwiesen, obwohl diese keiner Nephrektomie unterzogen wurden. Es folgt daraus, dass die Tiere der vier Versuchsgenotypen auch mit Nephrektomie und mit oder ohne ACEi-Therapie keine derartig erhöhten Harnstoffwerte aufweisen wie homozygot erkrankte Tiere. Dies kann so interpretiert werden, dass die Nierenfunktion der Versuchstiere auch nach simulierter Lebendnierenspende und trotz höheren Alters im Versuchszeitraum niemals so sehr abnimmt wie bei den homozygot erkrankten Versuchstieren. Diese Beobachtung ist auch unter Verweis auf die Ergebnisse der Proteinuntersuchung und IF-Mikroskopie konsistent. Auch Beobachtungen aus vorherigen Experimenten lassen sich damit in Einklang bringen. Bei einem vergleichbaren Versuch, bei dem keine Nephrektomie unternommen wurde, zeigte sich, dass *Col4a3^{+/-}*-Versuchstiere erst ab einem Alter von 18 Monaten eine signifikante Erhöhung des Serumharnstoffs im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen aufwiesen, während homozygot erkrankte Tiere bereits nach kurzer Zeit deutlich erhöhte Harnstoffwerte entwickelten (Beirowski et al. 2006). Dem hinzuzufügen ist anhand dieser Ergebnisse, dass auch die simulierte Lebendnierenspende und das Vorliegen einer zusätzlichen Podocin-Variante nicht zu einer drastischen und rapiden Verschlechterung der Nierenfunktion gemessen am Serumharnstoff führen.

Bei Wildtyp- und doppelt heterozygoten Versuchstieren führt die Applikation von ACEi zu einer signifikanten Erhöhung des Harnstoffwertes verglichen mit den Neph-Tieren gleichen Genotyps. Bei den *Col4a3^{+/-}*- sowie *Nphs2^{R140Q/+}*-Versuchstieren ist dieser Zusammenhang nur undeutlich in seiner Tendenz zu erkennen. Dass der Effekt bei diesen beiden Gruppen kaum zu beobachten ist, während er bei den genetisch gesunden und den doppelt heterozygoten Versuchstieren klar wird, ist unter Umständen auf die geringe Gruppengröße und eine interindividuelle Schwankungsbreite zurückzuführen. Es ist zu erwarten, dass die Untersuchung größerer Gruppen entsprechend klarere Ergebnisse liefern würde, die eindeutiger interpretierbar wären. Allgemein lässt sich erkennen, dass die

Applikation von ACEi über das Trinkwasser erfolgreich war, da ansonsten die deutlichen Veränderungen bei Wildtypen und doppelt heterozygoten Tieren nicht erklärlich wären.

Dass die Harnstoffkonzentration als Folge der Reduktion der GFR unter ACEi-Therapie bei genetisch gesunden Mäusen leicht ansteigt, entspricht dem auch bei genetisch nicht beeinträchtigten Menschen beobachtbaren Effekt von ACEi (Nishida et al. 2017). Auch bei Patienten, deren Nieren glomerulärer Hyperfiltration ausgesetzt sind, in diesem Beispiel sind das Patienten mit Typ 1 Diabetes, zeigen unter ACEi-Therapie eine GFR-Reduktion als nephroprotektiven Therapieeffekt (Naqvi et al. 2016). Auf lange Sicht trägt die Applikation von ACEi allerdings dazu bei, die GFR aufrechtzuerhalten (Bravo et al. 2008). Demnach handelt es sich bei der beobachteten Erhöhung des Serumharnstoffs durch ACEi um einen nephroprotektiven und gewollten Therapieeffekt und nicht um den Indikator einer etwaigen Nierenschädigung.

4.1.4 Cholesterin

Der Effekt der ACEi-Therapie auf den Cholesterinspiegel war unerwartet, aber deutlich. Unabhängig vom Genotyp führte die Applikation des Medikaments zu einer deutlichen Erhöhung des Cholesterins im Serum. Da der Effekt bei allen vier Versuchsgenotypen gleichartig auftrat, ist nicht von einem zufälligen Ergebnis auszugehen. In vorangegangenen Versuchen der Arbeitsgruppe wurde das Cholesterin nicht bestimmt, da kein starker Effekt der ACEi-Therapie darauf vermutet wurde. In einem vergleichbaren Experiment, bei welchem Mäuse zu einem anderen Zweck ACEi über das Trinkwasser erhielten, führte dies zu keiner Erhöhung des Serumcholesterins (Keidar et al. 2000). Die dort verwendeten Tiere unterscheiden sich jedoch im genetischen Hintergrund von den hier verwendeten, sodass möglicherweise ein Effekt vorliegt, der nur bei Tieren mit 129/Sv-Hintergrund nachweisbar ist.

Eine weitere Möglichkeit stellt die denkbare Interaktion zwischen Serumcholesterin und Ethanol dar. Es wurde je 1 ml Ethanol pro Liter Wasser zur Lösung von 40 mg ACEi-Pulver entsprechend einer 0,1 %igen Lösung verwendet. Dass eine so geringe Menge Ethanol einen so deutlichen Effekt ausgelöst haben kann, erscheint unwahrscheinlich, wenn man diese Ergebnisse mit denen anderer Versuche vergleicht. Ratten, welche über mehr als einen Monat 20 % Ethanol im Trinkwasser als einzige Flüssigkeitsquelle zu sich nahmen, zeigten eine nicht signifikante Erhöhung des Cholesterinspiegels (Ojeda et al. 2008). Bei Ratten, welche über vier Wochen ausschließlich über Flüssignahrung mit 35 % Ethanolanteil ernährt wurden, zeigte sich hingegen tatsächlich eine signifikante Erhöhung des Serumcholesterins (Wang et al. 2010). Im Vergleich dazu erscheint es sehr unwahrscheinlich, dass die vierwöchige Applikation einer 0,1 %igen Lösung einen ebenso deutlichen Effekt auf die Mäuse gehabt haben kann, wie es die deutlich höheren Konzentrationen auf die Ratten hatten. Das gilt selbstverständlich nur, wenn angenommen

wird, dass die Cholesterinhomöostase und der Effekt von Ethanol auf diese zwischen Ratten und Mäusen vergleichbar sind.

Ob die gemachten Beobachtungen auf den Menschen übertragbar sind und ob ihnen sogar klinische Relevanz im Sinne eines erhöhten Risikos für atherosklerotische Erkrankungen zukommt, ist kaum zu sagen. Publikationen, welche sich mit dem Einfluss von ACEi auf den Cholesterinhaushalt beschäftigen, finden sich nur äußerst spärlich. Da ACEi im klinischen Alltag erfolgreich eingesetzt werden, um das kardiovaskuläre Risiko zu senken, ist es eher unwahrscheinlich, dass eine möglicherweise messbare Cholesterinerhöhung eine klinisch relevante Nebenwirkung mit etwaigen vaskulären Folgeschäden darstellt. Eingedenk der Tatsache, dass die Beobachtung bereits bei Mäusen mit anderem genetischen Hintergrund nicht mehr gemacht werden konnte, ist eine direkte Übertragbarkeit dieses Effektes auf den Menschen kritisch zu hinterfragen. Nichtsdestotrotz wäre es wünschenswert, wenn die Messung des Cholesterinspiegels in nachfolgenden Experimenten, welche sich mit dem Effekt von ACEi befassen, beibehalten würde. Auf diese Weise wäre es zukünftig möglich, die Ergebnisse dieses Versuches besser einordnen und in einen größeren Kontext bringen zu können.

