

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

**Einfluss einer fettreichen Ernährung auf
eine funktionelle Einzelniere mit den
Risiko-Genvarianten *COL4A3*^{+/-} und
NPHS2^{+/*R140Q*} im Mausmodell**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Karoline Breier (geb. Czeranski)

aus

Schwelm

Göttingen 2021

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

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

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. med. J. Wiltig

Prüfungskommission

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

Ko-Referent/in:

Drittreferent/in:

Datum der mündlichen Prüfung:

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel " Einfluss einer fettreichen Ernährung auf eine funktionelle Einzelniere mit den Risiko-Genvarianten *COL4A3*^{+/-} und *NPHS2*^{+/*R140Q*} 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	III
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	7
1.1 Die Niere	7
1.1.1 Der Glomerulus – Die Filtrationseinheit der Niere.....	8
1.1.2 Der glomeruläre Filter	8
1.1.3 Die renale Autoregulation.....	10
1.2 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	10
1.3 Das Alport-Syndrom	11
1.3.1 Phänotyp des Alport-Syndroms.....	11
1.3.2 Histologie des Alport-Syndroms.....	13
1.3.3 Pathogenese des Alport-Syndroms.....	14
1.3.4 Bisherige Therapieempfehlung.....	15
1.4 Nierentransplantation	16
1.5 Übergewicht und Nierenfunktion.....	18
1.6 Zielsetzung	21
2 Material und Methoden	23
2.1 Versuchsaufbau - Übersicht.....	23
2.2 Mausmodell	24
2.2.1 Uninephrektomie-Operation	25
2.2.2 Analgesie-Schema.....	26
2.2.3 Ernährung.....	26
2.3 Genotypisierung	27
2.3.1 PCR.....	27
2.3.2 Agarose-Gelelektrophorese	29
2.4 Semiquantitative Bestimmung der Proteinurie	29
2.4.1 Gewinnung des Mauseurins.....	29
2.4.2 Chloroform-Methanol-Fällung.....	30
2.4.3 SDS-Page-Gelelektrophorese	31
2.5 Cholesterin- und Harnstoffbestimmung i. S.	32
2.6 Oil-Red-O-Leberfärbung	33
2.6.1 Materialentnahme und Einbettung.....	33
2.6.2 Anfertigen von Kryo-Schnitten	34
2.6.3 Oil-Red-O-Färbung	34
2.6.4 Auswertung	35
2.7 Immunhistochemie	37
2.7.1 Entnahme und Einbettung der Niere(n)	37

2.7.2	Anfertigen von Paraffin-Schnitten.....	37
2.7.3	Fibronektin-Färbung.....	38
2.7.4	Laminin-Färbung.....	39
2.7.5	Scoring-System.....	39
2.8	Statistische Auswertung.....	42
2.9	Materialien	43
2.9.1	Universal-Materialien	43
2.9.2	Uninephrektomie-Operation.....	46
2.9.3	Analgesie.....	47
2.9.4	Ernährung.....	47
2.9.5	Genotypisierung	48
2.9.6	Semiquantitative Bestimmung der Proteinurie	49
2.9.7	Bestimmung von Cholesterin und Harnstoff i.S.....	49
2.9.8	Oil Red O-Leberfärbung.....	50
2.9.9	Immunhistochemie	51
3	Ergebnisse	52
3.1	Metabolische Veränderungen.....	52
3.1.1	Gewicht.....	52
3.1.2	Cholesterin im Serum	54
3.1.3	Fettleber-Scoring.....	55
3.2	Auswirkungen auf die Nierenfunktion.....	58
3.2.1	Proteinurie	58
3.2.2	Harnstoff im Serum	63
3.2.3	Histologische Veränderungen	64
3.3	Zusammenfassung der Ergebnisse	75
4	Diskussion	77
4.1	Metabolische Veränderungen.....	77
4.1.1	Gewicht.....	77
4.1.2	Cholesterin-Konzentration i.S.....	79
4.1.3	Grad der Leberverfettung	80
4.2	Auswirkungen auf die Nierenfunktion.....	81
4.2.1	Proteinurie	81
4.2.2	Harnstoff-Konzentration i. S.	84
4.2.3	Fibronektin Score.....	85
4.2.4	Laminin-Score.....	90
5	Zusammenfassung.....	92
6	Literaturverzeichnis	94

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematischer Aufbau des glomerulären Filters – Übersicht.....	9
Abbildung 2 Versuchsaufbau - Übersicht.....	24
Abbildung 3 Beispiel für die Auswertung eines Gels mit ImageJ.....	32
Abbildung 4 Beispiel eines Leberschnitts in Oil-Red-O-Färbung.....	35
Abbildung 5 Beispiel für die Auswertung mit ImageJ.....	36
Abbildung 6 Durchschnittliches Gewicht im postoperativen Verlauf.....	53
Abbildung 7 Prozentuale Gewichtsänderung im postoperativen Verlauf.....	53
Abbildung 8 Cholesterin-Konzentration i.S. Übersicht.....	54
Abbildung 9 Übersicht von oil-red-o-gefärbten Leberschnitte von Wildtyp-Mäusen.....	56
Abbildung 10 Typisches Bild einer NAFLD in HE-Färbung.....	57
Abbildung 11 Geschlechtervergleich der Gesamtproteinurie um den 120. Lebenstag.....	59
Abbildung 12 Beispiel eines Protein-Gels, Geschlechtervergleich.....	59
Abbildung 13 Detaillierte Darstellung der Gesamtproteinurie um den 120. Lebenstag.....	60
Abbildung 14 Genotypvergleich der relativen Gesamtproteinurie.....	61
Abbildung 15 Vergleich der Gesamtproteinurie der SHAM- und NEPH-Gruppe.....	62
Abbildung 16 Vergleich der Gesamtproteinurie der NEPH- und Fett-Gruppe.....	63
Abbildung 17 Harnstoff-Konzentration i.S. Übersicht.....	64
Abbildung 18 Fibronektin-Score Übersicht.....	66
Abbildung 19 Beispielbilder der Fibronektin-Färbung a-p.....	69
Abbildung 20 Laminin-Score Übersicht.....	71
Abbildung 21 Beispielbilder der Laminin-Färbung a-p.....	74
Abbildung 22 Wirkung des Fettgewebes auf die Niere - Übersicht.....	89

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Nährwerte von Haltungs- und Nacktmausfutter.....	27
Tabelle 2 Gradeinteilung der Steatosis hepatis.....	37
Tabelle 3 Fibronektin-Score mit Beispielbildern.....	40
Tabelle 4 Laminin-Score mit Beispielbildern.....	41
Tabelle 5 Geräte.....	43
Tabelle 6 Programme.....	44
Tabelle 7 Universal-Chemikalien.....	45
Tabelle 8 Weitere Universal-Materialien.....	46
Tabelle 9 Material Uninephrektomie-Operation.....	46
Tabelle 10 Material Analgesie.....	47
Tabelle 11 Material Ernährung.....	47
Tabelle 12 Material PCR.....	48
Tabelle 13 Material Gelelektrophorese.....	48
Tabelle 14 Material Chloroform-Methanol-Fällung.....	49
Tabelle 15 Material SDS-Page-Gelelektrophorese.....	49
Tabelle 16 Material Bestimmung von Cholesterin und Harnstoff i.S.....	49

Tabelle 17 Material Oil Red O-Leberfärbung	50
Tabelle 18 Material Fibronectin-Färbung	51
Tabelle 19 Material Laminin-Färbung	51
Tabelle 20 Wertetabelle des Fibronectin-Scores, NEPH/Fett-Vergleich	67
Tabelle 21 Wertetabelle des Fibronectin-Scores, Genotyp-Vergleich in der Fett-Gruppe	67
Tabelle 22 Wertetabelle des Laminin-Scores, NEPH/Fett-Vergleich	72
Tabelle 23 Wertetabelle des Laminin-Scores, Genotyp-Vergleich in der NEPH-Gruppe	72

Abkürzungsverzeichnis

ACE	<i>Angiotensin-Converting-Enzym</i>
ACEi	<i>Angiotensin-Converting-Enzym-Inhibitoren</i>
ADH	Antidiuretisches Hormon
ANGII	Angiotensin II
ATP	Adenosin-Triphosphat
BMI	Körpermasse-Index (<i>Body-Mass-Index</i>)
BSA	Bovines Serumalbumin
COX-2	Cyclooxygenase-2
CRP	C-reaktives Protein
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DDR1	Discoidin Domain-Rezeptor 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERA-EDTA	European Renal Association - European Dialysis and Transplant Association
ESRD	Terminale Niereninsuffizienz (<i>End stage renal disease</i>)
EZM	Extrazelluläre Matrix
FSGS	Fokal-segmentale Glomerulosklerose
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HE	Hämatoxylin-Eosin
i. S.	Im Serum
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
NAFLD	Nicht-alkoholische Fettleber Erkrankung (<i>Non-alcoholic fatty liver disease</i>)
OP	Operation
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (<i>Phosphate-buffered saline</i>)
PFA	Paraformaldehyd

PGE2	Prostaglandin E2
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (<i>Polymerase chain reaction</i>)
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic acid</i>)
s. c.	Subkutan
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (<i>Tris buffered saline</i>)
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Die Niere

Die Nieren sind retroperitoneal gelegene, paarig angelegte Organe. Sie liegen dem *Musculus iliopsoas* und der hinteren Rumpfwandmuskulatur auf und sind von einer schützenden Kapsel aus Fett und Bindegewebe umgeben. Ihre Form ist oval und leicht gebogen.

Makroskopisch gliedern sich die Nieren in eine Rinde und Mark. Von der Nierenrinde ausgehend reichen Nierenpapillen bis ins Mark Richtung Nierenbecken. Von diesem geht der Ureter ab. Neben dem Ureter wird der Nierenhilus durch die *Arteria* und *Vena renalis* gebildet.

Mikroskopisch befinden sich in der Rinde vor allem Glomeruli und Abschnitte des proximalen und distalen Tubulus-Systems. Glomeruli sind Gefäßknäule mit einer semi-permeablen Wand. Hier befindet sich die Blut-Harn-Schranke. Jeder Glomerulus wird von einer Bowman-Kapsel umgeben. Sie bildet einen bindegewebigen Trichter um den Glomerulus. Das sich anschließende Tubulus-System durchzieht Rinde und Mark der Niere. Die Tubuli münden in den Sammelrohren und diese wiederum in den Nierenpapillen. Hier tritt der konzentrierte Urin aus dem Nierenparenchym in das Nierenbecken über und wird über den Ureter weiter in die Blase geleitet.

Durch beide Nieren fließen ca. 20 % des gesamten Herzzeitvolumens. Durch diesen hohen Anteil ist es möglich, dass das gesamte Blutvolumen ausreichend filtriert und von harnpflichtigen Substanzen befreit wird. Als Produkt dieses Prozesses entsteht der Primärharn, der durch ein spezielles Gegenstrom-Prinzip und Wechsel zwischen wasserdichten und -durchlässigen Abschnitten des Tubulus-Systems konzentriert wird. So werden von ca. 180 Liter Primärharn pro Tag ca. 1,5 Liter ausgeschieden (Tryggvason und Wartiovaara 2005). Zum weiteren Aufgabenfeld der Nieren gehört die Regulation des Säuren-Basenhaushalts, die Regulation des Blutdrucks, die Stimulation der Blutbildung und zum Teil die Vitamin-D-Synthese.

1.1.1 Der Glomerulus – Die Filtrationseinheit der Niere

Der Glomerulus ist ein Gefäßkonvolut, das durch ein zuführendes *Vas afferens* gespeist wird. Das *Vas afferens* geht letztendlich über viele Verzweigungen aus der *Arteria renalis* hervor. Das gefilterte Blut fließt über das *Vas efferens* ab. Beide Gefäße sind Arteriolen und besitzen eine ausgeprägte Wandmuskulatur. So wird durch Regulation der Wandspannung der Blutfluss und damit auch die Menge an filtriertem Primärharn reguliert.

Der Glomerulus wird von der Bowman-Kapsel umgeben. Das parietale Blatt der Kapsel umgibt das Gefäßkonvolut und geht fließend in den proximalen Tubulus über. Das viszerale Blatt wird durch spezialisierte Epithelzellen, den Podozyten, gebildet. Zwischen dem viszeralen und dem parietalen Blatt bildet sich ein Raum, in den zunächst der Primärharn abgegeben wird und anschließend über den proximalen Tubulus weitergeleitet wird (Pollak et al. 2014).

Der Glomerulus und die Bowman-Kapsel bilden zusammen das Nierenkörperchen. Nierenkörperchen und Tubulus-System bilden wiederum das Nephron. Das Nephron ist die kleinste Filtrationseinheit der Niere.

1.1.2 Der glomeruläre Filter

Der Filterapparat der Niere kann grob in drei Teile unterteilt werden. Auf der Blutseite befindet sich ein gefenstertes Endothel. Dieses besitzt Poren, was essentiell für die selektive Durchlässigkeit des Filters ist.

An das Endothel grenzt die glomeruläre Basalmembran (GBM). Hauptbestandteile der Basalmembran sind u. a. Kollagen IV, Laminin und negativ geladene Glykosaminoglykane. Kollagen IV bildet ein Netzwerk. Daran können andere Komponenten der extrazellulären Matrix, wie zum Beispiel Laminin, binden und somit das Zytoskelett der Zellen mit der extrazellulären Matrix verbinden. Durch die negative Ladung entsteht eine Anionenbarriere.

Auf der Harnseite liegt die Schlitzmembran. Sie wird durch Podozyten-Fortsätze gebildet, die ineinander greifen. So entstehen ca. 4 mal 14 nm große Schlitze, die namensgebend für diese Schicht waren. Die Schlitzmembran ist ein essentieller Bestandteil des glomerulären Filters (Abrahamson 1987).

Ist einer der drei Komponenten gestört, resultiert dies in einer gestörten Blut-Harn-Schranke. Es kann zu einer vermehrten Ausscheidung von Proteinen (Proteinurie) und/ oder Erythrozyten (Hämaturie) über den Urin kommen (Yuste et al. 2015).

Der Aufbau des glomerulären Filters ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

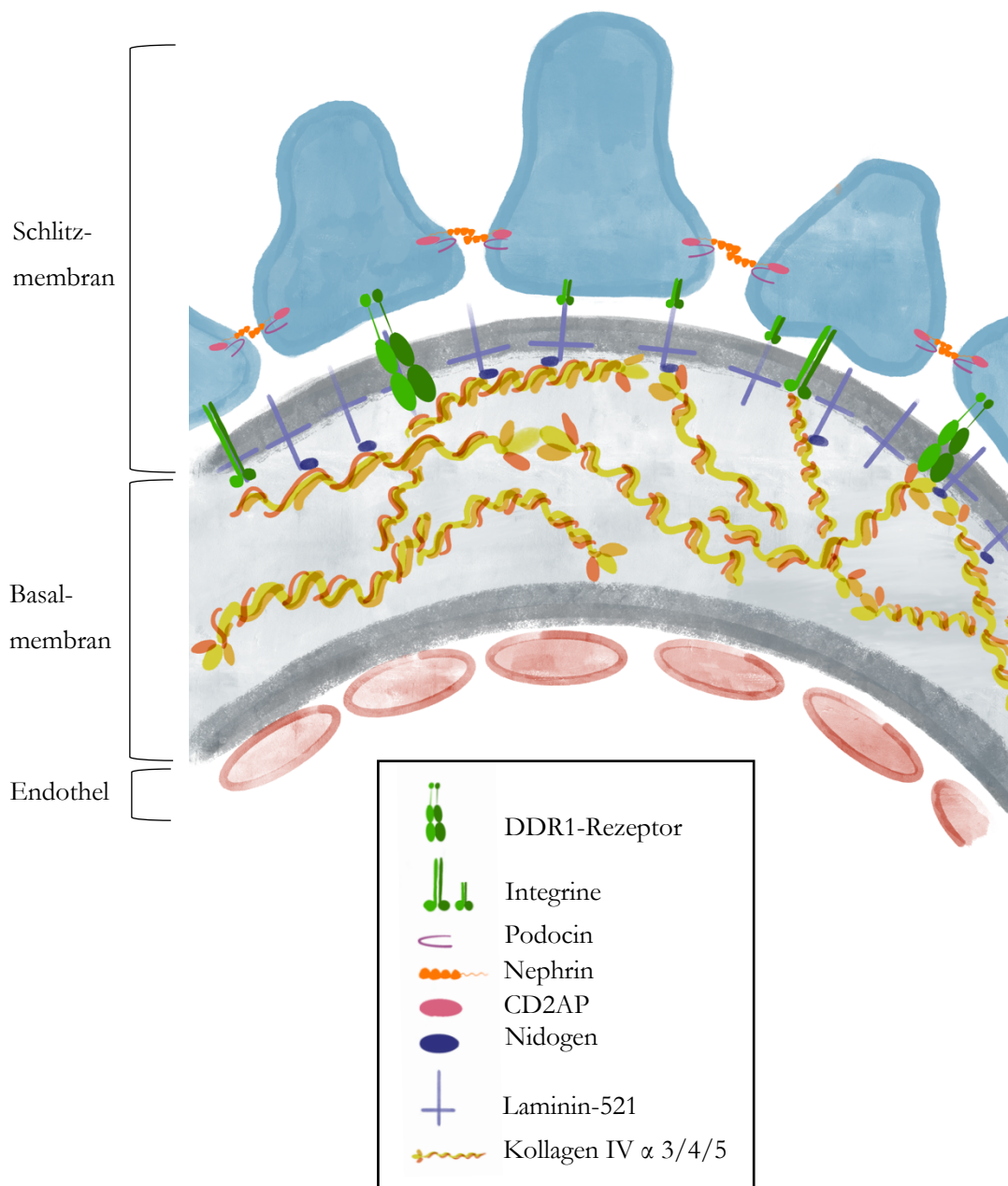


Abbildung 1 **Schematischer Aufbau des glomerulären Filters – Übersicht**

Der glomeruläre Filter gliedert sich in drei Abschnitte: die Schlitzmembran, die Basalmembran und das Endothel. Die Schlitzmembran wird durch die Fortsätze der Podozyten gebildet. Diese greifen interdigitierend ineinander, sodass sich zwischen den Fortsätzen Schlitz bilden. Über Komplexe aus Transmembranproteinen, wie zum Beispiel Podocin und Nephrin, können die Podozyten miteinander kommunizieren und ihre Struktur aufrecht erhalten. Die glomeruläre Basalmembran besteht u. a. aus Kollagen IV α 3/4/5 und Laminin. Die Podozyten stehen über Integrine und DDR1-Rezeptoren mit Komponenten der Basalmembran in Kontakt. Über diese Rezeptoren sind Podozyten höchst wahrscheinlich in der Lage, Veränderungen in der GBM wahrzunehmen und darauf zu reagieren. Das Netzwerk aus Kollagen IV α 3/4/5 trägt maßgeblich zur Stabilität der GBM bei. Als dritte Komponente der glomerulären Filters schließt sich das fenestrierte Endothel an. Durch spezielle Poren ist es möglich, selektiv das Plasmavolumen zu filtrieren.

1.1.3 Die renale Autoregulation

Für den Flüssigkeitshaushalt des Körpers ist es essenziell auch bei unterschiedlichen systemischen Blutdruckverhältnissen, eine konstante glomeruläre Filtrationsrate (GFR) aufrechtzuerhalten. Die GFR wird vor allem durch den renalen Plasmafluss und dem glomerulären Druck reguliert (Brenner et al. 1976). Zwischen einem systemischen mittleren Blutdruck von ca. 70 und 130 mmHg bleibt die Durchblutung in den Nieren relativ konstant. Grund hierfür ist die renale Autoregulation.

Die zugrunde liegenden Mechanismen dieser Autoregulation sind zum einen eine myogene Reaktion der Arteriolen auf sich ändernde systemische Blutdruckverhältnisse. Kommt es zum Beispiel zu einem Blutdruckanstieg, wird die erhöhte Wandspannung durch Mechanorezeptoren in den Arteriolenwänden registriert. Als Reaktion verengt sich die zuführende Arteriole automatisch. So sind der Glomerulus und die efferente Arteriole erst gar nicht von der Blutdruckerhöhung betroffen (Carlstrom et al. 2015; Forster und Maes 1947). Zum anderen findet eine langsamere Autoregulation über den juxtaglomerulären Apparat statt. Dieser ist ein funktioneller Zellverband am Gefäßpol des Glomerulus. Ein Bestandteil ist die Macula densa. Sie liegt zwischen distalem Tubulus und Mesangium des Glomerulus. Ihre Aufgabe besteht darin, die Natrium-Chlorid-Konzentration des Harns im distalen Tubulus zu messen. Die Natrium-Konzentration im Urin ist proportional zur GFR. Wird eine zu hohe Konzentration durch die Macula densa registriert, setzt diese Adenosintriphosphat (ATP) frei (Bell et al. 2003). Extrazellulär wird ATP zu Adenosin umgesetzt. Dieses bindet direkt über Rezeptoren an dem *Vas afferens* und sorgt damit für eine Vasokonstriktion und eine GFR-Abnahme. Bei einer zu niedrigen Natrium-Chlorid-Konzentration schütten die juxtaglomerulären Zellen Renin aus (Skott und Briggs 1987). Renin ist ein Enzym, das eine hormonelle Kaskade, das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), in Gang setzt. Letztendlich sorgt es dafür, dass die Arteriolen, vor allem das *Vas efferens*, kontrahieren und damit auch die GFR wieder ansteigt (Burke et al. 2014; Carlstrom et al. 2015).

1.2 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Die Funktion des RAAS ist die systemische Blutdrucksteigerung. Eine Hemmung dieses Hormon-Systems führt zu einem Blutdruckabfall. Wie oben schon beschrieben führt ein systemischer Blutdruckabfall zu einer reflektorischen Freisetzung von Renin in den juxtaglomerulären Zellen. Auch eine vermehrte Sympathikusaktivität steigert die Renin-Freisetzung (Bunag et al. 1966). Renin ist ein Enzym, das die Umsetzung von Angiotensinogen zu Angiotensin I katalysiert. Dadurch wird die Kaskade gestartet. Ein weiteres Enzym, das

Angiotensin-Converting-Enzym (ACE), setzt Angiotensin I zu Angiotensin II (ANGII) um. ACE befindet sich auf dem Endothel aller Blutgefäße (Hackenthal et al. 1990). ANGIID stimuliert wiederum die Freisetzung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde (Carpenter et al. 1961). Die Blutdruck steigernde Wirkung beruht vor allem auf der Wirkung von ANGIID und Aldosteron. Aldosteron steigert die Natrium- und sekundär dadurch die Wasser-Retention im Sammelrohr. ANGIID ist einer der potentesten vasokonstriktiven Substanzen im Körper. Zum einen wirkt ANGIID direkt über seine Rezeptoren vasokonstriktiv. Zum anderen steigert es die Sympathikusaktivität und erhöht indirekt das intravasale Volumen über eine vermehrte Freisetzung des Anti-diuretischen Hormons (ADH) und über eine Steigerung des Durstgefühls. Der große Einfluss, den ANGIID auf den Blutdruck hat, macht es zu einem Angriffspunkt in der anti-hypertensiven Therapie. Durch ACE-Inhibitoren wird die Umsetzung von Angiotensin I zu ANGIID gehemmt. Weitere Möglichkeiten stellen Renin-, ANGIID-Rezeptor- und Mineralkortikoid-Rezeptor-Inhibitoren dar. Die Kaskade wird unterbrochen und es kommt zu einer Senkung des Blutdrucks (Te Riet et al. 2015).

1.3 Das Alport-Syndrom

Das Alport-Syndrom wurde nach dem Arzt Dr. Arthur Cecil Alport benannt, der 1927 einen Zusammenhang zwischen familiärer Nephritis, Taubheit und chronischem Nierenversagen bei einer britischen Familie feststellte (Alport 1927). Seinen Namen bekam das Alport-Syndrom jedoch erst 1961 (Williamson 1961). Es wurde als eine hereditäre Nephritis, die als Symptomkomplex mit einer Innenohrschwerhörigkeit und Augenveränderungen, wie zum Beispiel einem Lenticonus anterior, auftritt (Williamson 1961) Das Alport-Syndrom wird zu 85 % X-chromosomal über das *COL4A5*-Gen vererbt (Barker et al. 1990). In ca. 15 % der Fälle wird die Erkrankung über die Gene *COL4A3* und *COL4A4* autosomal-rezessiv vererbt (Mochizuki et al. 1994). Sehr selten kann das Alport-Syndrom über die beiden zuletzt genannten Gene autosomal-dominant vererbt werden. Durch die Mutationen kann Kollagen IV α 3/4/5, das u. a. Bestandteil der glomerulären Basalmembran ist, nicht korrekt oder gar nicht mehr synthetisiert werden (Hudson et al. 2003; Kruegel et al. 2013; Longo et al. 2002).

1.3.1 Phänotyp des Alport-Syndroms

Bei homozygoten bzw. hemizygoten Anlageträgern treten schon in der frühen Kindheit als Frühsymptome eine Mikrohämaturie und eine Innenohrschwerhörigkeit im Hochtonbereich auf (Funk et al. 2018). Im Verlauf kommt eine Proteinurie hinzu, die von einer Mikroalbuminurie bis zum nephrotischen Syndrom reichen kann. Die Patienten sind häufig

schon Anfang des dritten Lebensjahrzehnt dialysepflichtig und es liegt ein terminale Niereninsuffizienz (ESRD) vor. Weitere Aspekte des Alport-Syndroms, wie zum Beispiel Augenveränderungen, treten im Verlauf des Lebens auf (Jais et al. 2000; Kashtan 1993, updated 21.02.2019). Durch die chronische Niereninsuffizienz bedingt bekommen die Patienten häufig einen sekundären Hyperparathyreoidismus und eine Hypercholesterinämie (Gross et al. 2014).

Der Phänotyp heterozygoter Anlageträger ist sehr variabel. Die Klinik reicht von einer Hämaturie bei dünnerer Basalmembran bis zur terminalen Niereninsuffizienz (Dagher et al. 2001). Pierides et al. konnten in einer Studie mit 127 heterozygoten Patienten mit einer Mutation im *COL4A3*- oder *COL4A4*-Gen zeigen, dass Patienten, die jünger als 30 Jahre waren, als einziges Symptom lediglich eine Hämaturie hatten. 45 % der Patienten entwickelten nach dem 30. Lebensjahr eine Proteinurie. Von diesen kam es bei ca. 73 % zu einem Nierenfunktionsverlust, wovon wiederum ca. 43 % das Stadium einer terminalen Niereninsuffizienz erreichten (Pierides et al. 2009).

Es werden unterschiedliche Ursachen diskutiert, die den Verlauf bei heterozygoten Alport-Patienten beeinflussen können. Zum einen kann der Phänotyp bei Konduktorinnen von der X-Inaktivierung abhängen. Je nachdem, ob das betroffene oder das nicht betroffene X-Chromosom inaktiviert wird, kommt es zu einer Symptombildung. Da dies in den einzelnen Zellen unterschiedlich ist, entsteht ein genetisches Mosaik, sodass ca. 50 % der Podozyten in der Niere Kollagen IV α 3/4/5 korrekt bilden können, andere jedoch nicht (Funk et al. 2018).

Zum anderen scheinen sogenannte *Modifizier*-Gene den Verlauf des Alport-Syndroms zu beeinflussen. Unter Verdacht stehen unter anderem Laminin β 2- und Podocin-Polymorphismen. Eine Mutation im *LAMB2*-Gen, das für das Protein Laminin β 2 kodiert, verursacht das Pierson-Syndrom. Auch diese Krankheit ist durch ein kongenitales nephrotisches Syndrom, Augenveränderungen und eine diffuse mesangiale Sklerose gekennzeichnet (Zenker et al. 2004a; Zenker et al. 2004b). Laminin β 2 ist ein Protein der extrazellulären Matrix und Bestandteil der reifen glomerulären Basalmembran. Es verbindet das Zytoskelett der Zellen mit der extrazellulären Matrix (EZM) (Abrahamson 1986; Funk et al. 2018). Das Protein Podocin wird durch das *NPHS2*-Gen kodiert. Dieses wird von spezialisierten epithelialen Zellen, den Podozyten, exprimiert und ist am Aufbau der Schlitzmembran beteiligt. Als Transmembran-Protein stellt es eine Verbindung zwischen Zytoskelett und Zellmembran dar. Es wird vermutet, dass Podocin als Komplex mit anderen Proteinen, wie dem Ionenkanal TRPC6 und Nephrin, als Mechanorezeptor der Podozyten fungiert (Schermer und Benzing 2009). Mutationen im *NPHS2*-Gen verursachen familiäre autosomal-rezessive steroid-resistent nephrotische Syndrome, die bereits im Säuglings- und Kleinkindesalter von massiven Proteinurie

gekennzeichnet sind und im Verlauf zur Vernarbung der Niere im Sinne einer fokal-segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) und zu einer terminaler Niereninsuffizienz führen (Boute et al. 2000). Jedoch muss nicht zwangsläufig nur eine pathologische Mutation in Genen, die am Aufbau der glomerulären Basalmembran beteiligt sind, zur einer Aggravation des Verlaufs führen. Es wird vermutet, dass bestimmte Gen-Polymorphismen, die alleine keinen Krankheitswert haben, zu bestimmten Risikokonstellationen führen können, was die Variabilität des Phänotyps bei heterozygoten Alport-Patienten erklären würde. Unter Verdacht steht der p.R229Q-Polymorphismus und andere Polymorphismen im *NPHS2*-Gen, sowie Gen-Varianten im *NPHS1*-Gen, das für das Protein Nephrin kodiert (Frese et al. 2019; Gibson et al. 2013; Voskarides et al. 2012). Es sind noch viele andere Modifier-Gene denkbar, die zu veränderten Proteinen in der glomerulären Basal- oder Schlitzmembran führen, und das Alport-Syndrom beeinflussen könnten. Weitere Forschung ist dahingehend notwendig.

1.3.2 Histologie des Alport-Syndroms

Beim Auftreten der Mikrohämaturie im Kindesalter ist die Histologie in der Lichtmikroskopie häufig (noch) unauffällig. Jedoch lassen sich in der Elektronenmikroskopie Veränderungen feststellen. Es kommt zu einer unregelmäßigen Verdünnung und Verdickung, Aufsplitterung und Lammelierung der glomerulären Basalmembran. Im Verlauf, mit Zunahme der Proteinurie, treten Tubulusatrophien, eine interstitielle Fibrose und eine FSGS in der Lichtmikroskopie hinzu (Heidet und Gubler 2009; Ponticelli et al. 2014). Durch eine gestörte Funktion der Podozyten verplumpen ihre Fortsätze. Das Resultat ist eine defekte Schlitzmembran, was maßgeblich zum Auftreten der Proteinurie beiträgt (Hamano et al. 2002).

Bei heterozygoten Alport-Patienten ist ggf. eine dünne Basalmembran in der Elektronenmikroskopie zu sehen, während die Lichtmikroskopie unauffällig bleibt. Dies ist meist mit einer Mikrohämaturie verbunden (Vizjak und Ferluga 2008). So wie der Phänotyp variabel ist, sind auch die histologischen Veränderungen variabel. Einige Patienten entwickeln lebenslang keine weiteren Symptome. Bei anderen schreitet die Erkrankung nach dem 30. Lebensjahr durch bisher noch nicht vollständig geklärte Einflussfaktoren fort. Bei ungünstigem Verlauf zeigten Patienten teilweise histologische Veränderungen im Sinne einer FSGS, bei der es stellenweise zur einer teilweisen Vernarbung der Glomeruli kommt. Die Konsequenz ist eine chronische Niereninsuffizienz bis hin zur ESRD (Pierides et al. 2009; Vizjak und Ferluga 2008).

1.3.3 Pathogenese des Alport-Syndroms

Die Pathogenese des Alport-Syndroms ist noch nicht endgültig geklärt. Eine wichtige Rolle scheinen die Podozyten einzunehmen. Unter anderem synthetisieren sie das Kollagen IV $\alpha 3/4/5$ (Abrahamson et al. 2009). Insgesamt gibt es sechs verschiedenen Alpha-Ketten für Kollagen IV, die sich zu einer Tripelhelix im extrazellulären Raum assemblieren. Die daraus entstandenen Vorläuferproteine sind Kollagen IV $\alpha 1/1/2$, Kollagen IV $\alpha 3/4/5$, Kollagen IV $\alpha 5/5/6$. Kollagen IV $\alpha 5/5/6$ kommt in der Bowman-Kapsel, im Ösophagus und in der glatten Muskulatur vor (Hudson 2004). Im Gegensatz zu Kollagen IV $\alpha 1/1/2$, das von Endothel-, Mesangiumzellen und Podozyten gebildet werden kann, kann Kollagen IV $\alpha 3/4/5$ nur von Podozyten synthetisiert werden (Abrahamson et al. 2009). Das Kollagen IV $\alpha 1/1/2$ ist das fetale Kollagen IV. Während der Embryonalperiode wird es um den 150. Entwicklungstag durch Kollagen IV $\alpha 3/4/5$ ersetzt. Auslöser ist eine gesteigerte Konzentration von Proteasen im Blut. Dies verursacht vermehrt oxidativen und physikalischen Stress. Kollagen IV $\alpha 3/4/5$ kann mehr Disulfidbrücken ausbilden und ist somit resistenter gegenüber den Proteasen (Hudson et al. 2003; Miner und Sanes 1994).

Da bei Alport-Patienten auf Grund der Mutationen im *COL4A3*-, *COL4A4*- oder im *COL4A5*-Gen die Kollagen IV $\alpha 3/4/5$ -Synthese gestört ist, findet entweder gar kein Kollagen-Typ-Austausch statt oder es wird defektes Kollagen IV $\alpha 3/4/5$ synthetisiert (Kalluri et al. 1997; Pieri et al. 2014). Durch Proteasen degradiertes Kollagen IV kommt es zu einer unregelmäßigen Verdickung der glomerulären Basalmembran mit einer erhöhten Durchlässigkeit für große Proteine. Bereits unter physiologischen Blutdruckverhältnissen kommt es zu biomechanischem Stress und zu einer glomerulären Hypertension (Meehan et al. 2009). Ein weiterer Faktor stellt die Stressreaktion der Podozyten auf das defekte Kollagen IV $\alpha 3/4/5$ dar. Mittels Kollagen-Rezeptoren wie Integrine $\alpha 1\beta 1$ und $\alpha 2\beta 1$ oder der Discoidin Domain-Rezeptor 1 (DDR1) erkennen die Podozyten das defekte Kollagen. Durch die darauffolgende Stressreaktion werden vermehrt profibrotische Chemokine sezerniert. Dies stellt einen Versuch des Körpers dar, den Defekt zu reparieren (Gross et al. 2010). Mesangiumzellen invadieren den Glomerulus und lagern dort Bestandteile der EZM ab. So sind beim Alport-Syndrom Ablagerungen von Laminin $\alpha 1\beta 1\gamma 1$ und $\alpha 2\beta 1\gamma 1$ nachweisbar. Normalerweise befindet sich in der Basalmembran des Glomerulus nur Laminin $\alpha 5\beta 2\gamma 1$ (Zallocchi et al. 2013). Weiterhin werden vermehrt EZM-Komponenten, wie Kollagen IV $\alpha 1$ und $\alpha 2$ und Fibronektin, sowie *Transforming growth factor*(TGF)- $\beta 1$ von den Podozyten exprimiert (Sayers et al. 1999). TGF- $\beta 1$ hat u. a. eine profibrotische Wirkung und nimmt möglicherweise eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des Alport-Syndroms ein (Cosgrove und Liu 2017; Cosgrove et al. 2000). All diese Faktoren führen letztendlich zur Nierenfibrose (Gross et al. 2014).

1.3.4 Bisherige Therapieempfehlung

Eine Leitlinie zur Therapie von Alport-Patienten besteht aktuell noch nicht. 2013 erschien ein Expertenkonsens, der diagnostische und therapeutische Orientierung bietet (Savige et al. 2013). Da der Gendefekt nicht behoben werden kann, besteht zur Zeit nur die Möglichkeit der symptomatischen Therapie. Eine zentrale Rolle spielen *Angiotensin-Converting-Enzym-Inhibitoren* (ACEi). Durch den frühzeitigen Einsatz der ACEi kann die Dauer bis zur Dialysepflichtigkeit signifikant verlängert werden. So verzögerte sich die Dialysepflichtigkeit von Alport-Patienten unter ACEi-Therapie um drei Jahre. Wurde die Therapie schon vor Abfall der Nierenfunktion und bei Auftreten einer Proteinurie eingeleitet, konnte die Dialysepflichtigkeit sogar um 18 Jahre verzögert werden (Gross et al. 2012b). Zum einen hat ANGII eine pro-fibrotische Wirkung in der Niere (Kagami 2012; Kagami et al. 1994). Durch den Einsatz der ACEi wird ANGII blockiert, was den nephroprotektiven Effekt der ACEi zum Teil erklärt. Zum anderen wird durch ACEi der systemische Blutdruck gesenkt. Damit nimmt auch der biomechanische Stress im Glomerulus ab. Wie in der ESCAPE-Studie gezeigt werden konnte, kommt es bei Kindern mit einer chronischen Niereninsuffizienz unter hochdosierter ACEi-Therapie zu einer Verzögerung des Nierenfunktionverlusts (Reduktion des relativen Risikos um 35 % für das Auftreten einer ESRD in den nächsten fünf Jahren) und zur Abnahme der Proteinurie. Durch die EARLY-PROTECT-Studie, die 2012 gestartet wurde, soll mittels einer prospektiven, randomisierten, doppel-verblindeten klinischen Studie der Einsatz von ACEi bei pädiatrischen Alport-Patienten auf Unbedenklichkeit und Effizienz untersucht werden. Bisher wird die ACEi-Therapie bei Alport-Patienten nur im Off-Label Bereich eingesetzt (Gross et al. 2012a). Neben der nephroprotektiven Therapie mit ACEi sollten Risikofaktoren, wie Bluthochdruck, Hyperlipidämie und Proteinurie, die das Voranschreiten der Niereninsuffizienz begünstigen, medikamentös therapiert werden (Savige et al. 2013).

Neue Therapieansätze sind Gegenstand aktueller Forschung (Torra und Furlano 2019). Dabei werden unterschiedliche Ansätze verfolgt. Zum einen sollen pro-fibrotische und pro-inflammatorische Vorgänge innerhalb Zellen durch Hemmung der Signaltransduktion reduziert werden. Das Medikament Bardoxolon Methyl wird aktuell in der CARDINAL-Studie, einer randomisierten, doppel-verblindeten und placebo-kontrollierten Studie mit 187 Alport-Patienten, auf Wirksamkeit und Unbedenklichkeit in dieser Patientengruppe untersucht. Die Datenerhebung wird voraussichtlich im Dezember 2020 abgeschlossen werden. (CARDINAL-Studie 2017) Bardoxolon Methyl supprimiert die Expression von *Nuclear-factor-kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF κ B) und steigert die Expression vieler anti-inflammatorischer und anti-oxidativer Gene. Ein weiteres Angriffsziel stellt TGF- β dar, das im Rahmen der Stressreaktion von Podozyten sezerniert wird (Cosgrove et al. 2000). Auch durch TGF- β

induzierte Proteine wie die Mikro-Ribonukleinsäure(RNA)-21 sind Ziel der Forschung. Es konnte im Alport-Mausmodell gezeigt werden, dass durch eine Hemmung dieser Mikro-RNA die Albuminurie abnahm und das Überleben signifikant verlängert wurde (Gomez et al. 2015). Zum anderen versucht man durch Chaperone fehlgefaltetes Kollagen IV α 3/4/5 zu einer korrekten Strukturausbildung zu bringen und so den Stress im endoplasmatischen Retikulum im Podozyten zu reduzieren (Pieri et al. 2014; Wang D et al. 2017). Des Weiteren wird an Stammzellen geforscht, die sich im Glomerulus zu Podozyten differenzieren sollen. Die neu differenzierten Podozyten sollten in der Lage sein, korrektes Kollagen IV α 3/4/5 zu synthetisieren. Dies wäre ein kausaler Therapieansatz. *In vitro* konnten schon erfolgreiche Experimente durchgeführt werden (Moschidou et al. 2016). Von einer praktischen Anwendung ist dieser Ansatz jedoch noch weit entfernt.

1.4 Nierentransplantation

Bisher kann das Auftreten der ESRD medikamentös und durch das Behandeln von Risikofaktoren verzögert, jedoch nicht verhindert werden. Die einzige längerfristige Lösung ist dann die Nierentransplantation. Die ESRD stellt ein irreversibles Stadium der Nierenschädigung dar.

Die Wartezeit für eine Nierentransplantat beträgt ca. acht Jahre bei Leichenspende. Um die Wartezeit bis zur Nierenspende zu überbrücken, muss ein Nierenersatzverfahren angewendet werden. Eine Möglichkeit ist, dass die Patienten mehrmals in der Woche für jeweils vier bis fünf Stunden hämodialysiert werden. Dabei werden durch eine an den Blutkreislauf angeschlossene Maschine die harnpflichtigen Stoffe dem Blut entzogen und ggf. Elektrolyte ausgeglichen. Durch den hohen Zeitaufwand und die körperliche Anstrengung während der Hämodialyse sind die noch jungen Patienten in ihrem Alltag stark eingeschränkt. Ein weiteres Verfahren ist die Peritoneal-Dialyse. Vorteilhaft ist hierbei, dass der Patient selber zu Hause die Dialyse durchführen kann. Nachteilig ist, dass für dieses Dialyseverfahren ein künstlicher Zugang zur Bauchhöhle geschaffen werden muss und Fremdmaterial eingebracht wird. Dies birgt immer die Gefahr einer Infektion. Letztendlich bleibt die Dialyse eine rein symptomatische Therapie, die den Patienten stark einschränkt.

Laut Eurotransplant warteten in Deutschland in den letzten zehn Jahren zwischen 2010 und 2019 im Schnitt ca. 7779 Patienten pro Jahr auf eine Spenderniere (Eurotransplant 2020a). Durch Leichenspenden standen jedoch nur ca. 1688 Nieren pro Jahr im Schnitt zur Verfügung. Weitere 653 Nieren pro Jahre konnten durch Lebendspenden transplantiert werden (Eurotransplant 2020b). Dennoch bleibt eine große Differenz zwischen Angebot und Bedarf.

Eine Nierenlebenspende durch einen Angehörigen ist für Alport-Patienten häufig die einzige Möglichkeit die Wartezeit und damit Zeit der Dialyse zu verkürzen. Für eine Lebenspende müssen jedoch bestimmte Bedingungen erfüllt sein. Der Spender sollte eine ausreichende Nierenfunktion, maximal nur eine Hämaturie haben und der Blutdruck sollte nicht im hypertonen Bereich liegen (Lentine et al. 2017). Wie klinische Studien gezeigt haben, sollte eine Mikroalbuminurie zum Ausschluss für eine Nierenspende führen. In jedem Fall sollte eine Nierenspende nur mit ausreichenden Voruntersuchungen und unter sorgfältiger Abwägung der Risiken für den Spender durchgeführt werden. Durch die hereditäre Komponente des Alport-Syndroms haben Verwandte häufig selbst eine vorgeschädigte Niere (Gross et al. 2009).