4.1.5 Einfluss der R140Q-Variante auf die Nierenfunktion bei heterozygoten Trägern einer Alport-Variante

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die R140Q-Variante zwar als *modifier* bei heterozygoten Trägern einer Alport-Variante zu agieren scheint, dieser Effekt jedoch nicht so stark ausgeprägt ist, wie zum Zeitpunkt der Planung des Experimentes angenommen wurde. Beobachtet wurde einerseits, dass es bei den Versuchstieren nach simulierter Nierenspende zu einer unter ACEi-Therapie schnell rückläufigen Steigerung der Proteinausscheidung im Urin kommt. Dieser Anstieg fällt bei doppelt heterozygotem Genotyp etwas kräftiger aus, ohne dabei Signifikanz zu erreichen. Serumharnstoff und Cholesterinspiegel werden nicht eindeutig durch das Vorliegen der zusätzlichen Podocin-Variante beeinflusst. Der deutlichste Hinweis auf die *Modifier*-Funktion der R140Q-Variante zeigt sich im schlechteren Therapieansprechen der doppelt heterozygoten Versuchstiere auf die ACEi-Therapie bezüglich der Reduktion der tubulointerstitiellen und glomerulären Fibrose im Vergleich zu sowohl Wildtypen als auch *Col4a3^{+/-}*- und *Nphs2^{R140Q/+}*-Versuchstieren. Da die renale Fibrosierung einen besseren Parameter als die Proteinurie für die Langzeitprognose bei Patienten mit Alport-Syndrom darstellt (Gross et al. 2014), ist anzunehmen, dass auch die doppelt heterozygoten Versuchstiere, bei denen sich die Fibrose weniger durch die Applikation eines ACEi behandeln lässt, eine schlechtere Langzeitprognose aufweisen, obwohl das Vorliegen der zusätzlichen Podocin-Variante nicht zu einer rapiden Verschlechterung der renalen Struktur und Funktion kurz nach der Uninephrektomie führt.

4.2 Einfluss des Geschlechts auf die Proteinurie

Der Einfluss des Geschlechtes auf die Höhe der Proteinurie war in diesem Experiment von vorrangig wissenschaftlichem und weniger klinischem Interesse. Nachdem anhand der starken Färbung der Proteingele von Männchen im Vergleich zu weiblichen Versuchstieren der Verdacht geäußert wurde, dass die Proteinmenge im Urin in Abhängigkeit von dem Geschlecht stünde, wurde beschlossen, dass dieser Vergleich zuerst angestellt werden sollte und bei deutlichen Unterschieden die folgenden Untersuchungen auf Unterschiede in Abhängigkeit von der Therapie und dem Genotyp jeweils geschlechtergetrennt vorgenommen werden müssten.

Insgesamt wird anhand der dargestellten Ergebnisse dieses Vergleiches sehr deutlich, dass es Unterschiede bezüglich der Höhe der Proteinurie zwischen Männchen und Weibchen gibt. Diese sind an vielen Stellen signifikant, außerdem ist es nicht vorgekommen, dass Weibchen eine größere Proteinmenge im Urin aufwiesen als Männchen gleicher Therapiegruppe und gleichen Genotyps. Es kann demnach angenommen werden, dass ein Zusammenhang zwischen männlichem Geschlecht und erhöhter Proteinmenge im Urin besteht. Aus diesem Grund wurden alle weiteren statistischen Analysen der Proteinuntersuchungen nach Geschlechtern getrennt vorgenommen. Ob dieser Zusammenhang auch bei Übertragung auf den Menschen konsistent bleibt und ob er dort von Relevanz ist, ist fraglich. In Relation zu den *Col4a3^{-/-}*-Tieren haben die Versuchstiere der anderen Genotypen allesamt eine sehr niedrige Menge Protein im Urin. Da Tiere innerhalb der Versuchsgruppen sich nur geringfügig von den Wildtyp-Versuchstieren gleicher Therapie unterscheiden, ist eine pathologische Proteinurie nicht anzunehmen. Alle Tiere bewegen sich demnach in einem physiologischen Rahmen. Daher ist auch eine klinische Relevanz dieser Beobachtung, aus der eine therapeutische Konsequenz folgen würde, eher unwahrscheinlich.

Dennoch kann eine geschlechterspezifische Betrachtung durchaus von Vorteil sein. Die Dosierung der ACEi-Therapie der Patienten wird in aller Regel unabhängig von dem Geschlecht gewählt. Neuere Studien, welche sich mit dem Ansprechen auf ACEi-Therapie in Abhängigkeit von dem Geschlecht bei Patienten mit Herzinsuffizienz beziehen, zeigen jedoch ein deutlich unterschiedliches Therapieansprechen für Männer und Frauen (Santema et al. 2019). Patientinnen wiesen ein optimales Therapieansprechen bereits bei niedrigerer Dosierung auf als Männer und konnten im Gegensatz zu männlichen Patienten nicht von einer weiteren Erhöhung der ACEi-Dosis profitieren, wenngleich die Rate von Nebenwirkungen bei Frauen mit höherer Dosierung anstieg (Santema et al. 2019). Dieser Zusammenhang war konsistent, auch wenn die ACEi-Dosis auf die jeweilige Körperoberfläche bezogen wurde, und legt demnach nahe, dass Unterschiede bezüglich des Ansprechens auf die ACEi-Therapie zwischen Frauen und Männern existieren und von therapeutischer Relevanz sind. Eine Evaluation solcher Effekte auch für Alport-Patienten

sowie deren Angehörige, insbesondere nach einer Lebendnierenspende, könnte zu einer Optimierung der Pharmakotherapie dieser Patientinnen und Patienten beitragen.

4.3 Kritische Auseinandersetzung mit dem Versuchsaufbau und Beleuchtung von Limitationen des Experiments

Im Folgenden sollen mögliche Stärken und Schwächen im Versuchsaufbau sowie daraus gegebenenfalls resultierende Limitationen des Experiments diskutiert werden.

Die Planung eines Experiments muss unter verschiedensten Vorannahmen durchgeführt werden, da der Ausgang des Experimentes naturgemäß ungewiss ist. Insbesondere grundlagenwissenschaftliche Versuche, die wenig Erforschtes besser beleuchten möchten, stehen so vor der Herausforderung, optimale Versuchsbedingungen schaffen zu wollen, ohne die genaue Bedeutung, Wirkung und Funktion des zu untersuchenden Objektes zu kennen. So kann zwar auf der einen Seite fehlende Optimalität des Experiments zu Limitationen der Ergebnisse oder Aussagekraft führen, auf der anderen Seite bietet sich allerdings die Chance, für nachfolgende Versuche noch bessere Beobachtungsbedingungen schaffen zu können.

4.3.1 Gruppengröße und Alter der Versuchstiere

Die notwendige Trennung der Ergebnisse der SDS-PAGE nach Geschlechtern war anhand der Ergebnisse der vorherigen Versuche der Arbeitsgruppe nicht vorhergesehen worden. Diese Aufteilung der Gruppen führte allerdings zu einer Halbierung der Gruppengröße, welche selbstverständlich statistisch ins Gewicht fällt. Bei größeren Gruppen lassen sich tatsächlich existierende Unterschiede deutlich besser als signifikant erkennen, da die analytische Präzision steigt. Eine Verdopplung der Versuchstierzahl, welche dem hätte entgegenwirken können, wäre jedoch außerhalb des Rahmens des Tierversuchsantrages und auch logistisch schwer durchführbar gewesen. Fraglich ist auch, ob eine Vergrößerung der Gruppen zu besser verwertbaren Ergebnissen geführt hätte. Eine Steigerung der Gruppengröße erhöht zwar die statistische Präzision, jedoch kann es auch dazu führen, dass vermehrt existierende, aber klinisch irrelevante, minimale Unterschiede nachgewiesen werden. Denkbar wäre auch gewesen, die Gruppen nicht nach Geschlechtern zu trennen, obwohl sie sich unterschieden, um die ursprüngliche Gruppengröße zu erhalten. Statistisch hätte das dazu geführt, dass aufgrund der hohen und unregelmäßigen Streuung in aller Regel keine Normalverteilung des Datensatzes hätte angenommen werden können. Dadurch wäre es nicht mehr möglich gewesen, starke Tests, die normalverteilte Daten voraussetzen, anzuwenden, und es hätten beinahe in jedem Fall nicht parametrische Tests angewandt werden müssen. Diese kommen insbesondere bei relativ kleinen Datensätzen deutlich seltener zu statistisch signifikanten Ergebnissen als vergleichbare parametrische Tests. Dass diese Tests allerdings auch ein berechtigtes Einsatzgebiet haben, zeigen die Ergebnisse der Immunfluoreszenz, welche aufgrund des Ordinalskalenniveaus der Daten