Laut dem jährlichen Bericht der European Renal Association - European Dialysis and Transplant Association (ERA-EDTA) aus dem Jahr 2017 lag die Zwei-Jahres-Überlebensrate für Patienten, die ein Nierenersatzverfahren erhielten, bei ca. 77,2 %, die Fünf-Jahres-Überlebensrate sogar nur noch bei 52,4 %. Durch eine Nierentransplantation lässt sich das Überleben stark verbessern. Die Zwei-Jahres-Überlebensrate bei Totspende einer Niere lag bei 96,6 %, die einer Lebenspende sogar bei 98,2 %. Patienten mit einer terminalen Niereninsuffizienz profitieren also von einer Nierentransplantation immens. Das Transplantat-Überleben lag für eine Totspende bei 81,4 % nach fünf Jahren, für eine Lebenspende lag sie bei 86,7 % (ERA-EDTA Registry 2019).

Eine Analyse von Alport-Patientendaten ergab, dass die Fünf-Jahres-Überlebensrate unter Nierenersatzverfahren mit 93 % deutlich höher lag. Im Vergleich zu Patienten mit anderen Ursachen für eine ESRD, war auch die Überlebensrate von Alport-Patienten nach Nierenspende und das Transplantatüberleben nach Totspende signifikant besser. Bei Lebendnierenspende zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Temme et al. 2012).

1.5 Übergewicht und Nierenfunktion

Übergewicht ist mit einem *Body-Mass-Index* (BMI) von 25 bis 30 kg/m² definiert. Liegt der BMI oberhalb von 30 kg/m² spricht man von Adipositas. Die Prävalenz ist zunehmend. Ein Bericht der OECD (Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung) ergab, dass in Deutschland im Jahr 2015, 36,4 % der Erwachsenen übergewichtig waren. Weitere 23,6 % der Bevölkerung wurden als adipös eingestuft, sodass insgesamt 60 % der deutschen Bevölkerung einen BMI über 25 kg/m² haben (OECD 2017). Schon jedes fünfte Kind zwischen 3 und 17 Jahren ist übergewichtig oder adipös. Mit dem Alter der Kinder nimmt auch die Prävalenz von Übergewicht zu (Schienkiewitz et al. 2018). Krankhaftes Übergewicht ist zu einem globalen Problem geworden. Der weltweite mittlere BMI lag 2014 bei 24,3 kg/m². Während die globale Prävalenz von Untergewicht abnahm, stieg die Prävalenz von Adipositas 2014 auf ca. 12,9 % an. 1975 lag sie noch bei 4,8 %. Übergewicht ist vor allem ein Problem in Industrieländern. Aber auch in Entwicklungsländern ist die Prävalenz steigend (NCD Risk Factor Collaboration 2016).

Übergewicht resultiert aus einem Missverhältnis zwischen Kalorienaufnahme und -verbrauch, wobei die Kalorienaufnahme überwiegt. Beeinflusst wird der Kalorienverbrauch durch körperliche Aktivität, Medikamente und Veranlagung (Berg et al. 2014). Eine Gewichtszunahme wird durch die moderne Lebensweise vor allem durch zwei Faktoren begünstigt. Zum einen hat die körperliche Aktivität im Alltag durch Automatisierungsprozesse und technologischem Fortschritt stark abgenommen. Zum anderen hat sich die Ernährungsweise verändert. Es werden vermehrt Fertiggerichte und *Fastfood* konsumiert. Diese enthalten meist mehr Zucker und Fett, haben eine hohe energetische Dichte (Kalorien pro Gramm des Nahrungsmittels) und einen hohen glykämischen Index (Ausmaß der Blutzuckersteigerung durch ein Nahrungsmittel). Der vermehrte Konsum solcher Nahrungsmittel trägt wahrscheinlich zur Prävalenzzunahme des Übergewichts bei. Ein kausaler Zusammenhang konnte jedoch bisher nicht gezeigt werden (Rosenheck 2008). Mehrere Studien zeigten jedoch eine Assoziation zwischen erhöhtem Konsum von industriell-verarbeiteten Nahrungsmitteln und Übergewicht (Canella et al. 2014; Mendonca et al. 2016; Poti et al. 2017).

Mit Übergewicht sind weitere Komorbiditäten assoziiert. Tritt es mit einem arteriellen Hypertonus, Dyslipidämie und einer pathologische Glukosetoleranz zusammen auf, spricht man vom metabolischen Syndrom.

Übergewicht wirkt sich auch negativ auf die Nierenfunktion aus. So steigert Übergewicht das Risiko für das Auftreten einer terminalen Niereninsuffizienz (Hsu et al. 2006). Mit steigender Prävalenz von Adipositas steigt auch die Inzidenz dialysepflichtiger Patienten, wie eine Studie

von 1995 bis 2002 zeigen konnte (Kramer et al. 2006). Ob dieser Zusammenhang primär über das erhöhte Körpergewicht selbst oder sekundär über Komorbiditäten wie arterieller Hypertonus und Diabetes mellitus Typ 2 verursacht wird, ist noch Gegenstand aktueller Forschung. Es gibt einige Ansätze, die auch für eine primäre Genese sprechen.

So muss Fettgewebe als endokrines Organ verstanden werden. Fettgewebe sezerniert die Hormone Leptin und Adiponektin. Leptin hemmt u. a. das Hungergefühl (Auwerx und Staels 1998; Galic et al. 2010). Adiponektin steigert den Energieumsatz des Körpers, die Oxidation von Fettsäuren und die Insulin-Sensitivität und hemmt die Glukoneogenese. Außerdem besitzt Adiponektin anti-inflammatorische Effekte (Combs et al. 2001; Wang ZV und Scherer 2016; Yamauchi et al. 2007). Bei übergewichtigen Menschen wird vermehrt Leptin ausgeschüttet. Dies geht jedoch gleichzeitig mit einer Leptin-Resistenz einher. Adiponektin wird vom Fettgewebe weniger freigesetzt (Matsubara et al. 2002). Somit entsteht durch ein vermindertes Sättigungsgefühl und einen dysregulierten Glukosestoffwechsel ein *Circulus vitiosus*, der weitere Gewichtszunahme, eine diabetogene Stoffwechsellage und eine systemische Inflammation begünstigt.

Makrophagen im viszeralem Fettgewebe sezernieren TNF- α und Interleukin-6, beides pro-inflammatorische Zytokine. Dabei korreliert der BMI positiv mit dem Makrophagenvorkommen und der Sekretion von TNF- α und Interleukin-6 (Weisberg et al. 2003). Es kommt zu einer mitochondrialen und endothelialen Dysfunktion (Viridis et al. 2015).

In einem Mausmodell konnten Ma et al. zeigen, dass bei Mäusen, die durch eine *High-Fat*-Diät vermehrt viscerales Fett entwickelten, renal eine interstitielle Makrophagen-Invasion, eine mesangiale Proliferation und eine tubuläre Vakuolisierung auftrat. Da viszerales Fettgewebe nicht nur pro-inflammatorische Zytokine, sondern auch Bestandteile des RAAS sezerniert, ist Übergewicht auch mit arteriellem Hypertonus assoziiert. Im oben genannten Mausmodell führte eine Blockierung des ANGII-1-Rezeptors zu einer Abnahme des Blutdrucks, der Makrophagen-Invasion und der Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen. Es konnte ein *Shift* des Makrophagen-Subtyps von pro- zu anti-inflammatorisch agierenden Makrophagen gezeigt werden (Ma et al. 2011). Das RAAS scheint also sowohl ein Verbindungsglied zwischen Übergewicht und arteriellem Hypertonus, als auch zwischen Übergewicht und chronischer Niereninsuffizienz darzustellen. Es ist bekannt, dass ANGII als Bestandteil des RAAS eine pro-fibrotische Wirkung in der Niere hat und somit den Verlauf renaler Erkrankungen negativ beeinflussen kann (Ruster und Wolf 2011).

Eine weiteres Verbindungsglied zwischen chronischem Nierenversagen und Übergewicht scheint die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD), auch *Steatosis hepatis* genannt, zu

sein. Bei der NAFLD kommt es zu einer vermehrten Einlagerung von Fetttropfen ins Zytoplasma der Hepatozyten. Normalerweise liegt der Fettanteil in der Leber unter 5 % (Ahmed et al. 2015). Bei NAFLD-Patienten kann der Anteil auf bis zu 50 % erhöht sein. Ursächlich ist ein gesteigertes Angebot von Triglyzeriden (Lipiden) und freien Fettsäuren. Freie Fettsäuren werden vom Fettgewebe sezerniert oder können über die Nahrung aufgenommen werden. Je mehr freie Fettsäuren im Blut zirkulieren, desto mehr werden durch die Leber aufgenommen. Durch eine Insulinresistenz, wie man sie z. B. bei Diabetes mellitus Typ II oder dessen Frühform, der pathologischen Glukosetoleranz, findet, kommt es zu einer Enthemmung der Lipolyse und zu einer Steigerung der Triglyzerid-Synthese (Alves-Bezerra und Cohen 2017; Lewis et al. 2002). Die Prävalenz von NAFLD steigt somit mit der Prävalenz von Fettleibigkeit und dem metabolischen Syndrom. Das gehäuft gemeinsame Auftreten von chronischer Niereninsuffizienz und NAFLD könnte durch die gemeinsamen Risikofaktoren, wie Übergewicht und Diabetes mellitus Typ II, und durch gemeinsame Pathomechanismen erklärt werden. Ob ein kausaler Zusammenhang besteht, ist bisher noch nicht geklärt (Marcuccilli und Chonchol 2016).

Jedoch gibt es mehrere mögliche Ansätze, die eine NAFLD mit einer chronischen Niereninsuffizienz verbinden. So kommt es bei übergewichtigen Menschen zu einer verminderten Adiponektin- und zu einer gesteigerten Fetuin-A-Sekretion. Wie weiter oben schon erwähnt ist Adiponektin ein Hormon, das anti-atherosklerotisch, anti-inflammatorisch und anti-fibrotisch wirkt. Fetuin A, das von Hepatozyten synthetisiert wird, induziert eine Insulin-Resistenz. Erhöhte Fetuin-A-Spiegel sind mit Adipositas, NAFLD und chronischer Niereninsuffizienz assoziiert. Dabei korrelieren die Fetuin-A- und die Adiponektin-Konzentrationen miteinander invers. Damit stellt die Fetuin-A-Adiponektin-Interaktion eine mögliche Verbindung zwischen Fettgewebe, Leber und Niere dar (Ix und Sharma 2010). Des Weiteren spielt das RAAS in der Pathogenese der NAFLD und der chronischen Niereninsuffizienz eine Rolle. In Leber und Niere setzt ANGII pro-fibrotische und pro-inflammatorische Prozesse in Gang und steigert den oxidativen Stress (Borém et al. 2018; Kagami 2012). Es konnte gezeigt werden, dass hepatische Sternzellen RAAS-Komponenten bei Hepatozytenschädigung sezernieren. Außerdem verstärkt ANGII die hepatische Insulinresistenz und Lipidsynthese (Bataller et al. 2003; Mikolasevic et al. 2016). Da Fettgewebe selbst Komponenten des RAAS sezerniert und somit bei Übergewicht mehr ANGII im Körper zirkuliert, ist es möglich, dass Übergewicht eine NAFLD und chronische Niereninsuffizienz negativ beeinflusst (Karlsson et al. 1998). Ein weiterer Faktor, der sowohl Einfluss auf eine NAFLD als auch auf eine chronische Niereninsuffizienz hat, ist Fruktose. Fruktose wird heutzutage vor allem über gesüßte Getränke in viel größerer Menge aufgenommen, als noch vor

ein paar Jahren. Letztendlich kommt es durch einen hohen Fruktose-Konsum zu einem zellulären Energiemangel und einer vermehrten Harnsäure-Produktion (Musso et al. 2015). Es konnte sowohl eine Assoziation zwischen NALFD und Fruktose-Konsum als auch zwischen chronischer Niereninsuffizienz und Fruktose-Konsum festgestellt werden (Abdelmalek et al. 2010; Cheungpasitporn et al. 2014). Dies sind nur einige von vielen weiteren Ansätzen, die NAFLD, chronische Niereninsuffizienz und Übergewicht miteinander verbinden.

Die eingelagerten Fettsäuren und Triglyceride können in der Leber eine Entzündungsreaktion triggern. Das daraus entstehende Krankheitsbild wird als nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) bezeichnet. Sowohl NALFD als auch NASH stellen Risikofaktoren für eine Leberfibrose-, -zirrhose und für das Auftreten eines hepatozellulären Karzinoms dar (Michelotti et al. 2013).

1.6 Zielsetzung

Das Alport-Syndrom wird zu ca. 85 % X-chromosomal vererbt. Durch den X-chromosomalen Erbgang bedingt, ist der größere Teil der Alport-Patienten männlich und Kinder heterozygoter Mütter. Die Betroffenen erreichen meist zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr die Dialysepflichtigkeit. Das bedeutet ggf., dass er oder sie bis zur Nierentransplantation vier- bis fünfmal in der Woche für jeweils vier Stunden dialysiert werden muss. Der/Die Betroffene kann während der Dialysetherapie kaum eine berufliche Ausbildung beginnen oder eine Familie gründen. Der Alltag und die persönliche Entwicklung werden durch die zeitaufwendige Dialysetherapie stark beeinträchtigt. Doch nicht nur die erkrankte Person wird eingeschränkt. Auch für die Eltern sind die Dialysetherapie und das Warten auf eine Organspende eine große zeitliche wie auch emotionale Belastung. Zum Teil fühlen sie sich für die Erkrankung ihres Kindes verantwortlich, da das Alport-Syndrom eine vererbte Erkrankung ist. Dies gilt im Besonderen für die Mütter, die ihrem Kind das mutierte X-Chromosom weitervererbt hat. Die Wartezeit für eine Totspende beträgt in Deutschland aktuell ca. acht Jahre. Um die Wartezeit zu verkürzen, besteht in vielen Familien der Wunsch zur Lebendspende.

Dabei ergeben sich für Alport-Patienten neben den allgemeinen Risiken einer Transplantation besondere Gesichtspunkte, die bedacht werden sollten. Der Empfänger erhält möglicherweise eine Niere, die heterozygot für das Alport-Syndrom ist. Spender und Empfänger müssen dann den Rest des Lebens mit einer einzelnen Niere verbringen. Wie schon beschrieben kann der Verlauf bei heterozygoten Alport-Patienten sehr variabel sein. Die Einzelnieren sind mehr Stressfaktoren ausgesetzt als unter physiologischen Bedingungen. Zum einen muss das gesamte Blutvolumen über eine Niere filtriert werden, es kommt zu einer Hyperfiltration. Der

Empfänger muss Immunsuppressiva einnehmen, um eine Abstoßungsreaktion zu unterdrücken. Diese Medikamente sind oft nephrotoxisch. Außerdem können weitere Komorbiditäten die Einzelniere besonders schädigen. So sind Erkrankungen, die im Rahmen des metabolischen Syndroms auftreten (Diabetes mellitus, Dyslipidämie, arterielle Hypertonie und Übergewicht), mit einem vermehrten Auftreten von chronischem Nierenversagen assoziiert. Eine vorgeschädigte Nieren reagiert womöglich noch sensibler auf solche Einflüsse.

Das hier beschriebene Experiment simulierte im Mausmodell die Spende einer Niere eines heterozygoten Elternteils. Durch unterschiedliche Risikokonstellationen kann es auch bei heterozygoten Patienten zur terminalen Niereninsuffizienz kommen. In dieser Arbeit wurde der Einfluss eines *Modifier*-Gens mit und ohne den Einfluss von fettreicher Ernährung untersucht. Ziel war es, den variablen Verlauf bei heterozygoten Alport-Patienten besser nachvollziehen und den Betroffenen entsprechende wissenschaftlich fundierte Empfehlungen zur möglichen frühzeitigen Therapie und *Lifestyle*-Modifikation an die Hand geben zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsaufbau - Übersicht

Der Versuch sollte die Situation simulieren, dass einem Elternteil eines Alport-Patienten bzw. einer Alport-Patientin eine Niere im fortgeschrittenen Erwachsenenalter entfernt wird.

Hierfür wurden zwei Mausmodelle miteinander kombiniert. Es wurden *COL4A3*^{+/-}-Mäuse mit Mäusen gepaart, die den Genpolymorphismus für Podocin *NPHS2*^{+/^{R140Q} trugen. Der R140Q-Polymorphismus entspricht dem beim Menschen am häufigsten vorkommenden Polymorphismus R138Q. Somit ergaben sich vier verschiedene Genotypen: Wildtyp, *COL4A3*^{+/-}, *NPHS2*^{+/^{R140Q} und *COL4A3*^{+/-}/*NPHS2*^{+/^{R140Q}.}}}

Die Mäuse wurden auf drei Gruppen aufgeteilt: eine SHAM-Gruppe, bei der lediglich ein Bauchschnitt während der Operation (OP) durchgeführt wurde, um den Stress durch die Operation zu simulieren, eine NEPH-Gruppe, bei der operativ eine Niere entfernt wurde und eine Fett-Gruppe, bei der die Mäuse wie auch in der NEPH-Gruppe zunächst uninephrektomiert und anschließend fettreich ernährt wurden. Pro Genotyp und pro Gruppe wurden acht Mäuse verwendet, sodass für das Experiment insgesamt 96 Mäuse eingesetzt wurden (siehe Abbildung 2).

Vor Start des Experiments wurden die notwendigen Fachkenntnisse im Rahmen eines versuchstierkundlichen Kurses bei der zentralen tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen erlangt.

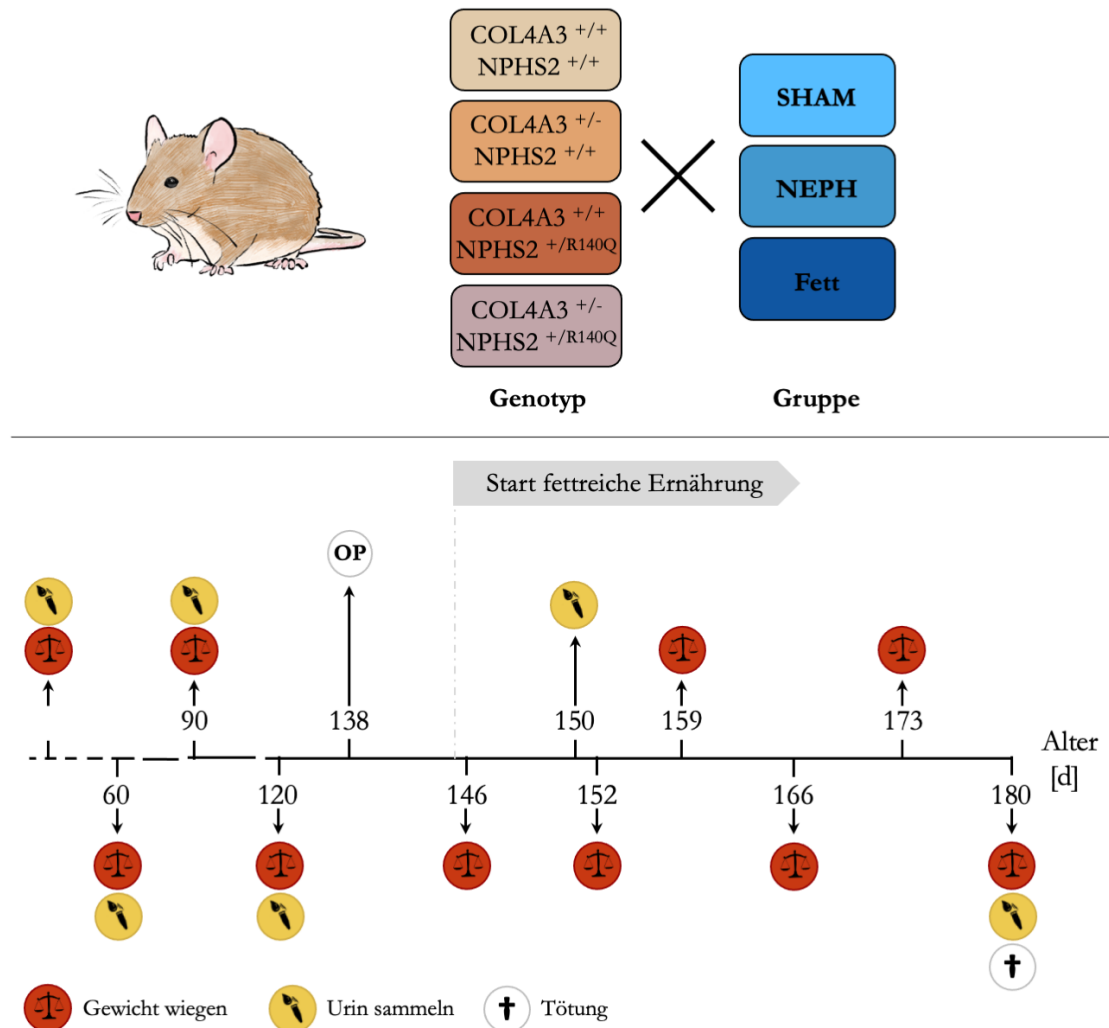


Abbildung 2 **Versuchsaufbau - Übersicht**

Die Mäuse wurden um den 30. Lebenstag in das Experiment eingeschleust. Es wurde im 30-Tage Intervall das Gewicht bestimmt und über max. sieben Tage insgesamt 200 μ l Urin gesammelt. Um den 138. Lebenstag wurde ein Teil der Mäuse uninephrektomiert. Nach einer postoperativen Stabilisierungsphase wurde am siebten postoperativen Tag eine fettreiche Ernährung mit Nackmausfutter begonnen. Das Gewicht wurde ab der Ernährungsumstellung wöchentlich bestimmt, der Urin wurde weiterhin alle 30 Tage gesammelt. Um den 180. Lebenstag wurden die Mäuse mittels kraniozervikaler Dislokation getötet.

2.2 Mausmodell

Für den Versuch wurden Inzuchtmäuse mit 129-Sv-Hintergrund verwendet. Seit 2006 war bereits ein *COL4A3*-knockout Mausmodell (129-Col4a3 ^{tm1Jhm}) in Göttingen etabliert, dessen Verlauf des Nierenversagens schon ausreichend untersucht worden war (Beirowski et al. 2006).

Diese Mauszuchtlinie wurde der Arbeitsgruppe ursprünglich vom Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc. (West Grove, Pennsylvania, USA) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Außerdem wurden heterozygote 129-NPHS2^{+ / R140Q}-Mäuse mit einem Sv/Pas-Hintergrund verwendet. Diese wurden der Arbeitsgruppe freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Corinne Antignac (INSERM U983, Paris, Frankreich) zur Verfügung gestellt (Philippe et al. 2008).

Durch das Kreuzen von ausschließlich heterozygoten Mäusen beider Zuchtlinien wurde sichergestellt, dass keine homozygoten *COL4A3*^{-/-} oder *NPHS2*^{R140Q/R140Q}-Mäuse geboren wurden, da diese keine Verwendung im Experiment fanden. Die Zucht wurde durch Tierpflegepersonal der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt und die Mäuse nach geltenden Tierschutzbestimmungen in einer apathogenen Umgebung gehalten. Der Tierversuch wurde nach §7 des Tierschutzgesetzes ordnungsgemäß bewilligt.

2.2.1 Uninephrektomie-Operation

Um die Spende einer Niere im Mausmodell zu simulieren und die Auswirkungen der Hyperfiltration auf eine einzelne Niere beurteilen zu können, wurde den Mäusen der NEPH- und Fett-Gruppe am 138. Lebenstag (± 2 Tagen) die rechte Niere entfernt.

20 Minuten präoperativ wurden die Mäuse mit Buprenorphin s.c. analgesiert (siehe 2.2.2). Die Inhalationsnarkose wurde mit Isofluran 3 Vol. % eingeleitet, indem die Maus in einen mit Isofluran-Luft-Gemisch gefluteten Käfig gesetzt wurde. Die Narkose wurde mit 2 Vol. % über ein Mundstück aufrechterhalten. Sobald der Zwischenzehenreflex erloschen war, wurde die Maus mit Pflasterklebestreifen auf dem Rücken fixiert. Die Augen wurden mit einer Augencreme vor Austrocknung geschützt. Hierbei konnte auch gleichzeitig der Ausfall des Kornealreflexes festgestellt werden. Die Operation wurde mit einem medianen Bauchschnitt begonnen. Die Haut und die darunter liegende Körperfazie wurden mit einer spitzen Schere eröffnet, sodass man einen Zugang zur Bauchhöhle erhielt. Der Darm wurde auf einer feuchten sterilen Kompresse aus dem Körper heraus verlagert. Nach Darstellung der rechten Niere inklusive der versorgenden Gefäße wurde der Nierenhilus mit einer *Hu-Friedy* Schlinge abgebunden. Die Niere wurde mit einer Lochpinzette vorsichtig gefasst und die Niere mit einer spitzen Schere abgesetzt. Anschließend wurde der Bauchraum sorgfältig auf Blutungen kontrolliert. Nach Rückverlagerung des Darms in die Bauchhöhle wurde zunächst die Körperfazie mit fünf bis sechs Einzelknopfnähten mit resorbierbarem 4-0 Monocryl Faden und die Haut mit drei 9 mm Klammern verschlossen.

Die noch narkotisierte Maus wurde in einen durch eine Reptilienheizmatte beheizten und mit einem Baumwolltuch ausgelegten Käfig gelegt und bis zum völligen Erwachen beobachtet. Sobald die Maus vollständig erwacht war, wurde die Wärmezufuhr im Käfig reduziert. Ca. drei Stunden nach der Operation wurde die Heizmatte ausgeschaltet.

Den Mäusen wurden am OP-Tag mittags gegen 14 Uhr und abends gegen 19 Uhr weitere Subkutan-Injektionen (s. c.) der Buprenorphin-Metamizol-Mischung appliziert. Am ersten und zweiten postoperativen Tag wurde die Analgesie auf reine Metamizol-Injektionen umgestellt, damit sich die Mäuse ausreichend schonten. Je nach Bedarf wurde wieder auf die Buprenorphin-Metamizol-Mischung gewechselt. Die Analgesie der operierten Mäuse wurde durch die Biologin des Labors Diana Rubel geplant und durchgeführt.

2.2.2 Analgesie-Schema

Tag 0 (OP-Tag)	Buprenorphin-Metamizol-Lösung s.c. 50 µl/10g Körpergewicht 20 min. präoperativ, dann alle 4 bis 6 h
	<ul style="list-style-type: none">• 0,333 ml Buprenorphinhydrochlorid (Temgesic)• 0,4 ml Metamizol (Vetalgin)• Ad 5 ml NaCl 0,9 % Injektionslösung
Tag 1 und 2	Metamizol-Lösung s.c. 50 µl/10g Körpergewicht 2x/d
	<ul style="list-style-type: none">• 0,4 ml Metamizol (Vetalgin)• Ad 5 ml NaCl 0,9 % Injektionslösung

2.2.3 Ernährung

Alle Mäuse des Experiment erhielten anfangs ein Standard Haltungsfutter für Ratten und Mäuse. Die Mäuse der Fett-Gruppe wurden am siebten postoperativen Tag auf Nacktmausfutter umgestellt, das u. a. eine höhere Kaloriendichte und Fettanteil hat. Beide Futtersorten wurden von ssniff Spezialdiäten produziert. In folgender Tabelle sind die Nährwerte der beiden Futtersorten aufgelistet (siehe Tab. 1).

Tabelle 1 **Nährwerte von Haltungs- und Nacktmausfutter**

	Haltungsfutter (V1534-000)	Nacktmausfutter (V1244-727)
Kaloriendichte brutto [MJ]/kg]	16,2	17,3
Fettanteil [%]	9	16
Proteinanteil [%]	24	30
Kohlenhydratanteil [%]	67	54

2.3 Genotypisierung

Mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und anschließender Agarose-Gelelektrophorese wurde der Genotyp bestimmt. Als Material wurden Schwanzspitzenbiopsien verwendet. Die Genotypisierung wurde freundlicherweise größtenteils durch die Biologin des Labors Diana Rubel, die technische Assistentin Heike Hühn und die wissenschaftliche Hilfskraft Kashan David durchgeführt.

2.3.1 PCR

Jede Probe wurde mit 200 μ l *Lysis Reagent* und 4 μ l Proteinkinase K für 60 Minuten bei 55 °C und 1400 rpm im Thermomixer und für weitere 45 Minuten bei 85 °C im Heizblock verdaut. Anschließend wurden die Proben 30 Sekunden bei 15000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein DNase- und RNase freies 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Von diesem wurden jeweils 0,7 μ l in ein Fach auf einer PCR-Platte übertragen und 24,5 μ L des entsprechenden Mastermixes pro Probe hinzugeben.

Mastermix für COL4A3-PCR

- 0,5 µl COL4 Primer-forward
- 0,5 µl COL4 Primer-reverse
- 0,5 µl COL4 Primer-mutant
- 0,5 µl Oligonukleotide
- 0,1 µl TopTaq DNA Polymerase
- 2,5 µl 10x TopTaq PCR Buffer
- 2,5 µl 10x CoralLoad Concentrate
- 17,4 µl dH₂O

Mastermix für Podocin-PCR

- 0,5 µl Pod3 Primer-forward
- 0,5 µl Pod3 Primer-reverse
- 0,5 µl Oligonukleotide
- 0,1 µl TopTaq DNA Polymerase
- 2,5 µl 10x TopTaq PCR Buffer
- 2,5 µl 10x CoralLoad Concentrate
- 17,9 µl dH₂O

Ansatz für 100 µl Oligonukleotide

- 10 µl dATP (Adenosintriphosphat)
- 10 µl dCTP (Cytidintriphosphat)
- 10 µl dGTP (Guanosintriphosphat)
- 10 µl dTTP (Thymidintriphosphat)
- 60 µl dH₂O

Ansatz für 20 pM Primer

- 10 µl Primer (100 pM/µl)
- 40 µl dH₂O

dH₂O = destilliertes Wasser

dNTP = Desoxyribonukleosidtriphosphat

Die PCR-Platte wurde im *Thermocycler* zunächst drei Minuten bei 94 °C erhitzt, um die enthaltenen Proteine zu denaturieren. Darauf folgten 35 Zyklen eines dreistufigen Zyklus. Die Proteine wurden nochmal 30 Sekunden lang bei 94 °C denaturiert. Anschließend wurde die Temperatur auf 60 °C reduziert, sodass sich die Primer anlagern konnten (*Annealing*). Bei 72 °C wurden die komplementären Stränge eine Minute lang durch die TopTaq DNA-

Polymerase gebildet. Dann begann der Zyklus von Neuem. Zum Schluss wurden die gebildeten DNA-Fragmente weitere zehn Minuten bei 72 °C verlängert.

2.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese mit DNA wurde ein 1,5%-iges Agarosegel hergestellt. Pro Gel wurden 0,45 g Agarose in einer 500 ml Flasche abgewogen und in 30 ml 1x Tris-Acetat-EDTA(TAE)-Puffer und 10 µl Ethidiumbromid (0,06%) aufgelöst (EDTA: Ethylendiamintetraacetat). Anschließend wurde das Gel ausgegossen und härtete 20 Minuten aus. Zu 12,5 µl Probe wurde 2,5 µl des 6x Ladepuffers (im *GeneRuler 100 bp DNA Ladder plus* Paket enthalten) gegeben. Die Gelelektrophorese Apparatur wurde mit TAE-Puffer befüllt. In eine Tasche des Gels wurde der Marker und in die restlichen die Proben pipettiert. Nach einer Laufzeit von 45 Minuten am Gleichstromgerät konnte das Gel unter dem UV-Transilluminator fotografiert und ausgewertet werden.

Ansatz für ein Liter 50x TAE-Puffer

- 242 g Tris
- 22,6 g EDTA
- 57,1 ml Essigsäure
- ad 1 l dH₂O

Nach Befüllen einer ein Liter Flasche mit Tris, EDTA und Essigsäure wurde der Inhalt bis auf ein Liter mit dH₂O aufgefüllt. Der pH-Wert sollte bei ca. 8,3 liegen.

2.4 Semiquantitative Bestimmung der Proteinurie

2.4.1 Gewinnung des Mausurins

Der Urin der Mäuse wurde ab dem 30. Lebenstag im 30-Tagen Intervall gesammelt. Der Sammelzeitraum betrug jeweils ± 3 Tage, insgesamt also eine Woche. So wurde gewährleistet, dass genug Urin für die spätere Weiterverarbeitung zur Verfügung stand. Der Urin wurde in diesem Rhythmus bis zum Todeszeitpunkt um den 180. Lebenstag gesammelt.

Die Mäuse wurden stets unter einer Sterilbank gehandelt, die zuvor mit Meliseptol desinfiziert worden war. Zur Uringewinnung wurden zwei Methoden angewendet: Entweder gab die Maus spontan Urin ab oder das Entleeren der Blase wurde durch leichten Druck auf den Bauchraum bei durch Nackengriff fixierter Maus provoziert. Der abgelassene Urin konnte dann mit einer Pipette vom Untergrund aufgenommen und in ein DNase-freies Reaktionsgefäß überführt werden. Die gesammelten Urinproben wurden bei -20 °C gelagert.

2.4.2 Chloroform-Methanol-Fällung

Bevor die Proteinurie mittels Gelelektrophorese bestimmt werden konnte, mussten die in der Probe enthaltene Salze, Lipide und Zellen mittels Chloroform-Methanol Fällung entfernt werden, da diese die Ergebnisse verfälscht hätten.

Die Proben wurden vor der Verarbeitung bei 3240 rpm ($\cong 1000$ g) für fünf Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Zelldetritus setzte sich am Boden. Vom Überstand der jeweiligen Urinprobe wurden 20 μ l mit 80 μ l dH₂O verdünnt. Es wurden nacheinander 4 Vol. % (400 μ l) Methanol, 1 Vol. % (100 μ l) Chloroform und 3 Vol. % (300 μ l) dH₂O hinzugegeben. Nach jedem Arbeitsschritt mussten die Proben ausreichend mittels Vortexmischer gemischt werden. Durch weiteres einminütiges Zentrifugieren bei 15000 rpm ($\cong 1400$ g) bei Raumtemperatur lagerten sich die Proteine als dünne Schicht zwischen zwei Phasen ab. Die obere Phase wurde abgenommen und verworfen. Zu jeder Probe wurde nochmals 400 μ l Methanol gegeben, die Proben gemischt und zwei Minuten bei 15000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Nun befanden sich die Proteine in Form eines instabilen Pellets am Boden des Reaktionsgefäßes. Die darüber befindliche Methanol-Chloroform-Lösung wurde abgenommen, ohne dabei das Pellet zu zerstören. War das Pellet nicht sichtbar, wurden ca. 30 μ l im Reaktionsgefäß belassen. Es wurden weitere 400 μ l Methanol zur Probe hinzugegeben, gemischt und nochmal zwei Minuten zentrifugiert. Die Flüssigkeit oberhalb des Pellets wurde verworfen. War kein Pellet sichtbar, wurde von der Methanol-Chloroform-Lösung bis auf 20 μ l abgenommen.

Anschließend wurde die Probe offen unter einer Sterilbank getrocknet, bis die komplette Flüssigkeit verdunstet war und dann mit 25 μ l Probenpufferansatz aufgefüllt.

Für den Bovines-Serumalbumin(BSA)-Standard als relative Referenz für die Proteinurie wurde ein BSA-Standard mit einer Konzentration von 300 ng pro 5 μ l angesetzt und dieser mit dem Probenpuffer und dem Reduktans in entsprechender Menge versetzt.

Proben und BSA-Standard wurden nach nochmaligem Mischen mittels Vortexmischer für zwei Minuten bei 85 °C im Heizblock erhitzt und schließend sofort auf Eis gestellt. Nach nochmaligem Abzentrifugieren waren die Proben und der BSA-Standard fertig für die Gelelektrophorese.

Probenpufferansatz

- 10 μ l dH₂O
- 12,5 μ l 2x Tris-Glycine SDS Sample Buffer
- 2,5 μ l 10x NuPAGE Sample Reducing Agent

BSA-Standard-Ansatz: 300ng BSA/ 5 μ l

- 0,6 mg BSA
- ad 10 ml dH₂O

BSA-Standard mit Probenpuffer

- 5 μ l BSA-Standard
- 6,25 μ l 2x Tris-Glycine SDS Sample Buffer
- 1,25 μ l 10x NuPAGE Sample Reducing Agent

2.4.3 SDS-Page-Gelelektrophorese

Für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid(SDS-Page)-Gelelektrophorese wurde ein Fertiggel verwendet. Das Gel wurde aus der Packung entfernt, mit destilliertem Wasser abgespült und der Anleitung gemäß in die Gelelektrophoreseapparatur eingespannt. Der 10x konzentrierte Laufpuffer wurde mit dH₂O im Verhältnis 1:10 verdünnt. Die innere Zelle wurde mit dem 1x konzentrierten Laufpuffer befüllt und auf Dichtigkeit überprüft. Anschließend wurde die äußere Zelle befüllt.

Die erste Tasche des Gels wurde mit 10 μ l Protein Marker und die zweite Tasche mit dem BSA-Standard mit Probenpuffer besetzt. Alle weiteren Taschen wurden jeweils mit dem Inhalt einer kompletten Probe befüllt. Hierfür wurde eine Mikroliterspritze von Hamilton verwendet und diese nach jeder Probe mit Laufpuffer der äußeren Kammer gereinigt.

Nachdem das Gel fertig befüllt worden war, lief das Gel 15 Minuten mit einer Spannung von 80 V und ungefähr weitere 85 Minuten bei 120 V.

Nach dem Ende der Laufzeit wurde das Gel aus der Kammer entfernt und in einem Gelfärbekästchen über Nacht auf dem Schüttler mit einer Fertig-Coomassie-Färbelösung (Roti-Blue) gefärbt. Danach wurde das Gel mit dH₂O auf dem Schüttler gewaschen und mit dem Bio-Rad ChemieDoc Imaging System fotografiert. Die Bilder wurden mittels ImageJ ausgewertet. (siehe

Abbildung 3) Dabei wurde jede Laufspur in drei Abschnitte unterteilt: Eine Albuminbande, eine Bande für Proteine, die größer, und eine Bande für Proteine, die kleiner als die Albuminbande waren. Auf diese Weise wurde fast die komplette Laufspur ausgewertet. Die sehr kleinen Proteine (ungefähr <40 kDa) wurden dabei bewusst nicht mit einbezogen, da gerade männliche Mäuse mehr kleine Proteine über den Urin ausscheiden, die sich auf dem Gel überlagern. Die angelegten Banden waren für jede Laufspur und jedes Gel gleich groß. Da ImageJ die Summe

der Intensitäten der Pixel ermittelt, wurde die durchschnittliche Intensität/ cm^2 errechnet und zum BSA-Standard, der auch zur Intensität/ cm^2 umgerechnet wurde, relativiert.

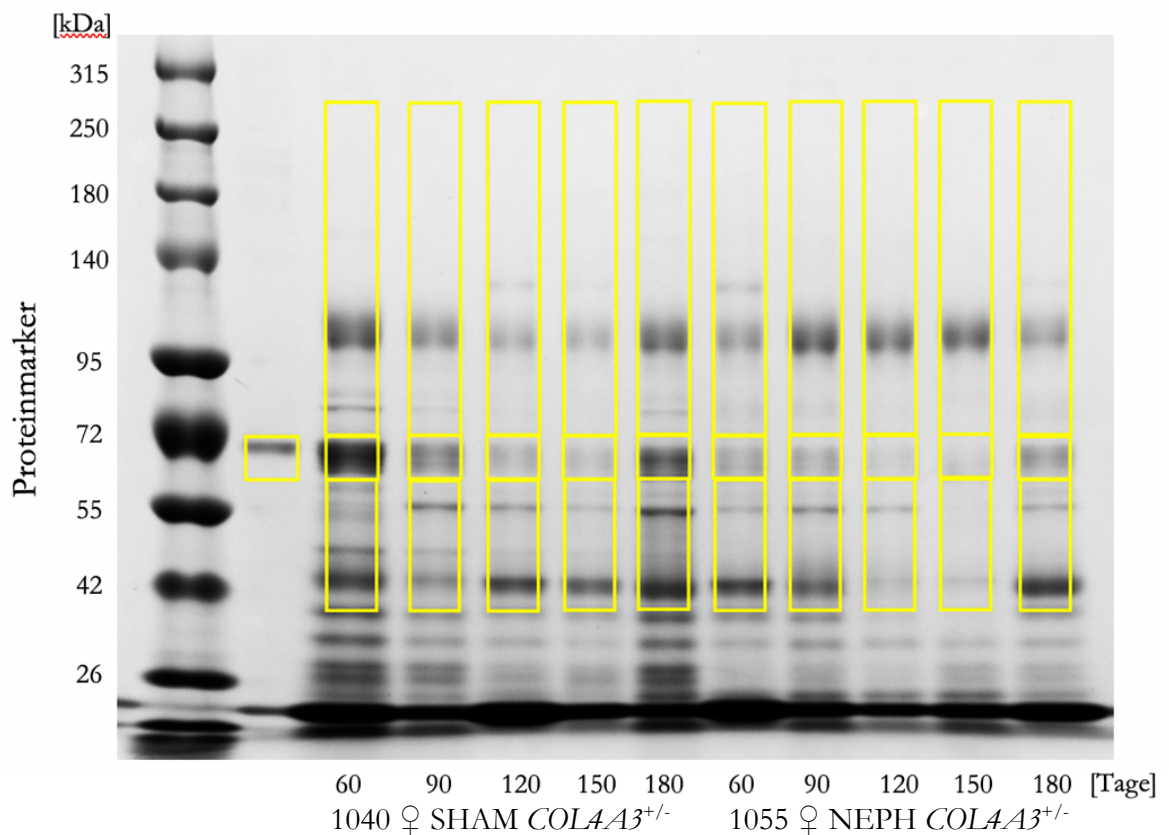


Abbildung 3 **Beispiel für die Auswertung eines Gels mit ImageJ**

Die erste Laufspur zeigt den Proteinmarker, der eine Orientierung für die Größe der Proteine bietet. In der zweiten Laufspur ist der BSA-Standard aufgetragen. Da Albumin ca. 66 kDa groß ist, befindet sich die einzige Bande ungefähr auf der Höhe der 72 kDa Bande des Proteinmarkers. Die weiteren Spuren zeigen beispielhaft die im Urin enthaltenen Proteine zweier weiblicher Mäuse mit dem Genotyp *COL4A3*^{+/-}, jeweils im 30-Tage Abstand im Alter von 60 bis 180 Tagen. Der Maus 1040 wurde keine Niere entfernt. Die Maus 1055 wurde um den 138. Lebenstag uninephrektomiert.

2.5 Cholesterin- und Harnstoffbestimmung i. S.

Nachdem die Mäuse mittels kraniozervikaler Dislokation getötet worden waren, wurde der Bauch- und Brustraum eröffnet. Das Herz wurde mit einer kurzen Kanüle punktiert und die Blutprobe gewonnen. Das Blut wurde in ein 1,5 ml DNase-freies Reaktionsgefäß überführt und für eine Stunde auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Proben mit 8000 rpm zentrifugiert und der Überstand, das Blutserum, in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der Vorgang wurde nochmal wiederholt. Anschließend wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

Die Bestimmung von Cholesterin und Harnstoff i. S. (im Serum) erfolgte durch die klinische Chemie der Universitätsmedizin Göttingen.

2.6 Oil-Red-O-Leberfärbung

2.6.1 Materialentnahme und Einbettung

Nach der Tötung der Mäuse wurde die Leber möglichst gewebeschonend entnommen. Es wurden zwei etwa gleich große Stücke abgeschnitten und für fünf Tage in einer Histokassette in 4 % Paraformaldehyd (PFA) in phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) bei 4 °C gelagert. Nach einstündigem Waschen in 1x PBS wurden die beiden Leberstücke in ein 15 ml Falcon mit 30%-iger Sucrose-Lösung in PBS überführt und bei 4 °C gelagert. Nach 24 bis 48 Stunden sanken die Stückchen ab und konnten eingebettet werden. Dafür wurden die Leberstücke, jeweils eins hochkant, das andere flach, in eine Tissue-Tek Kammer gelegt. Die Kammer wurde möglichst blasenfrei mit OCT Einbettmatrix befüllt und auf eine auf flüssigem Stickstoff schwimmende Petrischale eingefroren. Nachdem der komplette Inhalt der Tissue-Tek Kammer gefroren war, konnten die eingebetteten Leberstücke bei -20 °C gelagert werden.