ausschließlich mit nicht parametrischen Tests errechnet wurden. Der Datensatz der IF-Ergebnisse hatte allerdings den Vorteil, dass jeweils sechs Aufnahmen mit dem Immunfluoreszenzmikroskop erstellt wurden, welche jeweils von drei verschiedenen Personen benotet wurden, wodurch dieser um ein Vielfaches größer war, was wiederum die statistische Präzision deutlich erhöhte.

Die Versuchstiere waren zum Zeitpunkt der Operation und der Tötung relativ jung. Wildtyp-Versuchstiere desselben Stammes erreichen ein Alter von etwa 30 Monaten, während *Col4a3*^{+/-}-Versuchstiere im Mittel ein Alter von fast 22 Monaten erreichen können (Beirowski et al. 2006). Verglichen damit fand die Operation in einem Alter von etwa viereinhalb Monaten relativ früh statt. Auch die Entwicklung von Proteinurie von 129/Sv-*Col4a3*^{+/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtypen wurde bereits zuvor mittels SDS-PAGE untersucht. Sie unterschied sich erst ab einem Alter von sechs Monaten signifikant, davor waren keine signifikanten Unterschiede nachweisbar (Beirowski et al. 2006). Die Harnstoffwerte im Serum unterschieden sich sogar erst ab dem 18. Lebensmonat zwischen *Col4a3*^{+/-}- und Wildtyp-Versuchstieren signifikant (Beirowski et al. 2006). Die Tiere des erwähnten Versuches wurden allerdings nicht nephrektomiert und wiesen auch keine weiteren Mutationen wie etwa einen Podocin-Polymorphismus auf. Die Erwartung, dass die durch Uninephrektomie verursachte Hyperfiltration zu einer so starken Belastung der Niere führen würde, dass die Nierenfunktion bereits im Alter von 180 Tagen schwer eingeschränkt sein würde, erfüllte sich nicht. Selbstverständlich bedeutet das nicht, dass das Experiment diesbezüglich ergebnislos ist, im Gegenteil folgt daraus, dass die Belastung der verbleibenden Niere durch die auftretende Hyperfiltration das Fortschreiten der Nierenerkrankung weniger beschleunigt als erwartet. Des Weiteren eröffnet sich eingedenk dessen, dass selbst doppelt heterozygote Versuchstiere lange relativ gesund bleiben und wenig belastet sind, die Möglichkeit, weitere Versuche anzuschließen, welche mit dem Ziel geplant werden sollten, die Langzeiteffekte der Uninephrektomie auf die Funktion und Struktur der verbleibenden Niere zu untersuchen. Zu diesem Zweck bietet es sich an, sowohl Versuchstiere geplant in einem höheren Alter zu töten, um vergleichbare Ergebnisse zu einem spezifischen Zeitpunkt zu erhalten, als auch eine Gruppe von Tieren zu untersuchen, bei welcher das Gesamtüberleben das zentrale Element des Experiments darstellt.

4.3.2 Mögliche Fehlerquellen bei der Untersuchung der Proteinurie

Die Untersuchung der Proteine im Urin durch SDS-PAGE ist ein verbreitetes und relativ verlässliches Verfahren. Dennoch gibt es eine große Menge möglicher Fehlerquellen, die die Aussagekraft der Ergebnisse limitieren können. Zunächst einmal ist es nicht immer einfach, saubere Urinproben zu erhalten, diese können makroskopisch nicht sichtbar mit Blut, Sperma, Vaginalsekret oder Kot verunreinigt sein, wodurch die Untersuchung beeinträchtigt wird, auch wenn jede Probe, um dem vorzubeugen, vor der Untersuchung zentrifugiert wurde. Die manuelle Akquirierung der Proben hat im Gegensatz zur

Sammlung in einem metabolischen Käfig verschiedene Vorteile. So kann jede Probe einzeln begutachtet und gegebenenfalls verworfen werden, wenn sie die hohen Qualitätsansprüche nicht erfüllen sollte. Diese Möglichkeit bietet ein metabolischer Käfig nicht. Ebenso setzt der metabolische Käfig die Versuchstiere dauerhaftem Stress aus, da sie dort isoliert sein müssen und über eine längere Zeit über wenig Beschäftigung, Schutz und festen Boden verfügen. Dagegen dauert das manuelle Sammeln in der Regel nur wenige Minuten pro Maus, wonach diese zurück in ihren angestammten Käfig mit anderen Tieren, mehr Platz und mehr Möglichkeiten zur Beschäftigung gesetzt werden. Diese Prozedur wurde zwar teilweise zwei Mal täglich für bis zu maximal sieben Tage am Stück durchgeführt, stellt jedoch mit höchster Wahrscheinlichkeit immer noch eine weit stressärmere Methode für die Versuchstiere dar als die Nutzung eines metabolischen Käfigs und führt zu qualitativ hochwertigeren Proben.

Anfällig für Fehler ist auch die Präparation der Urinproben, bevor diese auf das Polyacrylamidgel aufgetragen werden können. So kann das Proteinpellet, das nach Zentrifugation entsteht, beim abpipettieren des Überstandes beschädigt werden, wodurch ein Anteil der Proteine verloren gehen kann. Als schwer standardisierbar stellte sich die Trocknung der Proben nach der Fällung heraus. Aufgrund unterschiedlicher Proteinmengen benötigen diese eine unterschiedlich lange Zeit, um trocken genug für die weitere Verwendung zu sein. Dadurch ist es möglich, dass einerseits Proteine stark eintrocknen und sich danach nicht mehr gut im Puffer lösen oder andererseits Reste vom verwendeten Methanol im Reaktionsgefäß verbleiben, welche die Verwertbarkeit der Spur massiv einschränken und bei Auftreten in der Regel zu einer Wiederholung des Versuches zwingen. Ebenso ist es denkbar, dass beim Auftragen der Proben auf das Gel Proteinreste im Reaktionsgefäß zurückbleiben können, entweder weil diese sich zuvor nicht vollständig im Puffer gelöst hatten oder weil sie während des Trocknungsprozesses an die Gefäßwand adhärten und sich von dieser im Verlauf nicht mehr lösten. Selbstverständlich wurde jedes Reaktionsgefäß beim Auftragen der Probe genauestens begutachtet, dennoch ist nicht sicher auszuschließen, dass mit bloßem Auge nicht sichtbare Proteinreste in diesen zurückbleiben hätten können. Etwaigen geringen Unterschieden in der Zusammensetzung der Polyacrylamidgele wurde durch das Auftragen des jeweils identischen BSA-Standards und die Relation aller Messungen auf diesen begegnet, weswegen die Bedeutung dieser möglichen Fehlerquelle als gering angesehen werden kann.