Ansatz für PBS 10x

- 4,8 g Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)
- 28,4 g Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)
- 160 g Natriumchlorid (NaCl)
- 4 g Kaliumchlorid (KCl)
- ad 2000 ml dH_2O

pH auf 7,4 einstellen.

Ansatz für 4 % PFA in PBS

- 40 g PFA
- 100 ml PBS 10x
- ad 1000 ml dH_2O

Lösung auf einer Heizplatte unter Rühren auf 90 °C erhitzen, bis sich das PFA vollständig aufgelöst hat. Danach portioniert einfrieren bei -20 °C.

Ansatz für 30 %-ige Sucrose-Lösung in PBS

- 30 g Sucrose
- ad 100 ml PBS 1x

2.6.2 Anfertigen von Kryo-Schnitten

Die in OCT Einbettmatrix eingefrorenen Leberstücke wurden mit einem Kryotom bei ca. $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ Kammertemperatur in $6\text{ }\mu\text{m}$ dicke Schnitte geschnitten, auf einen Objektträger übertragen und bis zur Färbung wieder bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.6.3 Oil-Red-O-Färbung

Mittels Oil-Red-O-Färbung wurde Fett in Geweben rot angefärbt. Das restliche Gewebe wurde mit Hämatoxylin gegengefärbt.

Aus dem Oil-Red-O-Pulver wurde zunächst eine Stocklösung hergestellt, indem 300 mg Oil-Red-O in 100 ml $99\text{ }\%$ -igem Isopropanol gelöst wurde. Die Stocklösung musste mindesten ein Tag vor Gebrauch hergestellt werden.

Zur Herstellung der Oil-Red-O-Arbeitslösung wurde 45 ml der Stocklösung mit 30 ml dH_2O verdünnt. Nach zehnmütigem Ruhen wurde die Lösung durch einen Papierfilter filtriert. Die Arbeitslösung war für einige Stunden verwendbar.

Die Leber-Kryo-Schnitte wurden für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurden die Schnitte für 10 Minuten in $10\text{ }\%$ PFA fixiert, kurz in $60\text{ }\%$ -iges Isopropanol getaucht und für 15 Minuten in der Oil-Red-O-Arbeitslösung gefärbt. Die Schnitte wurden wieder kurz in $60\text{ }\%$ -iges Isopropanol und dH_2O getaucht und für drei Minuten mit Hämatoxylin gegengefärbt. Nach zehnmaligem Eintauchen in dH_2O wurden die Leberschnitte mit Immu-Mount-Medium eingedeckelt und luftdicht durch Auftragen von klarem Nagellack abgeschlossen.

Die gefärbten Leberschnitte wurden lichtmikroskopisch untersucht, fotografiert und verglichen. In Abbildung 4 ist ein Beispielbild für einen Kryo-Leberschnitt, der mit der Oil-Red-O-Färbung gefärbt wurde.

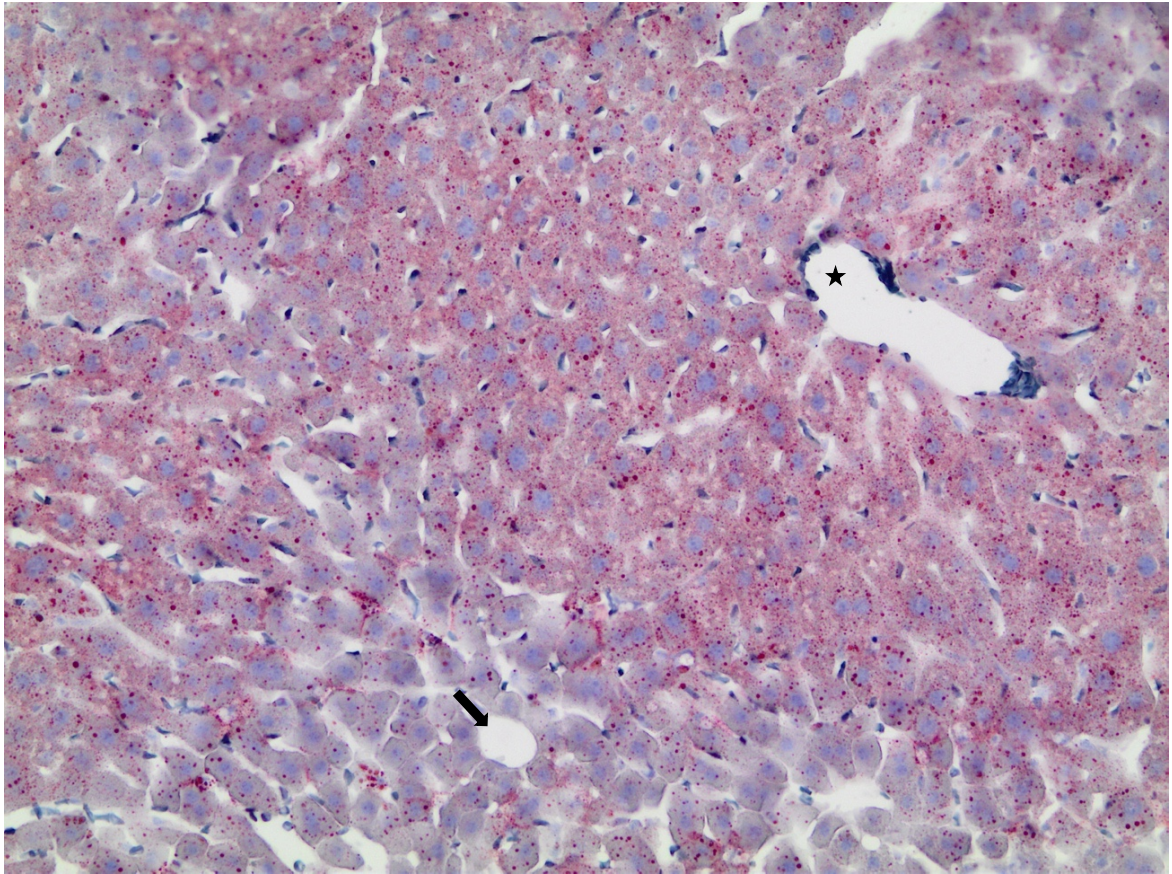


Abbildung 4 **Beispiel eines Leberschnitts in Oil-Red-O-Färbung**

Die Fettvakuolen stellen sich in der Färbung rot, das Zytoplasma rosa und die Zellkerne blau dar. Im rechten oberen Quadranten wurde eine Zentralvene (★) angeschnitten. Im unteren mittleren Bildabschnitt ist vermutlich ein Sinusoid (➔) zu sehen, durch den das Blut der Leberarterie und Portalvene zur Zentralvene fließt.

2.6.4 Auswertung

Zum einen wurde der prozentuale Flächenteil der Fettvakuolen an der Gesamtfläche mit ImageJ bestimmt (siehe Abbildung 5). Hierfür wurden die Bilder als RGB-*Stack* in den grünen Kanal überführt. In diesem Kanal stellte sich rot am dunkelsten dar. Anschließend wurde ein Schwellenwert definiert, sodass möglichst nur die dunklen, also die roten Bereiche erfasst wurden. Als Ergebnis wurde der prozentuale Flächenanteil vom Gesamtbild angegeben.

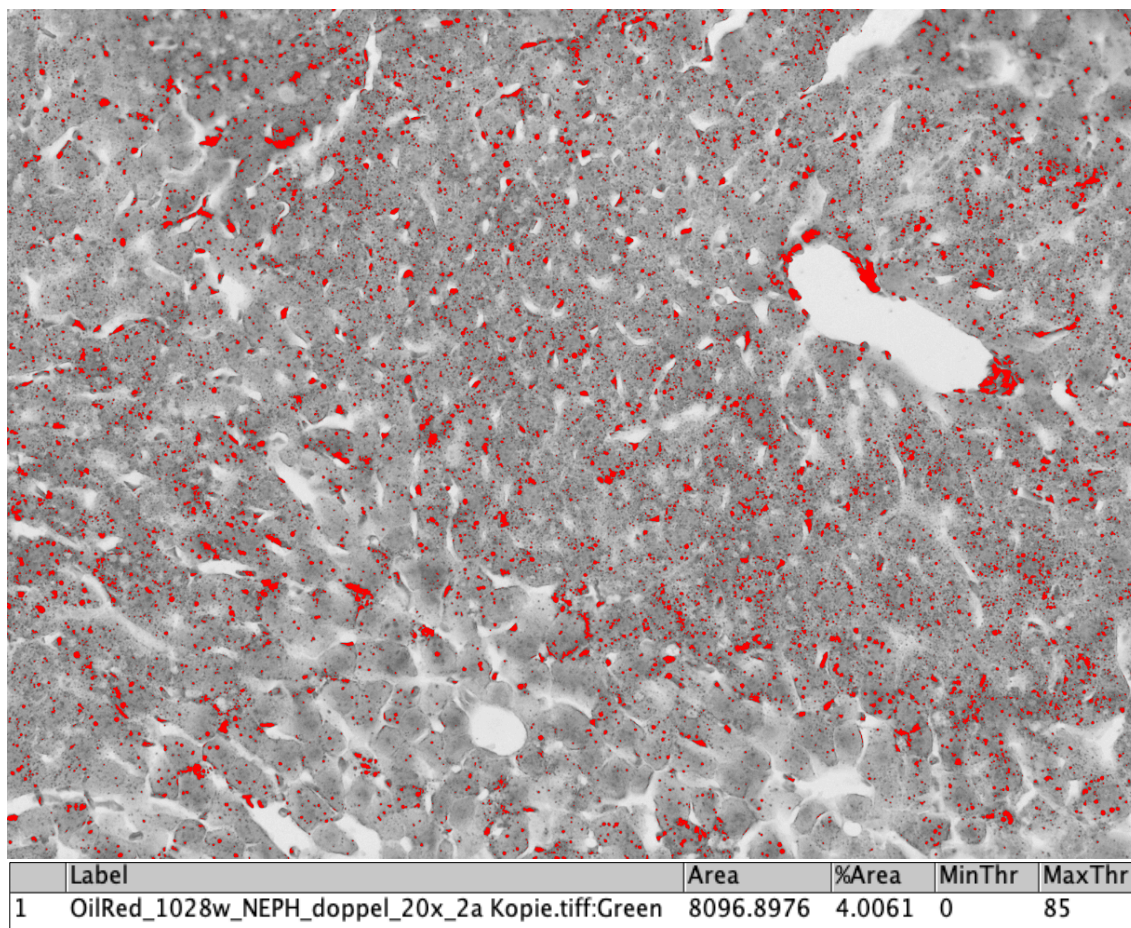


Abbildung 5 **Beispiel für die Auswertung mit ImageJ**

Das Bild aus Abbildung 3 wurde in den grünen Kanal überführt. Die roten Areale, die neben Fettvakuolen auch leider Erythrozyten umfassen, stellen ca. 4 % der Gesamtfläche dar. Der Schwellenwert wurde auf 85 festgelegt, da so auch kleinste Fetttropfen erfasst wurden.

Ein gängiger Score für die Einschätzung einer Leberverfettung durch den prozentualen Anteil ist in Tabelle 2 dargestellt.

(Roeb et al. 2015). Es wurde noch ein weiterer Score verwendet, der das Verteilungsmuster der Fettvakuolen im Leberparenchym beschreibt. Lag das Verteilungsmuster zwischen zwei Score-Werten wurde der Mittelwert aus beiden gebildet. Außerdem wurde ein Score für die qualitative Bewertung der Fettvakuolen-Morphologie erstellt. (siehe Tabelle 2)

Alle drei Merkmale wurden jeweils getrennt voneinander verglichen, um einen möglichen Unterschied zwischen der NEPH- und der Fett-Gruppe festzustellen.

Tabelle 2 **Gradeinteilung der Steatosis hepatis**

Grad	Fettanteil [%]	Verteilungsmuster	Fettvakuolen-Morphologie
Norm	≤ 5 %	Keine Fettvakuolen sichtbar	Keine/ vereinzelt
1	6 – 33 %	Vereinzelte Ansammlungen	mikrovesikulär
2	34 – 66%	Flächigere Verfettung, Bereich um die Zentralvene noch frei	medivesikulär
3	≥ 67 %	panlobulär	makrovesikulär

2.7 Immunhistochemie

2.7.1 Entnahme und Einbettung der Niere(n)

Nach Tötung der Mäuse durch kraniozervikale Dislokation wurden nach der Blutentnahme die Niere, bzw. bei Mäusen der SHAM-Gruppe beide Nieren, entnommen. Die Niere wurde längs halbiert und über Nacht in einer Histokassette in 4 % PFA in PBS (siehe 2.6.1) konserviert. Anschließend wurden die Nieren für eine Stunde in PBS gewaschen und bis zur Einbettung bei 4 °C in 70 %-iger Ethanol-Lösung gelagert.

Die konservierten Nieren wurden durch eine Gewebeeinfiltrationsautomaten entwässert. Dabei badeten die Kassetten in aufsteigender Ethanol-Konzentration, beginnend bei 70 %-iger und endend bei 99 %-iger Ethanol-Lösung, für jeweils fünf Minuten. Im darauffolgenden Schritt wurden die Niere in eine Einbettform überführt, mit Paraffin überzogen und auf einer Kühlplatte zum Aushärten gebracht.

2.7.2 Anfertigen von Paraffin-Schnitten

Von den in Paraffin eingebetteten Nieren wurde mittels Mikrotom 3 µm dicke Schnitte abgeschnitten. Dabei wurde möglichst das komplette Organ erfasst. Der Schnitt wurde mit einem Pinsel oder Pinzette in ein warmes Wasserbecken gegeben, sodass der Paraffinschnitt inkl. Niere glatt auf der Wasseroberfläche zu liegen kam. Durch eintauchen eines Objektträgers wurde der Schnitt auf diesen übertragen. Die Objektträger trockneten für mindestens zwölf Stunden in einem Heizschrank bei 37 °C.

2.7.3 Fibronektin-Färbung

Fibronektin ist ein Protein der extrazellulären Matrix und wurde angefärbt, um fibrotische Umbauprozesse im Interstitium und in den Glomeruli darzustellen.

Als Primärantikörper wurde der polyklonale Antikörper gegen Fibronektin ab2413 von Abcam in einer Konzentration von 1/100 in 5 % BSA in tris-gepufferter Salzlösung (TBS) verwendet. Der Sekundärantikörper Cy3 wurde mit einer Konzentration von 1/1000 in 5 % BSA in TBS verwendet und fluoreszierte unter Anregung mit grünem Licht rot.

Für die Färbung wurden die Paraffinschnitte zur Rehydrierung wie folgt gebadet:

3x	10 Min.	Xylol
2x	5 Min.	100 % Ethanol
1x	5 Min.	96 % Ethanol
1x	5 Min.	70 % Ethanol
1x	5 Min.	50 % Ethanol
1x	5 Min.	dH ₂ O

Es erfolgte der Andau durch Proteinkinase K in 0,05 Tris-HCl pH 7,6 (Verdünnung 1/50) für 5 Minuten bei 37 °C. Anschließend wurden die Schnitte dreimal für jeweils 10 Minuten in TBS 1x gewaschen.

Um sicher zu gehen, dass der primäre Antikörper nur an seinem Zielantigen band und nicht unspezifische Bindungen einging, wurden die Schnitte eine Stunde bei Raumtemperatur mit 5 % BSA/TBS geblockt.

Der Fibronektin-Antikörper wurde auf alle Schnitte bis auf den Kontrollschnitt aufgetragen. Hier wurden erneut 50 µl 5 % BSA/TBS aufgetragen. Die Schnitte wurden für eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

Die Präparate wurden erneut dreimal 10 Minuten in TBS gewaschen und der Sekundärantikörper aufgetragen. Dieser band an den Primärantikörper und fluoreszierte bei Anregung durch grünes Licht rot. Da der Antikörper photosensibel war, wurden die Schnitte für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und nochmal dreimal jeweils 10 Minuten in TBS 1x im Dunkeln gewaschen.

Ansatz für 2 Liter TBS 10x

- 121 g 50 mM Tris
- 176 g 150 mM NaCl
- mit dH₂O auf 2000 ml auffüllen
- pH mit HCl auf 7,6 tritrieren

Ansatz für 0,05 Tris-HCl pH 7,6

- 0,303 g Tris-Base
- mit dH₂O auf 50 ml auffüllen
- pH mit HCl auf 7,6 tritrieren

Abschließend wurden die Schnitte mit Fluoreszenz-*Mounting-Medium* benetzt und mit Deckgläschen eingedeckelt. Die fertig gefärbten Schnitte trockneten im Dunkeln über Nacht bei Raumtemperatur und wurden anschließend bei 4 °C gelagert.

2.7.4 Laminin-Färbung

Durch Anfärben des Laminins-111 wurde die extrazelluläre Matrix dargestellt. Der polyklonale Primärantikörper Rb pAb to Laminin Ab 11575 rabbit IgG von Abcam band an Laminin-111. Als Sekundärantikörper wurde ein Goat-anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 A-11008 verwendet, der unter Anregung von blauem Licht grün fluoreszierte.

Dabei wurden der Primärantikörper in einer Konzentration von 1/25 in 5 % BSA ins TBS und der Sekundärantikörper in einer Konzentration von 1/200 in 5 % BSA in TBS verwendet. Ansonsten lief der Färbevorgang wie bei der Fibronectin-Färbung ab (siehe 2.7.3).

2.7.5 Scoring-System

Von den gefärbten Nieren-Schnitten wurden mit dem Mikroskop Axio Imager mit der AxioCam 503 mono von Zeiss jeweils sechs Bilder in zehnfacher und 40-facher Vergrößerung angefertigt. Dabei wurde möglichst der komplette Schnitt der Nieren stichprobenartig erfasst.

Das Scoring wurde freundlicherweise von Prof. Dr. med. Oliver Gross, Jan Böckhaus und Dr. med. Ann-Kathrin Schäfer durchgeführt. Die Bilder wurden randomisiert und den Scorer*en verblindet vorgelegt. Beide Scoring-Systeme reichten von null bis drei. Es war auch möglich halbe Punkte zu vergeben. Anschließend wurde die Bilder wieder entrandomisiert und ausgewertet.

Fibronectin-Score (siehe Tabelle 3)

Durch den Fibronectin-Score wurde der Grad der Fibrose semiquantitativ analysiert. Es wurde vor allem die interstitielle Fibrose in der zehnfachen Vergrößerung betrachtet, während die Glomerulosklerose vor allem in der 40-fachen Vergrößerung bewertet wurde.