Die genannten Möglichkeiten für etwaige Ungenauigkeiten in der Proteinuntersuchung im Urin führen allesamt zu einer größeren Streuung der Messungen um den wahren Wert, wodurch die Präzision des Ergebnisses sinkt. Es steigt also auch die Standardabweichung, dies ist aus den in Kapitel 4.3.1 genannten Gründen insbesondere bei kleinen Gruppen statistisch ungünstig. Dass die Proteinuntersuchung im Urin mittels SDS-PAGE dennoch relativ verlässlich funktioniert hat, war daran auszumachen, dass bei der teilweise notwendigen Wiederholung einzelner Spuren vergleichbare Messergebnisse erzielt wurden.

Wie in Kapitel 3.1.2 bereits erwähnt, war es logistisch nicht möglich alle Versuchstiere exakt an ihrem 138. Lebenstag zu operieren. Dies bedingte, dass im Zeitintervall der Urinprobengewinnung um den 150. Lebenstag einige Tiere der ACEi-Gruppe bereits eine ACEi-Therapie erhielten, während andere dieser erst einige Tage später zugeführt wurden. Das kam zu Stande, da bei allen Tieren Urin um den 150. Lebenstag akquiriert wurde, während die ACEi-Therapie immer am 14. postoperativen Tag begonnen wurde, der in der Regel innerhalb des Zeitintervalls lag, in welchem auch Urinproben gewonnen wurden. Dadurch ist die Aussagekraft dieses wichtigen Zeitpunkts für die Betrachtung der Proteine im Urin in der Gruppe der mit ACEi behandelten Tiere eingeschränkt. Auch wenn es nicht zu erwarten ist, dass eine ACEi-Therapie von nur wenigen Tagen Dauer in diesem Fall bereits zu signifikanten Unterschieden geführt hat, so sollte dies dennoch bei der Planung zukünftiger, vergleichbarer Versuche bedacht werden, um dieser Ungenauigkeit vorbeugend begegnen zu können.

4.3.3 Mögliche Fehlerquellen bei der Immunfluoreszenzmikroskopie

Die präzisen und differenzierten Ergebnisse der Immunfluoreszenzmikroskopie sprechen dafür, dass das Verfahren grundsätzlich sehr geeignet war, die strukturelle Integrität der Nieren zu bewerten. Des Weiteren ist die IF als Mittel zur Bewertung der renalen Struktur in verschiedenen Arbeitsgruppen gut etabliert und führt regelmäßig zu gut verwertbaren Ergebnissen (Miner und Sanes 1996; Gross et al. 2003; Roselli et al. 2004a; Gross und Weber 2005; Meehan et al. 2009).

Dennoch kann eine gewisse Ungenauigkeit des Verfahrens angenommen werden. Zum einen kann eine für jedes Präparat exakt identische Beladung mit Antikörpern unmöglich gewährleistet werden, auch wenn mit maximaler Genauigkeit gearbeitet und bei jedem Färbvorgang eine Kontrolle mitbehandelt wird. Zum anderen ist die Belichtung bei der Erstellung der Aufnahmen durch das Fluoreszenzmikroskop nicht immer optimal. Zwar wurde die Belichtungszeit entsprechend der Stärke der Färbung des Präparats unter Zuhilfenahme eines Sättigungsfilters so eingestellt, dass sich bei allen Präparaten eine vergleichbare Belichtung zeigte, jedoch gestaltete sich dies insbesondere bei schwach angefärbten Präparaten häufig schwieriger. Dies führte dazu, dass insbesondere Präparate von relativ gesunden Tieren nicht immer optimal zu belichten waren, wodurch die Differenzierung dieser Präparate voneinander unter Umständen erschwert wurde. Ähnlich gestaltete es sich bei sehr stark angefärbten Präparaten, dies traf insbesondere auf jene der *Col4a3^{-/-}*-Versuchstiere zu. Nach Sättigungsfilter waren diese häufig selbst dann noch überbelichtet, wenn deutlich kürzer belichtet wurde als bei den Aufnahmen anderer Genotypen. Trotz dieser Schwierigkeit wurde immer versucht, eine ausreichende Differenzierbarkeit sowie Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Dass dies weitestgehend gelungen ist, zeigt sich beispielsweise auch darin, dass genetisch stark beeinträchtigte Tiere mit homozygoter Mutation im Mittel deutlich schlechter eingeschätzt wurden als Tiere anderer Genotypen. Am anderen Ende der Bewertungsskala zeigte sich, dass bei

nephrektomierten Wildtyp-Versuchstieren, welche im Vergleich als relativ wenig beeinträchtigt einzustufen sind, der Effekt der ACEi-Therapie gut nachweisbar war. Eine gute Vergleichbarkeit der Präparate untereinander kann dementsprechend mit hoher Wahrscheinlichkeit angenommen werden.

Eine gewisse Limitation der Aussagekraft der Ergebnisse ergibt sich daraus, dass keine Präparate von scheinoperierten Versuchstieren angefertigt wurden. Es kann demnach keine direkte Aussage darüber getroffen werden, welchen strukturellen Effekt die Hyperfiltration nach sich zog. Es konnte auf der anderen Seite deutlich gezeigt werden, welchen Effekt die ACEi-Therapie insbesondere auf die Fibrose hatte, wodurch sich rückschließen lässt, dass die strukturelle Nierenschädigung durch die Therapie begrenzt ist. Da sich zwischen den Genotypen keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Neph-Gruppe zeigten, wäre es für vergleichbare nachfolgende Arbeiten empfehlenswert, wenigstens für eine Gruppe scheinoperierter Wildtyp-Tiere zusätzlich Präparate anzufertigen, um diese zu den nephrektomierten Exemplaren in Relation setzen zu können. Ein klarer Vorteil davon, nur zwei Therapiegruppen vergleichen zu müssen, liegt allerdings darin, dass statistische Tests angewandt werden können, welche einerseits einseitig testen können, wodurch die Wahrscheinlichkeit einen Effekt signifikant nachweisen zu können im Vergleich zu zweiseitigen Tests deutlich ansteigt, und andererseits nicht auf *Post-hoc*-Tests angewiesen sind, wodurch wiederum existierende Unterschiede mit höherer Wahrscheinlichkeit als signifikant unterschiedlich erkannt werden können. In Anbetracht dessen, dass aufgrund des Ordinalskalenniveaus der Daten die im Vergleich zu parametrischen Tests relativ unempfindlichen nicht parametrischen Tests angewandt werden müssen, kann dieser Anstieg der statistischen Präzision je nach Versuchsaufbau von entscheidender Bedeutung sein.

4.4 Ausblick

Den Abschluss der Diskussion bildet dieser zweigeteilte Ausblick. Zunächst soll ein wissenschaftlicher Ausblick gegeben werden, der den Versuch einerseits in einen größeren wissenschaftlichen Kontext einordnen und andererseits Anreize für zukünftige Experimente schaffen soll, um die Bedeutung von Podocin-Varianten als *modifier* bei Patienten mit heterozygoter Trägerschaft weiter zu entschlüsseln. Anschließend soll ein klinischer Ausblick die Ergebnisse des Experiments hinsichtlich ihrer therapeutischen Bedeutung bewerten und in einen klinisch fassbaren Zusammenhang bringen.

4.4.1 Wissenschaftlicher Ausblick

Bei der Suche nach *modifizern* der Erkrankung bei heterozygoten Trägern von Alport-Varianten wurden bereits Polymorphismen von Nephritin und Podocin als mögliche Kandidaten identifiziert (Frese et al. 2019). Bei den Podocin-Polymorphismen konnte insbesondere die R229Q-Variante häufig bei heterozygoten Trägern einer Alport-Variante,

welche eine durch die *COL4*-Mutation alleine nicht erklärbar hohe Proteinurie aufwiesen, nachgewiesen werden (Tonna et al. 2008a; Voskarides et al. 2012; Frese et al. 2019). Da sich dadurch jedoch nur etwa 10 % dieser Fälle erklären ließen, ist das Vorliegen weiterer *modifier* wahrscheinlich (Voskarides et al. 2012). Da sich die alleinige heterozygote Trägerschaft einer R229Q-Variante kaum auf das Risiko zur Entwicklung von FSGS bei Erwachsenen auswirkt, während die R138Q-Variante darauf einen starken Effekt hat (McKenzie et al. 2007), war anzunehmen, dass die R138Q-Variante bei zusätzlichem heterozygotem Vorliegen einer *COL4*-Variante einen ebenso deutlichen oder sogar stärkeren *Modifier*-Effekt besitzt als die R229Q-Variante.