Tabelle 3 **Fibronektin-Score mit Beispielbildern**

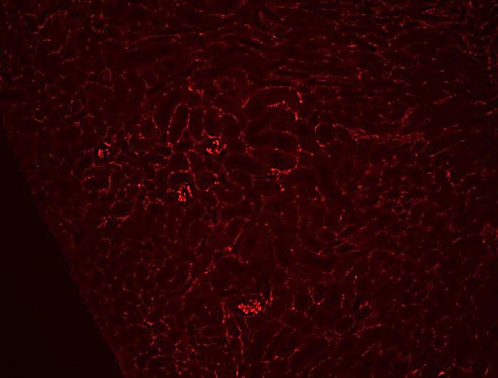
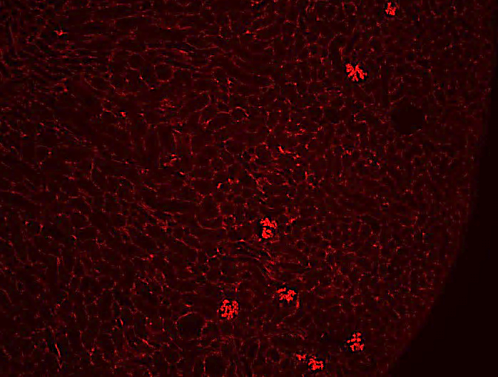
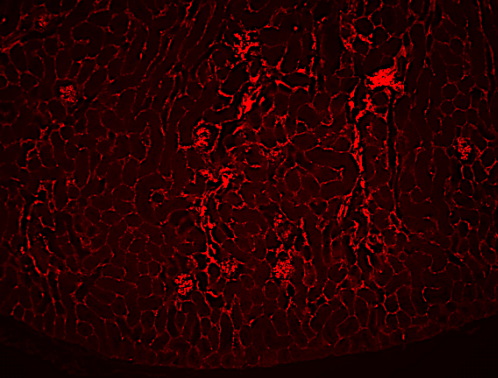
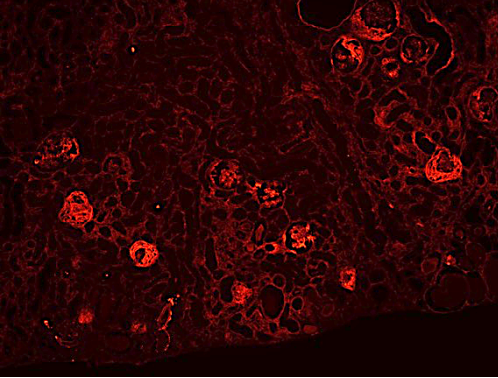
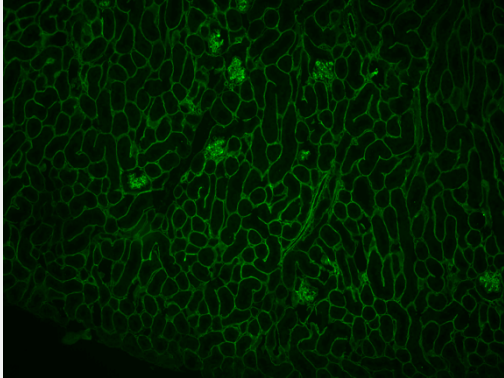
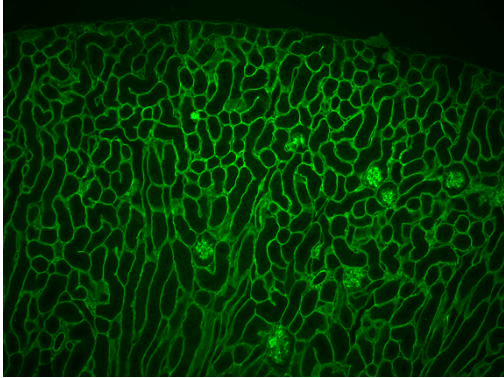
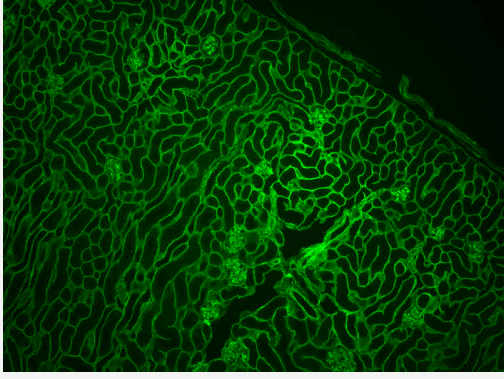
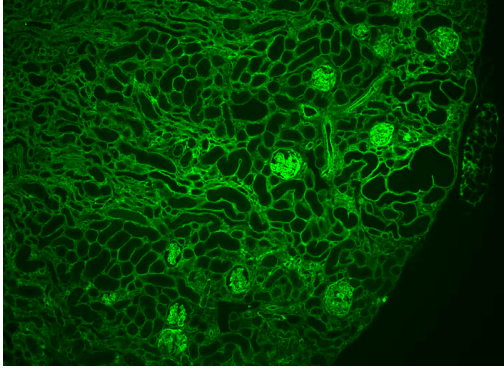
Score	Beschreibung	Beispielbild
0	Wenige bis keine Signalanreicherungen, Interstitium und Glomeruli zart sichtbar	
1	Fokale Fibrose im Interstitium mit vermehrter Signalanreicherung, einzelne Signalanreicherungen in den Glomeruli	
2	Zu Strängen konfluierende Fibroseareale, Verdrängung des Parenchyms, Verplumpung der Glomeruli	
3	Starke Vernarbung unter Aufhebung der Nierenparenchym-Morphologie, Tubuli kaum noch vorhanden, Glomeruli (fast) vollständig vernarbt	

Tabelle 4 **Laminin-Score mit Beispielbildern**

Score	Beschreibung	Beispielbild
0	Wenige bis keine Signalanreicherungen, Gefäße, Interstitium und Glomeruli zart sichtbar	
1	Fokale Fibroseinseln, vereinzelte Signalanreicherungen im Endothel und Bowman-Kapsel, Strukturen jedoch weiterhin gut abgrenzbar	
2	Diffuse Fibroseareale, unregelmäßige Verbreiterung des Interstitiums unter Verdrängung der Tubuli, weitere Verdickung von Endothel und Bowman-Kapsel, dadurch Abnahme des Raums zwischen Bowman-Kapsel und Gefäßknäuel	
3	Parenchym zu großen Teilen verdrängt, Strukturen nur noch schwer abgrenzbar, vollständige Glomerulosklerose, Raum zwischen Bowman-Kapsel und Gefäßknäuel nicht mehr sichtbar	

Laminin-Score (siehe Tabelle 4)

Durch das Anfärben von Laminin wurde Akkumulation von extrazellulärer Matrix sichtbar gemacht. Kam es zu einer vermehrten Signalanreicherungen, sprach dies für eine Verdickung der Basalmembran von Gefäßen, Tubuli und Glomeruli und fibrotischen Umbauprozessen.

2.8 Statistische Auswertung

Die erhobenen Daten wurden mit dem Statistikprogramm Graphpad Prism 8 (Version 8.4.3 (471)) statistisch ausgewertet und entsprechende Graphiken erstellt. Dabei wurde für normalverteilte Daten der t-Test und eine Varianzanalyse durchgeführt. Dies trifft für die Auswertung der Gewichte und der Konzentrationen für Cholesterin und Harnstoff zu. Für die anderen Daten wurden die entsprechenden nicht-parametrischen Tests verwendet: Mann-Whitney-Test und Kruskal-Wallis-Test. Eine Normalverteilung konnte für die Daten der Proteinurie, des Fibronectin-, Laminin- und des Scores der Leberverfettung weder mittels Test noch graphisch festgestellt werden, da die Datenmengen zu klein waren oder kein Nominalskalen-Niveau vorlag.

Die statistische Auswertung wurde nach Beratung durch Dr. Fabian Kück (Institut für Medizinische Statistik, Göttingen) angefertigt.

2.9 Materialien

2.9.1 Universal-Materialien

Tabelle 5 Geräte

Ausgießstation	Leica Biosystems Nussloch GmbH (Nussloch, Deutschland)
Axio Imager mit Axiocam 503 mono	Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)
BioDocAnalyze Digital Gel Documenta- tion System (UV-Transilluminator System)	Analytik Jena AG (Jena, Deutschland)
Biometra TProfessional Thermocycler	Analytik Jena AG (Jena, Deutschland)
Bio-Rad ChemiDoc™ MP Imaging System mit White Light Conversion Screen	Biorad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
CO2 Incubator MCO-19AIC	Panasonic Healthcare Co.,Ltd (Tokyo, Japan)
Duomax 1030 Plattformschüttler	Heidolph Instruments GmbH & CO. (Schwabach, Deutschland)
IKA RH basic Magnetrührer	IKA Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Deutschland)
Kryotom Jung cm 3000	Leica Biosystems Nussloch GmbH (Nussloch, Deutschland)
Kühlplatte	Leica Biosystems Nussloch GmbH (Nussloch, Deutschland)
Leica TP1020 Automatische Gewebe- infiltration	Leica Biosystems Nussloch GmbH (Nussloch, Deutschland)
Leica RM 2165 Microtome	Leica Biosystems Nussloch GmbH (Nussloch, Deutschland)
Microcomputer Electrophoresis Power Supply E741	Consort nv (Turnhout, Belgien)
MIKRO 200 R (Mikroliterzentrifuge)	Andreas Hettich GmbH & Co.KG (Tuttlingen, Deutschland)

Objektträger-Strecktisch (12801)	Medax GmbH & Co. KG (Neumünster, Deutschland)
Olympus Lichtmikroskop CX41	Olympus Corporation (Tokio, Japan)
Paraffin-Streckbad GFL 1052 (40 °C)	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel, Deutschland)
PowerPac™ HC Power Supply	Biorad (München, Deutschland)
Vortex Schüttler VF2	W. Krannichn GmbH + Co. KG (Göttingen, Deutschland)

Tabelle 6 **Programme**

cellSense Imaging Software	Olympus Corporation (Tokio, Japan)
EndNote X9.3.3 (Bld 15659)	Clarivate Analytics (Boston, Massachusetts, USA)
Fiji ImageJ (Version 2.1.0/1.53c)	https://imagej.net (Creative commons Zero license)
Graphpad Prism (Version 8.4.3)	Graphpad Software, LLC. (San Diego, Californien, USA)
Microsoft® Excel (Version 16.40)	Microsoft Corporation (Redmond, Washington, USA)
Microsoft® Word (Version 16.44)	Microsoft Corporation (Redmond, Washington, USA)
Zen 2.6 blue edition	Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)

Tabelle 7 **Universal-Chemikalien**

BSA (Bovines Serum Albumin) Fraction V	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	MERCK KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Emsure® ACS, ISO, Reag. Ph Eur Chloroform	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Emsure® ACS, ISO, Reag. Ph Eur Methanol	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Emsure® ACS, ISO, Reag. Ph Eur 2-Propanol	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol 99 % vollvergällt (ChemSolute)	Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen, Deutschland)
Kaliumchlorid (KCl)	Fluka Chemie GmbH CH-9471
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	MERCK KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl)	MERCK KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Paraformaldehyd	Sigma Chemical Co. (St- Louis, Missouri, USA)
Tris Pufferan® $\geq 99,9$ % p.a.	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Tabelle 8 **Weitere Universal-Materialien**

Einbettkassette-Universal	K. Lutz (Wertheim, Deutschland)
pH-Streifen Universalindikator	MERCK KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Reaktionsgefäße 1.6 ml verschiedene Farben	Biozym Biotech Trading GbmH (Wien, Österreich)
Microtome Blade Stainless Steel S35	Feather Safety Razor Co. (Osaka, Japan)
Thermo Scientific Menzel-Gläser Superfrost Plus Objektträger, 75x25 mm	Menzel GmbH & Co KG (Braunschweig, Deutschland)
Menzel-Gläser Deckgläser, unterschiedliche Größen	Menzel GmbH & Co KG (Braunschweig, Deutschland)

2.9.2 Uninephrektomie-Operation

Tabelle 9 **Material Uninephrektomie-Operation**

Augencreme Pan-Ophtal-Gel	Dr. Winzer Pharma GmbH (Berlin, Deutschland)
AutoClip® Kit	Fine Science Tools, Inc. (Foster City, California, USA)
Forene 100 % (V/V) Isofluran	AbbVie Deutschland GmbH (Ludwigshafen, Deutschland)
Hu-Friedy Faden (PSN 683S)	Perma Sharp
Monocryl Faden 4-0 (Y494)	Ethicon Inc. (Johnson & Johnson Medical GmbH) (Norderstedt, Deutschland)
UNO Gas Exhaust UNIT (Isoflurananlage)	UNO Roestvaststaal BV (Zevenaar, Niederlande)

2.9.3 Analgesie

Tabelle 10 **Material Analgesie**

NaCl 0,9% Injektionslösung 10 ml	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
Temgesic® Ampullen 5x 1 ml (Buprenorphin)	Indivior Inc. (North Chesterfield, Virginia, USA)
Vetalgin® 500mg/ ml Injektionslösung (Metamizol)	Intervet Deutschland GmbH (Unterschleißheim, Deutschland)

2.9.4 Ernährung

Tabelle 11 **Material Ernährung**

Nacktmaus Futter, gamma-bestrahlt V1244-727	ssniff Spezialdiäten GmbH (Soest, Deutschland)
Ratte/Maus-Haltung Futter V1534-000	ssniff Spezialdiäten GmbH (Soest, Deutschland)

2.9.5 Genotypisierung

Tabelle 12 **Material PCR**

COL4-forw (Primer)	Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
COL4-mutant (Primer)	Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
COL4-reverse (Primer)	Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
DirectPCR Lysis Reagent (Mouse Tail)	Viagen Biotech (Los Angeles, California, USA)
dNTP Set (100 mM) (Invitrogen)	Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, California, USA)
Pod3-for (Primer)	Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
Pod3-reverse (Primer)	Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
Proteinkinase K	VWR Life Science (Darmstadt, Deutschland)
TopTaq Master Mix Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)

Tabelle 13 **Material Gelelektrophorese**

Agarose	Biozym Scientific (Oldendorf, Deutschland)
Essigsäure 99-100 %	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Ethylendiamintetraessigsäure Tetranatriumsalz Tetrahydrat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
GeneRuler 100 bp DNA Ladder plus	Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, California, USA)

2.9.6 Semiquantitative Bestimmung der Proteinurie

Tabelle 14 **Material Chloroform-Methanol-Fällung**

2x Tris-Glycine SDS Sample Buffer (Invitrogen)	Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, California, USA)
10x NuPAGE Sample Reducing Agent (Invitrogen)	Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, California, USA)

Tabelle 15 **Material SDS-Page-Gelelektrophorese**

Hamilton™ 700 Serie Microliter™ #705	Hamilton Bonaduz AG (Bonaduz, Schweiz)
Novex™ Tris-Glycine-SDS Running Buffer (10x) (Invitrogen)	Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, California, USA)
Novex™ WedgeWell Tris-Glycine Gel (Invitrogen)	Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, California, USA)
ProSieve QuadColor Protein Marker, 4,6- 300 kDa	Lonza Rockland Inc. (Rockland, Maine, USA)
Roti-Blue 5x Konzentrat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
XCell SureLock™ Mini-Cell (Invitrogen) (Gelelektrophoreseapparatur)	Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, California, USA)

2.9.7 Bestimmung von Cholesterin und Harnstoff i.S.

Tabelle 16 **Material Bestimmung von Cholesterin und Harnstoff i.S.**

Einmalspritzen 1ml	Transoject (Neumünster, Deutschland)
Sterican Kanülen 0,55 x 25mm	B. Braun Meslungen AG (Melsungen, Deutschland)

2.9.8 Oil Red O-Leberfärbung

Tabelle 17 **Material Oil Red O-Leberfärbung**

Sucrose	Sigma Chemical Co. (St- Louis, Missouri, USA)
Hämatoxylin: Hämaulanlösung sauer nach Mayer	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
OCT Embedding Matrix	CellPath Ltd. (Newtown, Großbritannien)
Oil Red O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland)
Papierfilter, 1/2 gefaltet, Grade 597, 150 mm	Whatman GmbH (Dassel, Deutschland)
Shandon™ Immu-Mount™	Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, California, USA)

2.9.9 Immunhistochemie

Tabelle 18 **Material Fibronectin-Färbung**

Anti-Fibronectin antibody (ab2413)	Abcam plc (Cambridge, Großbritannien)
Dako Proteinase K (S3004)	Dako GmbH (Jena, Deutschland)
Emsure® ACS, ISO, Reag. Ph Eur Salzsäure rauchend	Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen, Deutschland)
Fluoreszenz Mounting Medium	Dako GmbH (Jena, Deutschland)
Goat IgG anti-rabbit IgG (H+L)-Cy3, MinX Hu,Ms,Rt	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd (Camebridgeshire, Großbritannien)
Natriumchlorid 150 mM	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Tris-Base (M= 121,14 g/mol)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Tris Pufferan® ≥ 99,9 % p.a.	
Tris 50 mM (Tris Pufferan® ≥ 99,9 % p.a.)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Xylol z. A., ACS, ISO, Ph. Eur. (Isomerengemisch, min. 99,0 %) (ChemSolute®)	Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen, Deutschland)

Tabelle 19 **Material Laminin-Färbung**

Anti-Laminin antibody (ab11575) (Rb pAb to Laminin Ab 11575 rabbit IgG)	Abcam plc (Cambridge, Großbritannien)
(A-11008) Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbes Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (Invitrogen)	Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, California, USA)

3 Ergebnisse

3.1 Metabolische Veränderungen

3.1.1 Gewicht

Die Gewichte der Mäuse der NEPH- und der Fett-Gruppe wurden postoperativ wöchentlich erhoben und analysiert. Die Mäuse der Fett-Gruppe erhielten ab dem siebten postoperativen Tag eine fettreiche Diät.

Das durchschnittliche Gewicht der NEPH-Gruppe lag am OP-Tag bei $27,16 \text{ g} \pm 3,68 \text{ g}$ ($\pm \text{SD}$), bei den Mäusen der Fett-Gruppe bei $25,45 \text{ g} \pm 3,03 \text{ g}$ ($\pm \text{SD}$). In jeder Gruppe wurden die Gewichte von sechs Mäusen zu je drei Weibchen und drei Männchen betrachtet. Um den individuellen Gewichtsunterschiede einzelner Mäuse nicht mit einzubeziehen, wurden die prozentualen Gewichtsänderungen ausgehend vom Gewicht am OP-Tag ermittelt. Am achten postoperativen Tag zeigten beide Gruppen einen Gewichtsverlust von ca. 6 % (NEPH-Gruppe: $-6,33 \% \pm 3,10 \%$ ($\pm \text{SD}$), Fett-Gruppe: $-6,19 \% \pm 4,7 \%$ ($\pm \text{SD}$)). Nach zwei und nach sechs Wochen hochkalorischer Ernährung konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden, weder absolut noch prozentual betrachtet. Am Ende des Experiments hatten die Mäuse der NEPH-Gruppe ihr ursprüngliches OP-Gewicht wieder erreicht (Prozentuale Gewichtsänderung im Vergleich zum OP-Gewicht: $-0,01 \% \pm 4,35 \%$ ($\pm \text{SD}$)). Die Mäuse der Fett-Gruppe hatten im Vergleich zu ihrem OP-Gewicht im Schnitt $3,1 \% \pm 9,0 \%$ ($\pm \text{SD}$) zugenommen. In den letzten zwei Wochen des Experiments zeigte sich jedoch ein stärkerer Anstieg des Gewichts in der Fett-Gruppe (siehe Abbildung 6 und Abbildung 7). Der Unterschied zur NEPH-Gruppe war nicht signifikant. Insgesamt stellte sich kein Übergewicht durch die fettreiche Ernährung ein.

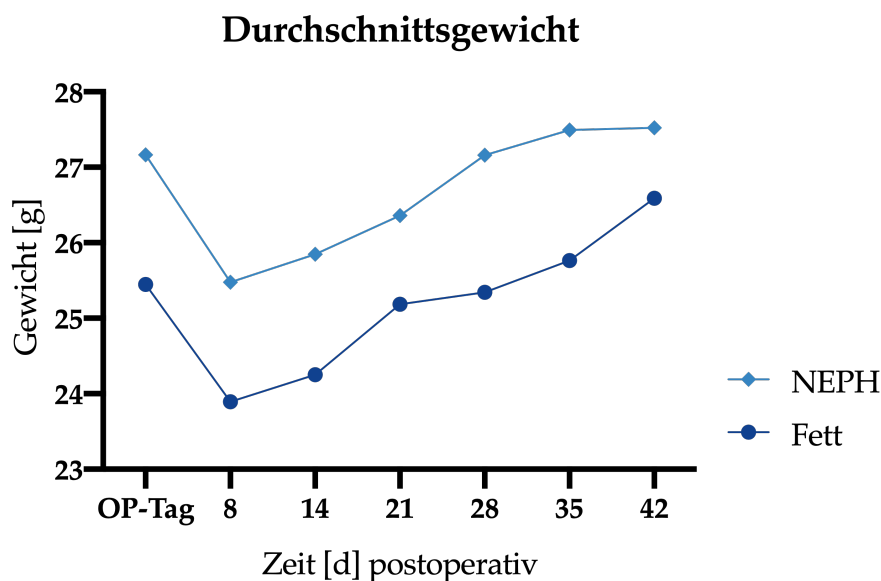


Abbildung 6 **Durchschnittliches Gewicht im postoperativen Verlauf**

Zur Veranschaulichung wurden nur die Mittelwerte der Gewichte aller Genotypen zusammengefasst. Das durchschnittliche Gewicht der Fett-Gruppe lag konsequent unterhalb des der NEPH-Gruppe, zeigt jedoch zum Ende hin eine stärker steigende Tendenz als das der NEPH-Gruppe.

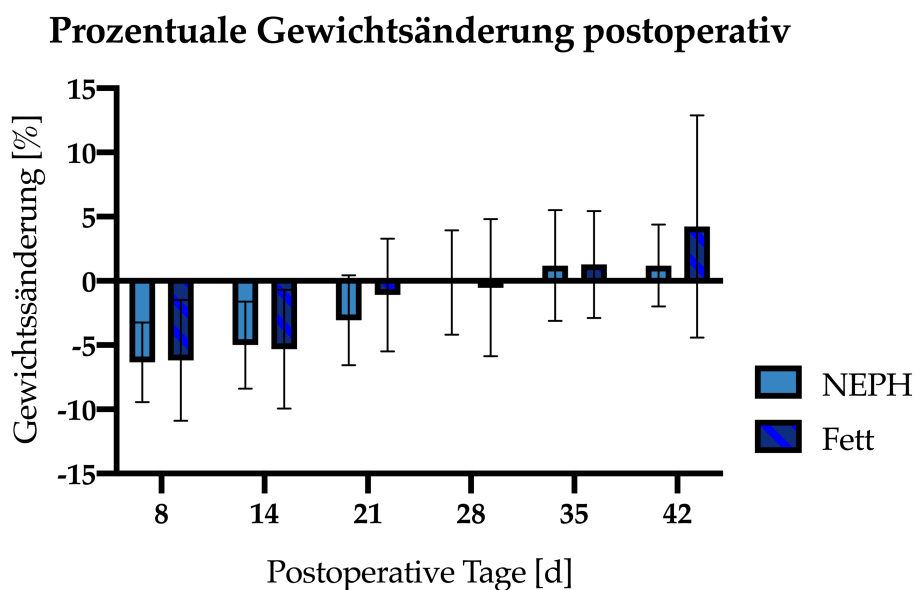


Abbildung 7 **Prozentuale Gewichtsänderung im postoperativen Verlauf**

Es wurde die prozentuale Gewichtsänderung in Relation zum Gewicht am OP-Tag errechnet. Dargestellt sind hier die Mittelwerte mit Standardabweichungen. Auch hier zeigt sich zum Ende des Beobachtungszeitraums, dass das Gewicht der Fett-Mäuse tendenziell stärker steigt als das der NEPH-Mäuse. Der Unterschied ist jedoch nicht signifikant.

3.1.2 Cholesterin im Serum

Cholesterin ist ein Lipid, das zum Teil über die Nahrung, zum Teil vom Körper selbst produziert wird. Es ist u. a. Bestandteil von Zellmembranen und Hormonen. Eine erhöhte Cholesterin-Konzentration im Blut (Hypercholesterinämie) ist ein Risikofaktor für die Entstehung von Atherosklerose, was sekundär zu thrombotischen Gefäßverschlüssen führen kann. Eine Hypercholesterinämie gehört zu den Dyslipidämien und ist Bestandteil des metabolischen Syndroms.

Bei den ca. 180 Tagen alten Mäusen wurde nach kraniozervikaler Dislokation sofort das Herz punktiert und eine Blutprobe gewonnen. Die Cholesterin-Konzentration i. S. wurde durch die klinische Chemie der Universitätsmedizin Göttingen bestimmt.

Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der Kontroll- und der Fett-Gruppe. Die durchschnittliche Cholesterin-Konzentration der SHAM-Gruppe lag bei 94,33 mg/dl \pm 7,52 mg/dl (\pm SD), die der NEPH-Gruppe bei 100,1 mg/dl \pm 7,15 mg/dl (\pm SD). Die Fett-Gruppe unterschied sich mit 122,9 mg/dl \pm 21,62 mg/dl (\pm SD) mit einem p-Wert von $<0,0001$ von der SHAM-Gruppe und mit einem p-Wert von 0,0188 von der NEPH-Gruppe. Es konnte weder zwischen der SHAM- und der NEPH-Gruppe, noch zwischen den einzelnen Genotypen der einzelnen Gruppen ein signifikanter Unterschied gezeigt werden (siehe Abbildung 8).

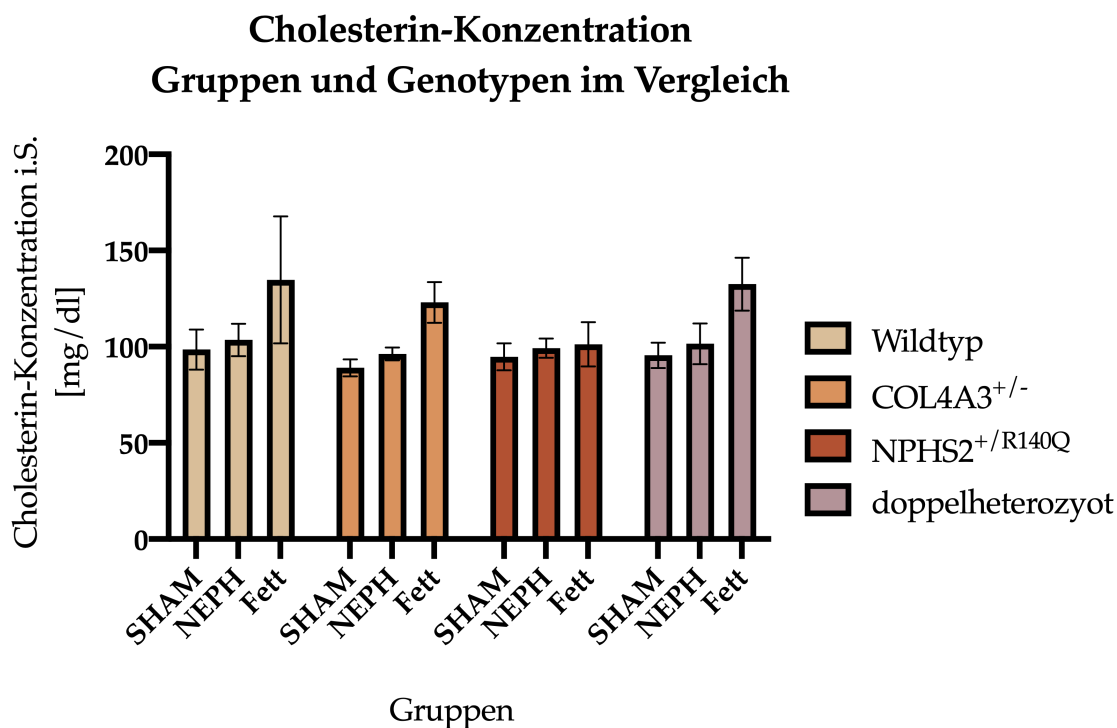


Abbildung 8 Cholesterin-Konzentration i.S. Übersicht

Es wurde die durchschnittliche Cholesterin-Konzentration i. S. mit Standardabweichung dargestellt.

3.1.3 Fettleber-Scoring

Die Konzentration von Triglyzeriden und freien Fettsäuren wird über die Nahrung und die körpereigene Synthese beeinflusst. Durch eine Hyperlipidämie, wie es u. a. im Rahmen des metabolischen Syndroms vorkommt, kann es zu einer Verfettung der Leber kommen. Die Hepatozyten lagern Lipide in Form von Fettvakuolen ein. Nach und nach wird das Leberparenchym durch Fettgewebe ersetzt. Das Krankheitsbild wird NAFLD oder auch Steatosis hepatis genannt.

Durch die Oil-Red-O-Färbung wurden die Fettvakuolen deutlich sichtbar rot angefärbt. Die histologischen Leberschnitte zeigten jedoch keine ausgeprägte Steatose. Der Flächenanteil des Fettvakuolen lag bei allen Bildern unter 5 %, sodass immer der Score 0 vorlag.

Auch die Auswertung des Verteilungsmusters zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen der NEPH- und der Fett-Gruppe. Der Median der NEPH-Gruppe lag bei 1 (25. Perzentile: 1,0; 75. Perzentile: 2,0), der der Fett-Gruppe bei 1,5 (25. Perzentile: 1,0; 75. Perzentile: 2,0). Auch zwischen den Genotypen konnte in den jeweiligen Gruppen kein Unterschied festgestellt werden.

Des Weiteren wurde die Qualität der Fettvakuolen in mikro-, medi- und makrovesikulär eingeteilt. Sowohl die Mäuse der NEPH-Gruppe als auch die Mäuse der Fett-Gruppe zeigten nur mikro- bis medivesikuläre Fettvakuolen. Makrovesikuläre Fettvakuolen, wie sie für eine NAFLD typisch wären, wurden nicht beobachtet.

Wie in Abbildung 9 beispielhaft bei Wildtyp-Mäusen zu sehen ist, ist die Leberverfettung keinem festen Schema untergeordnet. Unabhängig von der Ernährung zeigen einige Mäuse eine stärkere Fetteinlagerung als andere. Bei allen gezeigten Beispielbildern besteht keine NAFLD. Der Grad der Verfettung lag im physiologischen Bereich. Das typische Bild einer NAFLD in Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung ist in Abbildung 10 zu sehen.

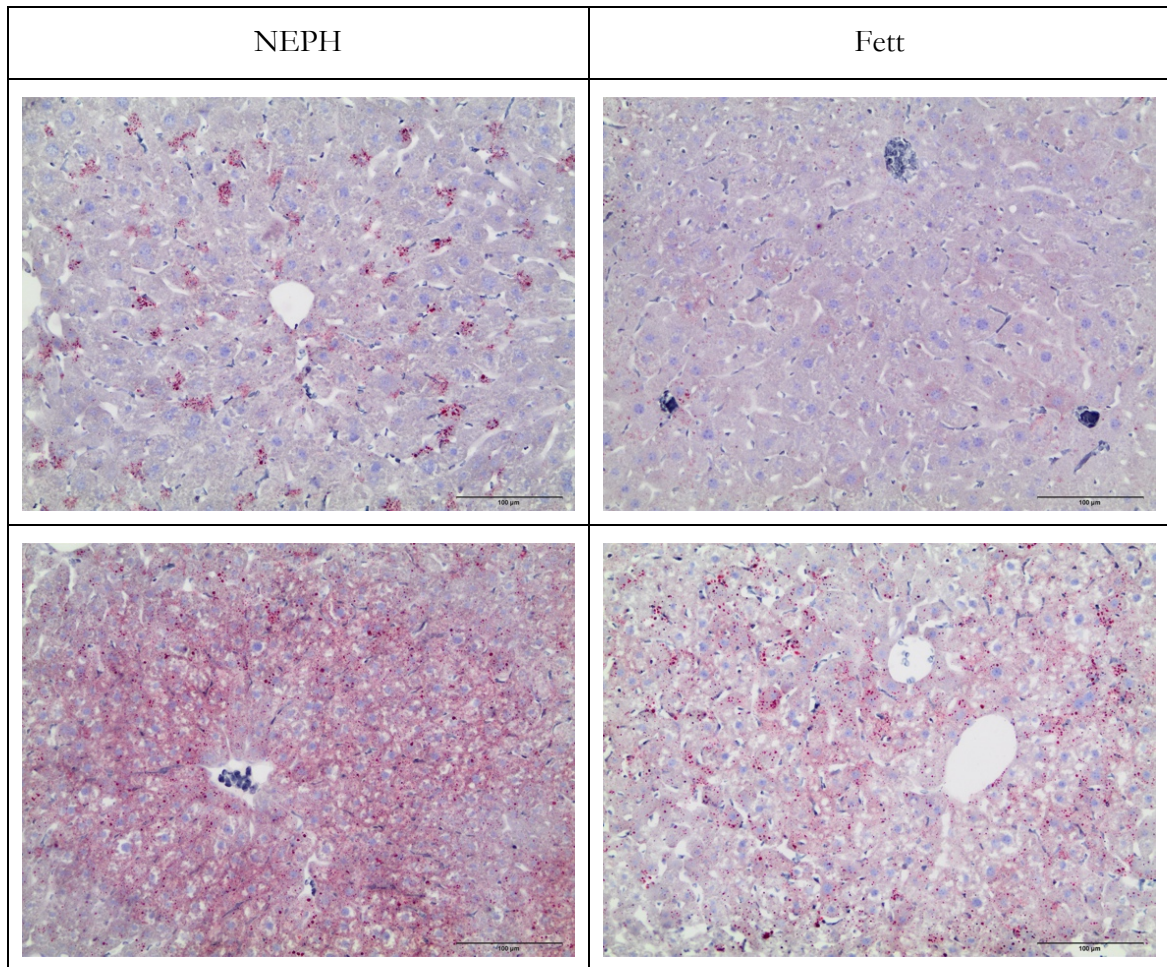


Abbildung 9 **Übersicht von oil-red-o-gefärbten Leberschnitte von Wildtyp-Mäusen**

Oben links: schwache und fokale Steatose einer männlichen Wildtyp-Maus der NEPH-Gruppe. **Unten links:** diffus verteilte mikro- bis medivesikuläre Fettvakuolen bei einer weiblichen Wildtyp-Maus der NEPH-Gruppe. **Oben rechts:** kaum sichtbar angefärbte rote Fettvakuolen einer männlichen Wildtyp-Maus der Fett-Gruppe. **Unten rechts:** ähnlichen wie im oberen linken Bild fokale Verfettungen mit mikro- bis medivesikulären Fettvakuolen einer weiblichen Wildtyp-Maus der Fett-Gruppe

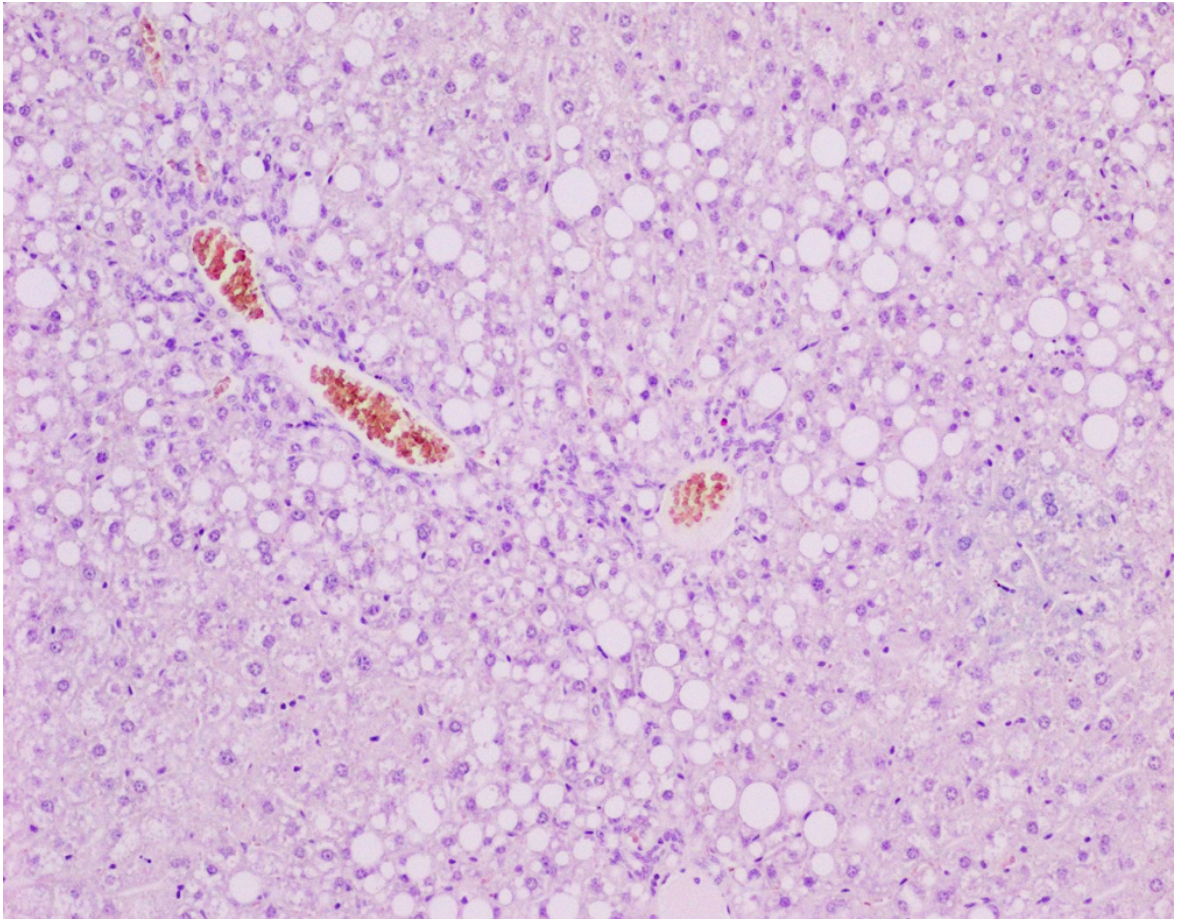


Abbildung 10 Typisches Bild einer NAFLD in HE-Färbung

Fettvakuolen werden während der HE-Färbung ausgewaschen und stellen sich deshalb als weiße, runde Formationen dar. In der Oil-Red-O-Färbung wären die leeren Fettvakuolen rot angefärbt. Das Bild zeigt größtenteils eine medi- bis makrovesikuläre Verfettung der Hepatozyten. Zum Teil befindet sich der Zellkern nicht mehr im Zentrum der Zelle, sondern wird durch die Fetteinlagerung verdrängt. Das Bild wurde freundlicherweise von Umair Latif, PhD aus der AG Ellenrieder der Klinik für Gastroenterologie, gastrointestinale Onkologie und Endokrinologie der Universitätsmedizin Göttingen zu Verfügung gestellt.

3.2 Auswirkungen auf die Nierenfunktion

3.2.1 Proteinurie

Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen einer fettreichen Ernährung auf den Verlauf des Alport-Syndroms bei heterozygoten Anlageträgern zu untersuchen. Das Ausmaß der Proteinurie lässt dabei auf die Lokalisation der Nierenschädigung rückschließen. Während das Auftreten von großen Proteinen, wie Albumin und größer, eher für einen glomerulären Schaden spricht, tauchen bei einem tubulären Schaden vermehrt kleinere Proteine als Albumin im Urin auf.

Vergleich der Geschlechter

Männliche und weibliche Mäuse zeigen von Natur aus eine unterschiedliche Zusammensetzung und Konzentration von den Proteinen, die im Urin enthaltenen sind. In dem Urin von männlichen Mäusen sind mehr von sogenannten *Major urinary proteins* (MUP) enthalten. Sie sind u. a. wichtig für Territorial-, Sexualverhalten und Kommunikation (Finlayson et al. 1965; Logan et al. 2008).

Bis auf die COL4A3^{+/-}-Mäuse zeigten die Mäuse im Alter von 120 Tagen signifikante Unterschiede in der Proteinurie zwischen Männchen und Weibchen ($p < 0,0001$). Der Median der relativen Gesamtproteinurie lag genotyp-unabhängig bei den Weibchen bei 1,08 (25. Perzentile: 0,862, 75. Perzentile: 1,583) und bei den Männchen bei 3,405 (25. Perzentile: 1,913, 75. Perzentile: 4,253) (siehe Abbildung 11 und Abbildung 12).

Relative Gesamtproteinurie

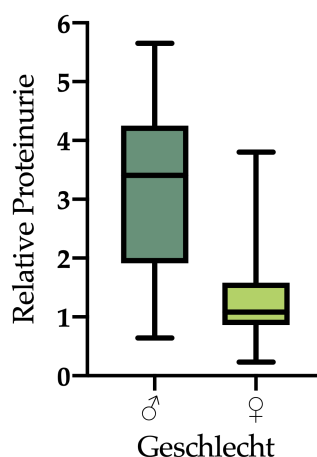


Abbildung 11 **Geschlechtervergleich der Gesamtproteinurie um den 120. Lebenstag**

Es wurde die Gesamtproteinurie genotyp-unabhängig um den 120. Lebenstag untersucht. Die Proteinurie der Männchen lag signifikant höher als die der Weibchen ($p < 0,0001$). Männchen (♂): Median 3,405, Minimum 0,64, Maximum 5,65, 25. Perzentile 1,913, 75. Perzentile 4,253; Weibchen (♀): Median 1,08, Minimum 0,23, Maximum 3,8, 25. Perzentile 0,862, 75. Perzentile: 1,583.

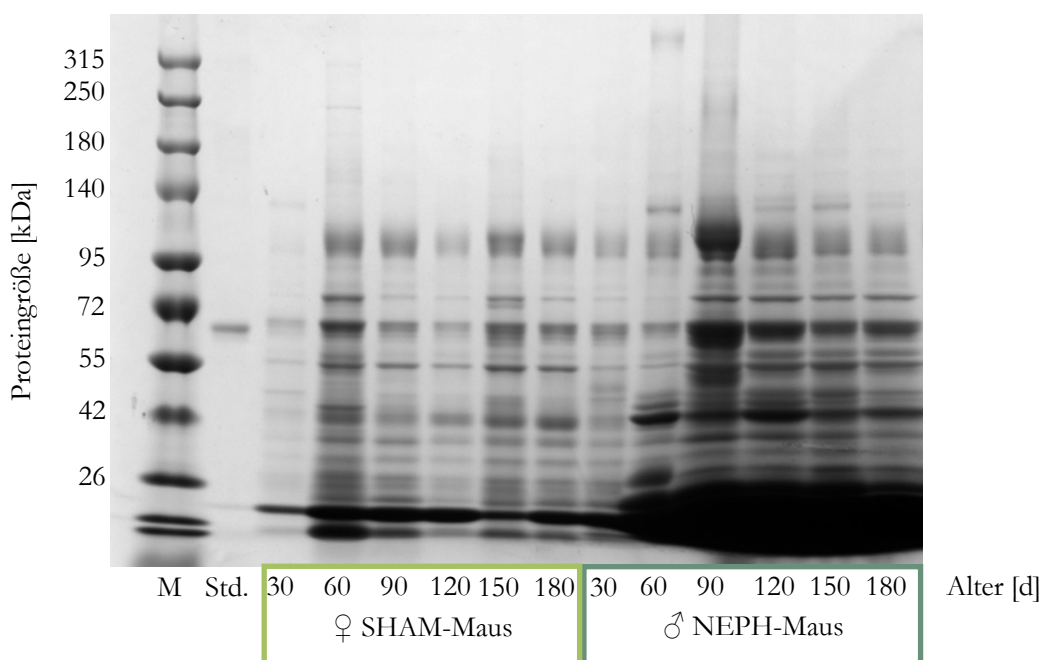


Abbildung 12 **Beispiel eines Protein-Gels, Geschlechtervergleich**

Es wurden die Urinproben einer weiblichen SHAM-Maus und einer männlichen NEPH-Maus im 30-Tage Intervall (30. bis 180. Lebenstag) aufgetragen. Vor allem die Albuminbanden (ca. bei 66 kDa) und die Banden der Proteine, die kleiner als Albumin sind, sind bei der männlichen Maus deutlich stärker beladen. Marker (M). BSA-Standard(-Std.) 300 ng.

Der geschlechtsspezifische Unterschied wurde in der weiteren Auswertung berücksichtigt und Männchen und Weibchen sowohl getrennt als auch zusammen betrachtet. In Abbildung 13 sind nochmal alle Proteinbanden nach Genotyp und Geschlecht getrennt graphisch dargestellt.