Die murine R140Q-Variante, welche äquivalent zu der humanen R138Q-Variante ist (Philippe et al. 2008), diente als Mittel, um diesen Zusammenhang bei *Col4a3^{+/-}*-Mäusen zu untersuchen. Durch die Durchführung einer Uninephrektomie sollte der Zustand nach Lebendnierenspende simuliert werden. In Familien von homo- oder hemizygot erkrankten Alport-Patienten, ist die Spendenbereitschaft der Angehörigen, die häufig heterozygote Anlageträger von Alport-Varianten sind, in der Regel hoch (Gross et al. 2009; Kelly et al. 2017). Da das Vorliegen einer zusätzlichen Podocin-R140Q-Variante, wie in den vorangegangenen Kapiteln bereits dargestellt ist, im Experiment nicht dazu führte, dass es innerhalb des kurzen Zeitraumes zwischen Nephrektomie und Präparation zu einer drastischen Verschlechterung der renalen Funktion und Struktur kam, während dennoch eine gewisse *Modifier*-Funktion der R140Q-Variante beobachtet werden konnte, bietet es sich an, weitere Experimente anzuschließen, um das Verständnis über die Bedeutung dieser Variante weiter zu vertiefen.

Mit Hilfe der bereits gewonnenen Erkenntnisse ist es möglich, den Aufbau zukünftiger Experimente weiter zu optimieren. So sind insbesondere zweierlei Anpassungen empfehlenswert. Zunächst sollte bedacht werden, dass sich die unter Umständen geringen Unterschiede durch das Hinzukommen der zusätzlichen Podocin-Variante statistisch deutlich besser nachweisen lassen, wenn größere Gruppen von Tieren untersucht werden. Empfehlenswert könnten Gruppenstärken von sechs bis acht Versuchstieren sein, da in diesem Experiment in aller Regel mit je drei bis vier Tieren pro Gruppe gearbeitet wurde und dabei die statistische Präzision noch nicht ausreichend war, um alle Ergebnisse optimal interpretieren zu können. Zweitens sollte es von Interesse sein, die Versuchstiere über einen längeren Zeitraum zu beobachten. Da *Col4a3^{+/-}*-Versuchstiere deutlich länger leben als 180 Tage (Beirowski et al. 2006), ist auch anzunehmen, dass doppelt heterozygote Tiere eine deutlich höhere Lebenserwartung haben als sechs Monate. Um die Hypothese zu beweisen, dass das schlechtere Therapieansprechen der doppelt heterozygoten Versuchstiere auf die ACEi-Therapie bezüglich der Reduktion der Fibrose eine schlechtere Langzeitprognose bedingt, sollten weitere Versuche durchgeführt werden. Bei diesen Versuchen könnte einerseits das Gesamtüberleben als möglicher Endpunkt betrachtet werden und andererseits ein späterer Präparationszeitpunkt, beispielsweise in einem Alter von 360 Tagen, als Möglichkeit bedacht werden. Dadurch wäre es möglich, eine bessere

Einschätzung der Langzeitprognose für Patienten nach Lebendnierenspende zu liefern, als es nur durch die bereits gewonnenen Erkenntnisse bereits möglich ist.

4.4.2 Klinischer Ausblick

Die in diesem Versuch gewonnenen Erkenntnisse sind auch von klinischer Bedeutung, wenngleich diese selbstverständlich dadurch limitiert ist, dass es sich um ein grundlagenwissenschaftliches Tierexperiment handelt, dessen Ergebnisse sich naturgemäß nicht direkt in den klinischen Alltag übersetzen lassen.

Insbesondere die Betrachtung der Reduktion der Proteinausscheidung im Urin sowie die Verbesserung der renalen Struktur durch die ACEi-Therapie sind von therapeutischer Bedeutung. Häufig wird empfohlen, dass Lebendnierenspende, die heterozygote Träger einer Alport-Variante sind, sofort nach der Operation mit einem ACEi zur Nephroprotektion behandelt werden sollen, da das Risiko für das Fortschreiten der Nierenerkrankung bei diesen Patienten erhöht ist (Gross et al. 2009; Savige et al. 2013). Auch ohne vorherige Nephrektomie wird die RAAS-Blockade, beispielsweise durch ACEi, bei heterozygot erkrankten, symptomatischen Alport-Patienten erfolgreich zur Verlangsamung des fortschreitenden Nierenversagens eingesetzt (Temme et al. 2012; Stock et al. 2017). Die Erkenntnisse dieses Experimentes unterstützen, insbesondere im Hinblick auf die Ergebnisse der Immunfluoreszenz, die Empfehlung einer postoperativen ACEi-Therapie zur Nephroprotektion nach Lebendnierenspende. Da Wildtyp-Versuchstiere ebenfalls stark von der Therapie profitieren konnten, sollte in Betracht gezogen werden, auch genetisch gesunden Nierenspendern eine nephroprotektive Medikation in Form eines ACEi anzubieten. Ebenfalls sollte heterozygoten Trägern einer Alport-Variante mit zusätzlicher Podocin-Variante ein ACEi nach etwaiger Lebendnierenspende angeboten werden. Obwohl die vergleichbaren Versuchstiere nierenstrukturell weniger stark profitieren konnten, war doch eine gewisse Reduktion der renalen Fibrosierung nachweisbar, welche auf lange Sicht einen prognostischen Vorteil bieten könnte, während ein Nachteil durch die ACEi-Therapie auch unter Hinzunahme klinischer Erkenntnisse unwahrscheinlich scheint. Die Erkenntnisse dieses Versuches legen dementsprechend nahe, dass jedem Lebendnierenspende unabhängig von seiner genetischen Voraussetzung eine nephroprotektive, medikamentöse Therapie nach der Spende angeboten werden sollte.

Eine weitere klinische Fragestellung, zu deren Beantwortung dieses Experiment einen Beitrag leisten möchte, ist, inwieweit möglichen Spendern, welche heterozygote Träger einer Alport-Variante und einer Podocin-Variante sind, eine Lebendnierenspende hinsichtlich ihres eigenen Risikos zur Entwicklung von fortschreitendem Nierenversagen empfohlen werden kann. Bekannt ist bereits, dass eine Lebendnierenspende eines heterozygoten Trägers einer Alport-Variante risikobehaftet ist (Beirowski et al. 2006; Gross et al. 2009; Savige et al. 2013). Dementsprechend ist es allgemein angezeigt, die Lebendnierenspende bei Angehörigen von Alport-Patienten kritisch abzuwägen. Da die Reduktion der renalen

Fibrosierung bei doppelt heterozygoten Versuchstieren durch die ACEi-Therapie im Vergleich zu den anderen Genotypen deutlich schwächer ausgeprägt war und die renale Fibrose als guter Prognoseparameter dienen kann (Gross et al. 2014), ist eine schlechtere Prognose auch bei Patienten mit einem vergleichbarem Genotyp denkbar. Eine generelle Empfehlung für oder wider die Durchführung einer Nierenspende bei solchen Patienten kann selbstverständlich nicht nur anhand der in diesem Experiment gewonnenen Erkenntnisse gemacht werden. Das bekannte Vorliegen einer zusätzlichen Podocin-R138Q-Variante ist für sich alleine wahrscheinlich kein Ausschlusskriterium, dennoch sollte es dazu einladen, die Chancen und Risiken einer Lebendnierenspende noch einmal sorgfältig abzuwägen.

5 Zusammenfassung

Das Alport-Syndrom ist eine hereditäre Nierenerkrankung, die zur Entwicklung von fortschreitendem Nierenversagen führt. Mutationen in den *COL4*-Genen liegen ihm zu Grunde. Homo- oder hemizygot erkrankte Patienten erkranken früher und schwerer als heterozygote Träger der zugrundeliegenden Varianten.

Bei Erreichen des terminalen Nierenversagens wird eine Nierenersatztherapie notwendig. Häufig kommt es dazu, dass sich heterozygote Angehörige von homozygot erkrankten Patienten zur Lebendspende bereiterklären. Da auch die heterozygoten Anlageträger ein Erkrankungsrisiko aufweisen, muss dieser risikobehaftete Eingriff sorgfältig abgewogen werden.

Die Prognose der heterozygoten Träger einer Alport-Variante lässt sich nicht sicher nur anhand der zugrundeliegenden Mutation vorhersagen. Es ist daher bedeutsam, sogenannte genetische *modifier* zu identifizieren. Dies sind genetische Varianten anderer glomerulärer Proteine, die das Fortschreiten der Erkrankung beeinflussen können. Eine bessere Kenntnis dieser *modifier* kann hilfreich bei der Entscheidung für oder wider die Durchführung einer Lebendnierenspende bei diesen Patienten sein.

Einer dieser *modifier* ist Podocin. Podocin ist als Protein der Schlitzmembran bedeutsam für die Aufrechterhaltung der Funktion des glomerulären Filters. Die Planung des Experimentes erfolgte unter der Annahme, dass das zusätzliche Vorliegen einer R138Q-Variante bei heterozygoten Trägern einer Alport-Variante die Prognose verschlechtern und eine Lebendnierenspende diesen Vorgang beschleunigen würde.

Durch die Erforschung der R138Q-Podocin-Variante soll die Bedeutung dieses möglichen *modifiers* ergründet werden. Ebenso soll die Auswirkung einer medikamentösen, nephroprotektiven Therapie nach einer Lebendnierenspende untersucht werden. Auf lange Sicht soll es so möglich sein, die Prognose der möglichen Spender besser einschätzen zu können.

Die Lebendnierenspende wurde im Tiermodell durch eine Uninephrektomie simuliert. Ein gut etabliertes Alport-Mausmodell diente als Grundlage. Versuchstiere wurden im Erwachsenenalter nephrektomiert und einen Monat später präpariert. Untersucht wurden die Proteinausscheidung im Urin, die Nierenstruktur sowie Serumharnstoff und Cholesterinspiegel. Dazu wurden Proteingelektrophorese, Immunfluoreszenzmikroskopie und Serumlaboruntersuchungen durchgeführt.

Nach der Nephrektomie zeigte sich der stärkste Anstieg der Proteinausscheidung im Urin bei Versuchstieren, die heterozygote Träger einer Alport-Variante und der Podocin-Variante waren. Dieser Anstieg war unter medikamentöser Therapie mit Ramipril schnell

rückläufig. Die Nierenstruktur verschlechterte sich nicht primär in Abhängigkeit vom Genotyp. Ebenso veränderten sich der Harnstoff- und Cholesterinwert nach der Operation nicht abhängig vom Genotyp. Allerdings wiesen die Tiere mit zusätzlicher Podocin-Variante ein auffällig schlechteres Therapieansprechen hinsichtlich struktureller Nierenschäden auf. Die Nierenstruktur konnte bei diesen Tieren nur geringfügig im Vergleich zu den anderen Versuchstieren verbessert werden.

Die heterozygote Trägerschaft beider Merkmale führte demnach nicht zu einer schnellen Abnahme der Nierenfunktion. Auch war die renale Struktur primär nicht stark eingeschränkt. Das schlechtere Therapieansprechen solcher Tiere ist dennoch ein prognostisch wichtiges Ergebnis. Die Verschlechterung der Nierenstruktur ist ein guter prognostischer Parameter. Ein schlechtes Ansprechen auf die Ramipril-Therapie bezüglich der Reduktion struktureller Nierenschäden bedeutet dementsprechend voraussichtlich eine schlechtere Langzeitprognose. Die Therapie führte allerdings bei allen Versuchstieren zu einer, wenngleich teilweise nur geringfügigen, Verbesserung der Nierenstruktur. Diesen Erkenntnissen folgend ist die nephroprotektive Therapie mit Ramipril unabhängig von der genetischen Vorbelastung nach jeder Lebendnierenspende grundsätzlich empfehlenswert.

Die Auswirkungen der zusätzlichen heterozygoten Trägerschaft einer R138Q-Podocin-Variante bei heterozygoten Trägern einer Alport-Variante waren in diesem Experiment insgesamt geringer als zuvor angenommen. Dennoch scheint die R138Q-Variante als *modifier* zu agieren. Die mit dem Vorliegen dieser Variante einhergehende Verschlechterung des Therapieansprechens sollte einerseits weiter untersucht und andererseits bei der Prognosestellung betroffener Patienten berücksichtigt werden. Die Ergebnisse dieses Versuches sollten dazu einladen, die Bedeutung dieser Variante weiter zu untersuchen und die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen zu überprüfen. Auch die Suche nach bisher unbekanntem *modifiern* stellt eine Aufgabe für nachfolgende Arbeiten dar.

Die durch dieses Experiment gewonnenen Erkenntnisse sollen einen Beitrag zur Verbesserung der Prognoseeinschätzung von möglichen Lebendnierenspendern in Alport-Familien leisten. Zukünftige Versuche werden es ermöglichen, die prognostische Präzision und die Therapieempfehlungen im Sinne des Patientenwohls noch weiter zu verbessern.

6 Literaturverzeichnis

- Abrahamson DR, Hudson BG, Stroganova L, Borza DB, St. John PL (2009): Cellular origins of type IV collagen networks in developing glomeruli. *J Am Soc Nephrol* 20, 1471–1479
- Alport AC (1927): Hereditary familial congenital haemorrhagic nephritis. *Br Med J* 1, 504–506
- Beirowski B, Weber M, Gross O (2006): Chronic renal failure and shortened lifespan in COL4A3^{+/-} Mice: an animal model for thin basement membrane nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 17, 1986–1994
- Boute N, Gribouval O, Roselli S, Benessy F, Lee H, Fuchshuber A, Dahan K, Gubler MC, Niaudet P, Antignac C (2000): NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet* 24, 349–354
- Bravo P, Felgueiras J, Santos C, Oliveira C, Ponce P (2008): Angiotensin-converting enzyme inhibitors after renal transplantation. *Transplant Proc* 40, 740–742
- Cosgrove D, Meehan DT, Grunkemeyer JA, Kornak JM, Sayers R, Hunter WJ, Samuelson GC (1996): Collagen COL4A3 knockout: a mouse model for autosomal Alport syndrome. *Genes Dev* 10, 2981–2992
- Cosgrove D, Rodgers K, Meehan D, Miller C, Bovard K, Gilroy A, Gardner H, Kotelianski V, Gotwals P, Amatucci A et al. (2000): Integrin $\alpha 1\beta 1$ and transforming growth factor- $\beta 1$ play distinct roles in Alport glomerular pathogenesis and serve as dual targets for metabolic therapy. *Am J Pathol* 157, 1649–1659
- Deltas C, Pierides A, Voskarides K (2013): Molecular genetics of familial hematuric diseases. *Nephrol Dial Transplant* 28, 2946–2960
- Dische FE, Anderson VE, Keane SJ, Taube D, Bewick M, Parsons V (1990): Incidence of thin membrane nephropathy: morphometric investigation of a population sample. *J Clin Pathol* 43, 457–460
- Eddy AA (1996): Molecular insights into renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 7, 2495–2508
- Frese J, Kettwig M, Zappel H, Hofer J, Gröne HJ, Nagel M, Sunder-Plassmann G, Kain R, Neuweiler J, Gross O (2019): Kidney injury by variants in the COL4A5 gene aggravated by polymorphisms in slit diaphragm genes causes focal segmental glomerulosclerosis. *Int J Mol Sci* 20, 519
- Funk SD, Bayer RH, Malone AF, McKee KK, Yurchenco PD, Miner JH (2018): Pathogenicity of a human laminin $\beta 2$ mutation revealed in models of Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol* 29, 949–960
- Gross O, Weber M (2005): Von der Molekulargenetik des Alport-Syndroms zu Prinzipien der Organprotektion bei chronischen Nierenerkrankungen. *Med Klin* 100, 826–831
- Gross O, Netzer KO, Lambrecht R, Seibold S, Weber M (2002): Meta-analysis of genotype-phenotype correlation in X-linked Alport syndrome: impact on clinical counselling. *Nephrol Dial Transplant* 17, 1218–1227

- Gross O, Beirowski B, Koepke ML, Kuck J, Reiner M, Addicks K, Smyth N, Schulze-Lohoff E, Weber M (2003): Preemptive ramipril therapy delays renal failure and reduces renal fibrosis in COL4A3-knockout mice with Alport syndrome. *Kidney Int* 63, 438–446
- Gross O, Weber M, Fries JWU, Müller GA (2009): Living donor kidney transplantation from relatives with mild urinary abnormalities in Alport syndrome: long-term risk, benefit and outcome. *Nephrol Dial Transplant* 24, 1626–1630
- Gross O, Friede T, Hilgers R, Görlitz A, Gavénis K, Ahmed R, Dürr U (2012): Safety and efficacy of the ACE-inhibitor ramipril in Alport syndrome: the double-blind, randomized, placebo-controlled, multicenter phase III EARLY PRO-TECT Alport trial in pediatric patients. *ISRN Pediatr* 2012, 436046
- Gross O, Perin L, Deltas C (2014): Alport syndrome from bench to bedside: the potential of current treatment beyond RAAS blockade and the horizon of future therapies. *Nephrol Dial Transplant* 29, iv124–iv130
- Hayslett JP (1979): Functional adaptation to reduction in renal mass. *Physiol Rev* 59, 137–164
- Hostikka SL, Eddy RL, Byers MG, Höyhtyä M, Showas TB, Tryggvason K (1990): Identification of a distinct type IV collagen α chain with restricted kidney distribution and assignment of its gene to the locus of X chromosome-linked Alport syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 1606–1610
- Hudson BG, Reeders ST, Tryggvason K (1993): Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases: molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis. *J Biol Chem* 268, 26033–26036
- Jais JP, Knebelmann B, Giatras I, de Marchi M, Rizzoni G, Renieri A, Weber M, Gross O, Netzer KO, Flinter F et al. (2003): X-linked Alport syndrome: natural history and genotype-phenotype correlations in girls and women belonging to 195 families: a “european community Alport syndrome concerted action” Study. *J Am Soc Nephrol* 14, 2603–2610
- 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, 2470–2478
- Kamagata Y, Mattei MG, Ninomiya Y (1992): Isolation and sequencing of cDNAs and genomic DNAs encoding the $\alpha 4$ chain of basement membrane collagen type IV and assignment of the gene to the distal long arm of human chromosome 2. *J Biol Chem* 267, 23753–23758
- Kashtan CE, Ding J, Gregory M, Gross O, Heidet L, Knebelmann B, Rheault M, Licht C (2013): Clinical practice recommendations for the treatment of Alport syndrome: a statement of the Alport syndrome research collaborative. *Pediatr Nephrol* 28, 5–11
- Kashtan CE, Ding J, Garosi G, Heidet L, Massella L, Nakanishi K, Nozu K, Renieri A, Rheault M, Wang F et al. (2018): Alport syndrome: a unified classification of genetic disorders of collagen IV $\alpha 345$: a position paper of the Alport syndrome classification working group. *Kidney Int* 23, 1045–1051
- Keidar S, Attias J, Coleman R, Wirth K, Schölkens B, Hayek T (2000): Attenuation of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by ramipril is dissociated from its antihypertensive effect and from potentiation of bradykinin: *J Cardiovasc Pharmacol* 35, 64–72

- Kelly YP, Patil A, Wallis L, Murray S, Kant S, Kabbalo MA, Casserly L, Doyle B, Dorman A, O'Kelly P et al. (2017): Outcomes of kidney transplantation in Alport syndrome compared with other forms of renal disease. *Ren Fail* 39, 290–293
- Kruegel J, Miosge N (2010): Basement membrane components are key players in specialized extracellular matrices. *Cell Mol Life Sci* 67, 2879–2895
- Lenihan CR, Busque S, Derby G, Blouch K, Myers BD, Tan JC (2015): Longitudinal study of living kidney donor glomerular dynamics after nephrectomy. *J Clin Invest* 125, 1311–1318
- Liapis H, Gaut JP, Klein C, Bagnasco S, Kraus E, Farris AB, Honsova E, Perkowska-Ptasinska A, David D, Goldberg J et al. (2017): Banff histopathological consensus criteria for preimplantation kidney biopsies. *Am J Transplant* 17, 140–150
- Loboda A, Sobczak M, Jozkowicz A, Dulak J (2016): TGF- β 1/Smads and miR-21 in renal fibrosis and inflammation. *Mediators Inflamm* 2016, 8319283
- Lu L, Sun X, Yin Y, Huang Y, Wang M, Wan H, Wei LB, Xiao W (2015): The amino acid mutations of the podocin in proteinuria: a meta-analysis. *Ren Fail* 37, 1329–1337
- Machuca E, Hummel A, Nevo F, Dantal J, Martinez F, Al-Sabban E, Baudouin V, Abel L, Grünfeld JP, Antignac C (2009): Clinical and epidemiological assessment of steroid-resistant nephrotic syndrome associated with the NPHS2 R229Q variant. *Kidney Int* 75, 727–735
- McKenzie LM, Hendrickson SL, Briggs WA, Dart RA, Korbet SM, Mokrzycki MH, Kimmel PL, Ahuja TS, Berns JS, Simon EE et al. (2007): NPHS2 variation in sporadic focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 18, 2987–2995
- Meehan DT, Delimont D, Cheung L, Zallocchi M, Sansom SC, Holzclaw JD, Rao V, Cosgrove D (2009): Biomechanical strain causes maladaptive gene regulation, contributing to Alport glomerular disease. *Kidney Int* 76, 968–976
- Mezzano SA, Ruiz-Ortega M, Egido J (2001): Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension* 38, 635–638
- Miner JH (1999): Renal basement membrane components. *Kidney Int* 56, 2016–2024
- Miner JH (2011): Organogenesis of the kidney glomerulus: focus on the glomerular basement membrane. *Organogenesis* 7, 75–82
- Miner JH, Sanes JR (1996): Molecular and functional defects in kidneys of mice lacking collagen α 3(IV): implications for Alport syndrome. *J Cell Biol* 135, 1403–1413
- Mulukala SKN, Nishad R, Kolligundla LP, Saleem MA, Prabhu NP, Pasupulati AK (2016): In silico structural characterization of podocin and assessment of nephrotic syndrome-associated podocin mutants. *IUBMB Life* 68, 578–588
- Naqvi SAJ, Ahsan S, Fawwad A, Basit A, Shera AS (2016): Effect of angiotensin converting enzyme inhibitor on glomerular hyperfiltration in patients with type 1 diabetes. *Pak J Med Sci* 32, 559–564
- Ning L, Kurihara H, de Vega S, Ichikawa-Tomikawa N, Xu Z, Nonaka R, Kazuno S, Yamada Y, Miner JH, Arikawa-Hirasawa E (2014): Laminin α 1 regulates age-related mesangial cell proliferation and mesangial matrix accumulation through the TGF- β pathway. *Am J Pathol* 184, 1683–1694

- Nishida Y, Takahashi Y, Tezuka K, Takeuchi S, Nakayama T, Asai S (2017): A comparative effectiveness study of renal parameters between imidapril and amlodipine in patients with hypertension: a retrospective cohort study. *Cardiol Ther* 6, 69–80
- Ojeda ML, Delgado-Villa MJ, Llopis R, Murillo ML, Carreras O (2008): Pharmacology and cell metabolism: lipid metabolism in ethanol-treated rat pups and adults: effects of folic acid. *Alcohol Alcohol* 43, 544–550
- Philippe A, Weber S, Esquivel EL, Houbron C, Hamard G, Ratelade J, Kriz W, Schaefer F, Gubler MC, Antignac C (2008): A missense mutation in podocin leads to early and severe renal disease in mice. *Kidney Int* 73, 1038–1047
- Roselli S, Heidet L, Sich M, Henger A, Kretzler M, Gubler MC, Antignac C (2004a): Early glomerular filtration defect and severe renal disease in podocin-deficient mice. *Mol Cell Biol* 24, 550–560
- Roselli S, Moutkine I, Gribouval O, Benmerah A, Antignac C (2004b): Plasma membrane targeting of podocin through the classical exocytic pathway: effect of NPHS2 mutations. *Traffic* 5, 37–44
- Roufosse C, Simmonds N, Clahsen-van Groningen M, Haas M, Henriksen KJ, Horsfield C, Loupy A, Mengel M, Perkowska-Ptasińska A, Rabant M et al. (2018): A 2018 reference guide to the Banff classification of renal allograft pathology. *Transplantation* 102, 1795–1814
- Santema BT, Ouwerkerk W, Tromp J, Sama IE, Ravera A, Regitz-Zagrosek V, Hillege H, Samani NJ, Zannad F, Dickstein K et al. (2019): Identifying optimal doses of heart failure medications in men compared with women: a prospective, observational, cohort study. *Lancet* 394, 1254–1263
- Savige J, Rana K, Tonna S, Buzzza M, Dagher H, Wang YY (2003): Thin basement membrane nephropathy. *Kidney Int* 64, 1169–1178
- Savige J, Gregory M, Gross O, Kashtan C, Ding J, Flinter F (2013): Expert guidelines for the management of Alport syndrome and thin basement membrane nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 24, 364–375
- Schwarz K, Simons M, Reiser J, Saleem MA, Faul C, Kriz W, Shaw AS, Holzman LB, Mundel P (2001): Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J Clin Invest* 108, 1621–1629
- Stock J, Kuenanz J, Glonke N, Sonntag J, Frese J, Tönshoff B, Höcker B, Hoppe B, Feldkötter M, Pape L et al. (2017): Prospective study on the potential of RAAS blockade to halt renal disease in Alport syndrome patients with heterozygous mutations. *Pediatr Nephrol* 32, 131–137
- Suh JH, Miner JH (2013): The glomerular basement membrane as a barrier to albumin. *Nat Rev Nephrol* 9, 470–477
- Tabatabaeifar M, Wlodkowski T, Simic I, Denc H, Mollet G, Weber S, Moyers JJ, Brühl B, Randles MJ, Lennon R et al. (2017): An inducible mouse model of podocin-mutation-related nephrotic syndrome. *PLoS One* 12, e0186574
- Temme J, Peters F, Lange K, Pirson Y, Heidet L, Torra R, Grunfeld JP, Weber M, Licht C, Müller GA et al. (2012): Incidence of renal failure and nephroprotection by RAAS inhibition in heterozygous carriers of X-chromosomal and autosomal recessive Alport mutations. *Kidney Int* 81, 779–783

- Tonna S, Needham A, Polu K, Uscinski A, Appel GB, Falk RJ, Katz A, Al-Waheeb S, Kaplan BS, Jerums G et al. (2008a): NPHS2 variation in focal and segmental glomerulosclerosis. *BMC Nephrol* 9, 13
- Tonna S, Wang YY, Wilson D, Rigby L, Tabone T, Cotton R, Savige J (2008b): The R229Q mutation in NPHS2 may predispose to proteinuria in thin-basement-membrane nephropathy. *Pediatr Nephrol* 23, 2201–2207
- Tryggvason K, Wartiovaara J (2005): How does the kidney filter plasma? *Physiology* 20, 96–101
- Voskarides K, Damianou L, Neocleous V, Zouvani I, Christodoulidou S, Hadjiconstantinou V, Ioannou K, Athanasiou Y, Patsias C, Alexopoulos E et al. (2007): COL4A3/COL4A4 mutations producing focal segmental glomerulosclerosis and renal failure in thin basement membrane nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 18, 3004–3016
- Voskarides K, Arsali M, Athanasiou Y, Elia A, Pierides A, Deltas C (2012): Evidence that NPHS2-R229Q predisposes to proteinuria and renal failure in familial hematuria. *Pediatr Nephrol* 27, 675–679
- Wang SN, Lapage J, Hirschberg R (2000): Role of glomerular ultrafiltration of growth factors in progressive interstitial fibrosis in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 57, 1002–1014
- Wang Z, Yao T, Song Z (2010): Chronic alcohol consumption disrupted cholesterol homeostasis in rats: down-regulation of low-density lipoprotein receptor and enhancement of cholesterol biosynthesis pathway in the liver. *Alcohol Clin Exp Res* 34, 471–478
- Weber S, Gribouval O, Esquivel EL, Morinière V, Tête MJ, Legendre C, Niaudet P, Antignac C (2004): NPHS2 mutation analysis shows genetic heterogeneity of steroid-resistant nephrotic syndrome and low post-transplant recurrence. *Kidney Int* 66, 571–579
- Yamamura T, Nozu K, Fu XJ, Nozu Y, Ye MJ, Shono A, Yamanouchi S, Minamikawa S, Morisada N, Nakanishi K et al. (2017): Natural history and genotype–phenotype correlation in female X-linked Alport syndrome. *Kidney Int Rep* 2, 850–855

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei allen, die mir die Erstellung dieser Dissertation ermöglicht haben.

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. O. Gross, bedanken, der es mir ermöglichte, an diesem Experiment teilzunehmen, und mir regelmäßig mit Ratschlägen und konstruktiver Kritik zur Seite stand.

Prof. Dr. med. G. A. Müller und Prof. Dr. med. M. Zeisberg danke ich für die Möglichkeit, in der von ihnen geleiteten Abteilung an diesem Versuch teilnehmen zu können.

Großer Dank gilt insbesondere Dipl.-Biol. D. Rubel. Ich bin sehr dankbar für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Experimente. Auch für die Durchführung der Nephrektomien an den Versuchstieren bin ich zu Dank verpflichtet.

Auch Dr. med. A.-K. Schäfer und J. Böckhaus aus der Klinik für Nephrologie und Rheumatologie der Universitätsmedizin Göttingen, die neben Prof. Dr. med. O. Gross an der systematischen Bewertung der Aufnahmen der Immunfluoreszenzmikroskopie beteiligt waren, gilt mein Dank.

Dank gilt auch meinen Mitdoktoranden, mit denen ich in freundschaftlicher Atmosphäre zusammenarbeiten konnte. Die Zusammenarbeit war für mich eine große Bereicherung.