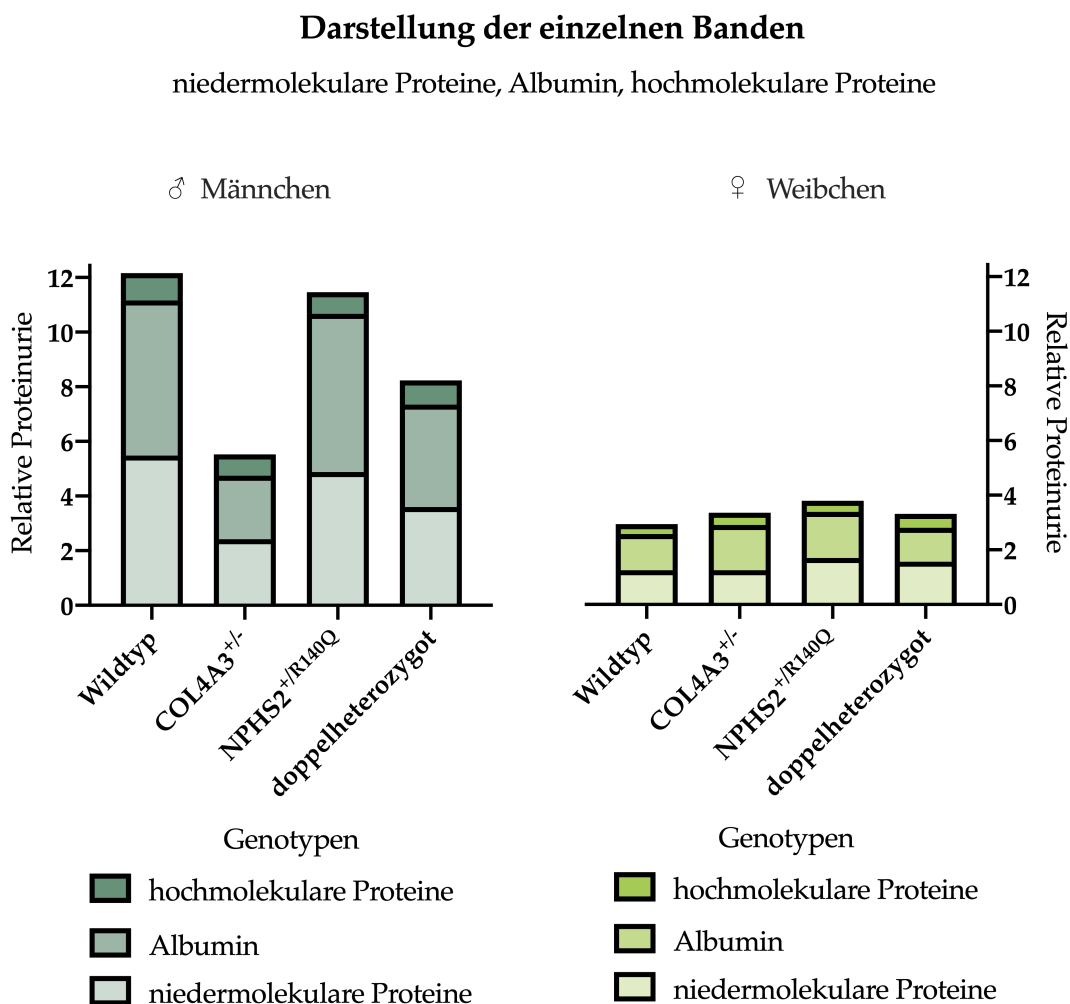


Abbildung 13 **Detaillierte Darstellung der Gesamtproteinurie um den 120. Lebensstag**

Die Median-Werte der einzelnen Banden (Niedermolekulare, Albumin- und hochmolekulare Bande) wurden additiv nach Genotyp und Geschlecht aufgetrennt dargestellt. Das Vorgehen der Gel-Auswertung wurde beispielhaft in Abbildung 3 dargestellt. Insgesamt liegt die relative Gesamtproteinurie der Männchen deutlich über der der Weibchen. Dies trifft vor allem für die Albuminbande und die niedermolekularen Proteine zu. Ein Zusammenhang zwischen Höhe der Proteinurie und Genotyp lässt sich bei beiden Geschlechtern nicht feststellen.

Vergleich der Genotypen

Die erhobenen Daten ergaben keinen signifikanten Unterschied in der Gesamtproteinurie im Alter von 60 bis 120 Tagen zwischen den Genotypen (siehe Abbildung 14). Dabei wurden sowohl Männchen und Weibchen getrennt, als auch zusammen betrachtet. Der Median der 120

Tage alten Wildtyp-Mäuse lag bei 2,105 (25. Perzentile: 0,855, 75. Perzentile: 4,503), der der *COL4A3*^{+/-}-Mäuse bei 1,26 (25. Perzentile: 1,138, 75. Perzentile: 2,43), der der *NPHS2*^{+/*R140Q*}-Mäuse bei 2,515 (25. Perzentile: 0,97, 75. Perzentile: 4,048) und der der doppelheterozygoten Mäuse bei 2,32 (25. Perzentile: 1,735, 75. Perzentile: 2,735).

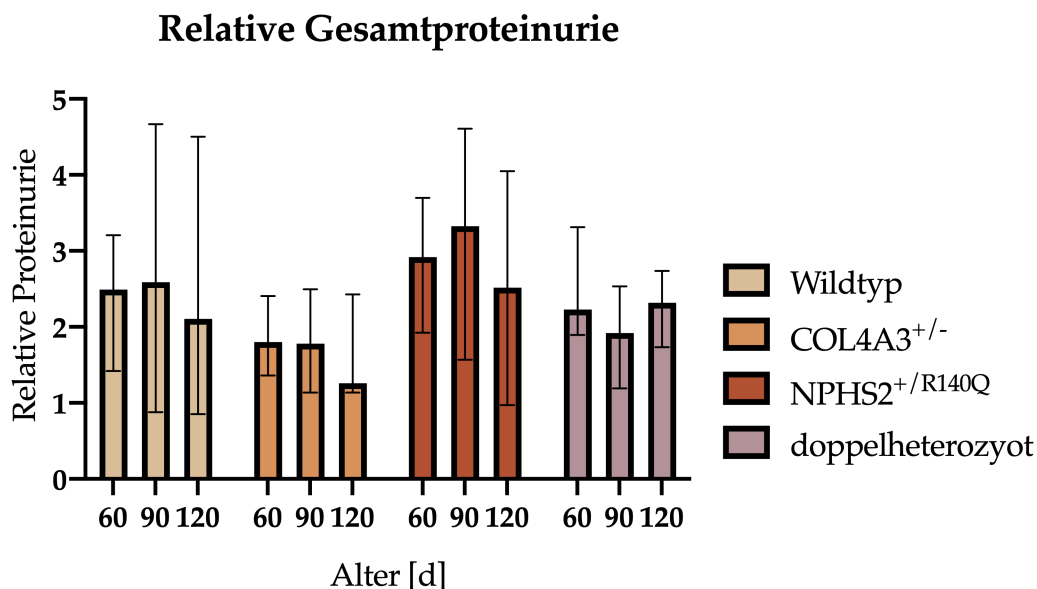


Abbildung 14 **Genotypvergleich der relativen Gesamtproteinurie**

Es wurde der präoperative Zeitraum 60 bis 120 Tage betrachtet. In diesem Fall wurden Männchen und Weibchen zusammengefasst. Dargestellt ist der Median mit der 25. Und 75. Perzentile. Zu keinem Zeitpunkt lag ein signifikanter Unterschied in einem der Gruppen vor. Außerdem kam es zu keiner erkennbaren Dynamik im zeitlichen Verlauf.

Vergleich der Kontrollgruppen SHAM und NEPH

Um die Auswirkung der Uninephrektomie auf die Funktion der verbliebenen Niere beurteilen zu können, wurde die Proteinurie der SHAM- und der NEPH-Gruppe im Alter von 150 und 180 Tagen untersucht. Es konnte kein signifikanter Anstieg der Gesamtproteinurie nach Uninephrektomie festgestellt werden (siehe Abbildung 15). Es ergaben sich auch keine Unterschiede bezüglich des Genotyps und der Proteingröße. Männchen und Weibchen wurden sowohl separat als auch zusammen betrachtet.

Für alle Genotypen zusammengefasst lag der Median der relativen Gesamtproteinurie der SHAM-Gruppe bei 1,405 (25. Perzentile: 0,95, 75. Perzentile: 3,588) für 150 Tage und für 180 Tage bei 1,865 (25. Perzentile: 1,088, 75. Perzentile: 3,178) In der NEPH-Gruppe lag der Wert für 150 Tage bei 2,495 (25. Perzentile: 0,943, 75. Perzentile: 4,145) und für 180 Tage 2,105 (25. Perzentile: 1,08, 75. Perzentile: 3,513).

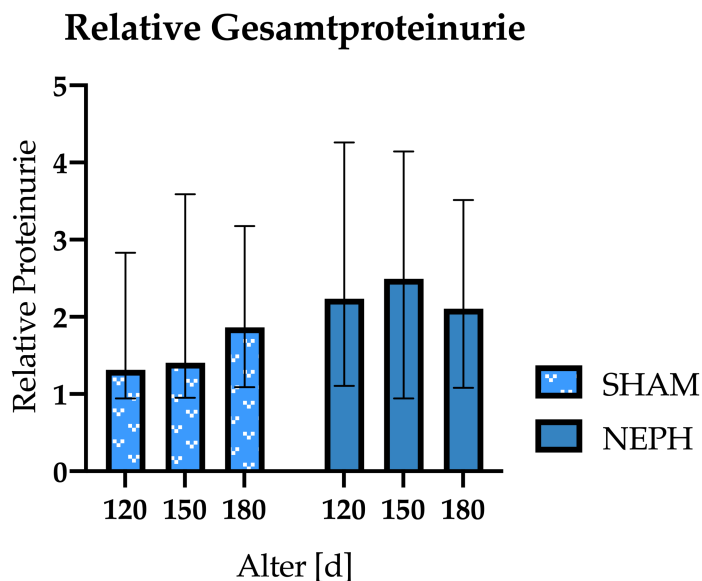


Abbildung 15 **Vergleich der Gesamtproteinurie der SHAM- und NEPH-Gruppe**

Es wurden die Mediane mit dem jeweiligen Interquartilbereich dargestellt. Zur besseren Übersicht wurden die Genotypen zusammengefasst. Die Uninephrektomie um den 138. Lebenstag in der NEPH-Gruppe beeinflusste die relative Proteinurie nicht, sodass sich kein signifikanter Unterschied zur Kontroll-Gruppe (SHAM) ergab.

Vergleich der NEPH- und der Fett-Gruppe

Bisher konnte gezeigt werden, dass zwar signifikante Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Mäusen in der Proteinurie auftraten, der Genotyp und die Uninephrektomie jedoch keinen wesentlichen Einfluss hatten.

Es ist bereits bekannt, dass Übergewicht den Metabolismus verändert und ein Risikofaktor für die Entstehung einer chronischen Niereninsuffizienz ist. Daher war eine Alternativhypothese, dass bei den Mäusen, die fettreich ernährt wurden, die Proteinurie höher läge als bei der NEPH-Gruppe.

Die Daten zeigten weder im Alter von 150 Tagen, noch im Alter von 180 Tagen einen signifikanten Unterschied zwischen der Fett- und der NEPH-Gruppe. Die mediane Gesamtproteinurie (Männchen und Weibchen zusammengefasst) im Alter von 150 Tagen lag in der NEPH-Gruppe bei 2,495 (25. Perzentile: 0,943, 75. Perzentile: 4,145) und im Alter von 180 Tagen bei 2,105 (25. Perzentile: 1,08, 75. Perzentile: 3,513). Die relative Gesamtproteinurie der Fett-Gruppe lag zum Teil sogar leicht unterhalb der NEPH-Gruppe. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Die mediane Gesamtproteinurie der Fettgruppe lag im Alter von 150 Tagen bei 2,145 (25. Perzentile: 0,92, 75. Perzentile: 3,698) und im Alter von 180 Tagen bei 2,22 (25. Perzentile: 0,693,

75. Perzentile: 3,993). Auch bei der einzelnen Betrachtung von Männchen und Weibchen und der Größe der Proteine (niedermolekulare Proteine, Albuminbande und hochmolekulare Proteine) konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

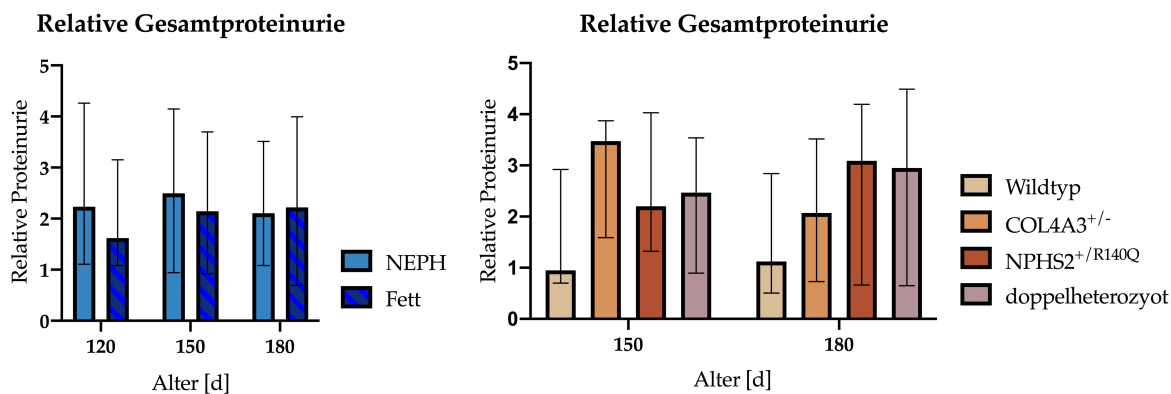


Abbildung 16 **Vergleich der Gesamtproteinurie der NEPH- und Fett-Gruppe**

Es wurden die Mediane mit dem jeweiligen Interquartilbereich dargestellt. **Links:** Die fettreiche Diät zeigte im Vergleich zur Kontroll-Gruppe (NEPH) keine Auswirkung auf die relative Gesamtproteinurie. Eine zeitliche Dynamik war nicht zu erkennen. **Rechts:** Darstellung der einzelnen Genotypen der Fett-Gruppe. Nach dem Beginn der hochkalorischen Diät konnten zwischen den Genotypen weder im Alter von 150 Tagen, noch im Alter von 180 Tagen, ein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

3.2.2 Harnstoff im Serum

Harnstoff ist ein finales Abbauprodukt des Aminosäuren-Stoffwechsels. Er entsteht in den Mitochondrien aus Ammoniak und wird größtenteils renal ausgeschieden. In der Klinik wird Harnstoff i. S. als Verlaufsparemeter für die Nierenfunktion verwendet.

Bei den ca. 180 Tagen alten Mäusen wurde sofort nach der kraniozervikalen Dislokation eine Blutprobe durch Punktion des Herzens entnommen. Die Harnstoff-Konzentration i. S. wurde durch die klinische Chemie der Universitätsmedizin Göttingen bestimmt.

Die Harnstoff-Konzentrationen unterschieden sich zwischen den Gruppen SHAM, NEPH und Fett signifikant. Die durchschnittliche Konzentration der SHAM-Gruppe lag bei 22,94 mg/dl \pm 3,4 mg/dl (\pm SD), die der NEPH-Gruppe bei 32,81 mg/dl \pm 5,01 mg/dl (\pm SD) und die der Fett-Gruppe bei 42,12 mg/dl \pm 6,72 mg/dl (\pm SD) (p-Wert für SHAM/NEPH-, SHAM/Fett- und NEPH/Fett-Vergleich jeweils $<$ 0,0001). Die Harnstoff-Konzentration der Fett-Gruppe war um ca. 84 % höher als die der SHAM-Gruppe und ca. 28 % über der der NEPH-Gruppe. Die Uninephrektomie führte also zu einem Anstieg der Harnstoff-Konzentration i. S.. Dieser Effekt wird durch die hochkalorische Ernährung der Mäuse der Fett-Gruppe noch verstärkt.

Ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Genotypen wurde nicht beobachtet (siehe Abbildung 17).

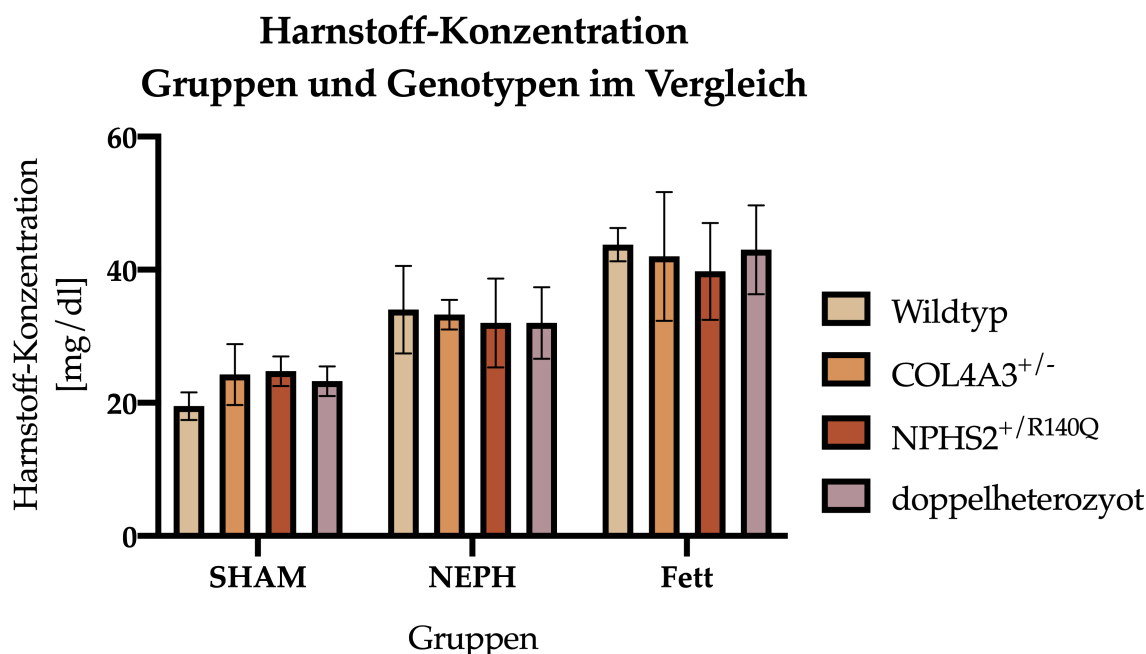


Abbildung 17 **Harnstoff-Konzentration i.S. Übersicht**

Es wurde die durchschnittliche Harnstoff-Konzentration i. S. mit Standardabweichung dargestellt.

3.2.3 Histologische Veränderungen

Im Verlauf des Alport Syndroms kommt es mit Fortschreiten der Niereninsuffizienz zu einer Vernarbung des Nierenparenchyms (Nierenfibrose) und der Glomeruli (Glomerulosklerose). Durch immunhistochemische Anfärbung von Fibronektin und Laminin konnten strukturelle Veränderungen in der Niere sichtbar gemacht werden. Dabei wurden die in Paraffin eingebetteten Nieren der NEPH- und Fett-Gruppe der 180 Tage alten Tiere verwendet.

3.2.3.1 Fibronektin-Score

Fibronektin ist ein Protein der extrazellulären Matrix und wird vermehrt bei fibrotischen Umbauprozessen abgelagert. Je mehr Fibronektin angefärbt wird, desto höher ist der Fibrosegrad. Es wurden Bilder in zehnfacher als auch in 40-facher Vergrößerung beurteilt.

Es ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen der NEPH- und der Fett-Gruppe in der zehnfachen Vergrößerung. Die Mäuse der Fett-Gruppe wurden in der zehnfachen Vergrößerung für die COL4A3^{+/-}- Mäuse ($p = 0,0007$), die NPHS2^{+ / R140Q}-Mäuse ($p < 0,0001$) und die doppelheterozygoten Mäuse ($p < 0,0001$) höher gescort als die Mäuse der NEPH-Gruppe. Lediglich die Wildtyp-Mäuse beider Gruppen unterschieden sich nicht signifikant.

Auch die unterschiedlichen Genotypen innerhalb der Fett-Gruppe unterschieden sich signifikant voneinander. Die *NPHS2*^{+/*R140Q*}- (p = 0,0267) und die doppelt-heterozygoten Mäuse (p = 0,0005) erreichten einen signifikant höheren Score als die Wildtyp-Mäuse. Außerdem zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den *COL4A3*^{+/-}- und den doppelheterozygoten Mäusen (p = 0,0102).

In der 40-fachen Vergrößerung wurde vor allem die Vernarbung der Glomeruli beurteilt. Hier zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie in der zehnfachen Vergrößerung. Es ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen der NEPH- und Fett-Gruppe bei den Wildtyp- (p = 0,0465), der *NPHS2*^{+/*R140Q*}- (p < 0,0001) und den doppelheterozygoten Mäusen (p < 0,0001). Innerhalb der Fett-Gruppe zeigte sich nur zwischen den *NPHS2*^{+/*R140Q*}- (p = 0,0029) und den doppelheterozygoten Mäusen (p = 0,0014) im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen ein signifikanter Unterschied.

Die genauen Werte können der Tabelle 20 und Tabelle 21 entnommen werden. Abbildung 18 stellt den Fibronectin-Score nach Gruppe und Genotyp aufgetrennt, graphisch dar, jeweils in zehnfacher und 40-facher Vergrößerung.

Somit provozierte eine hochkalorische Ernährung in Zusammenhang mit einem heterozygoten *R140Q*-Polymorphismus mit und ohne heterozygoter *COL4A3*-Mutation eine Fibrosierung des Nierenparenchyms.

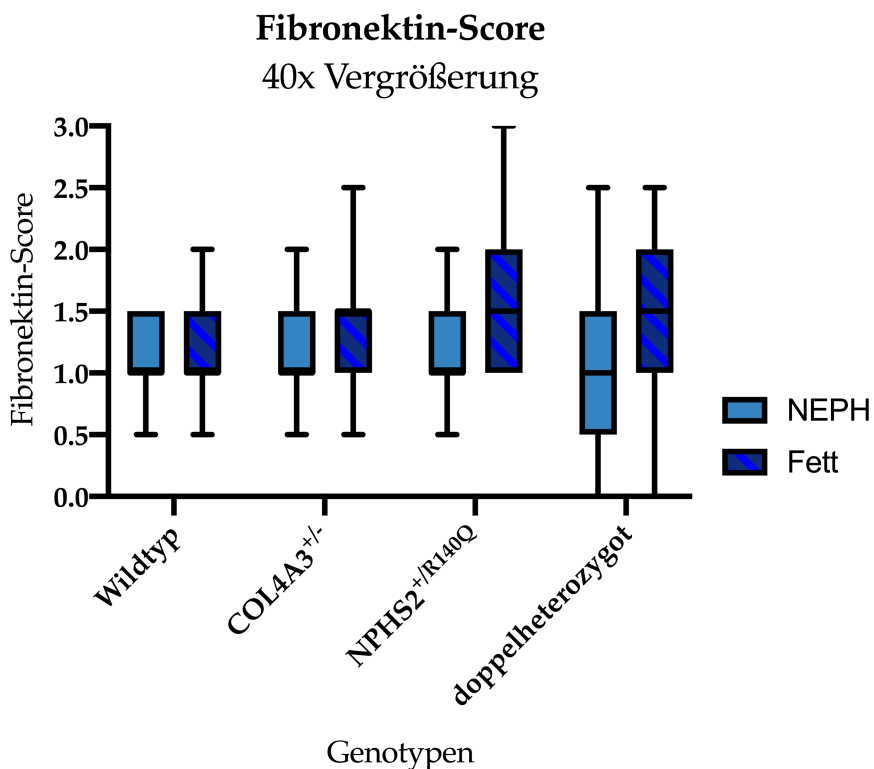
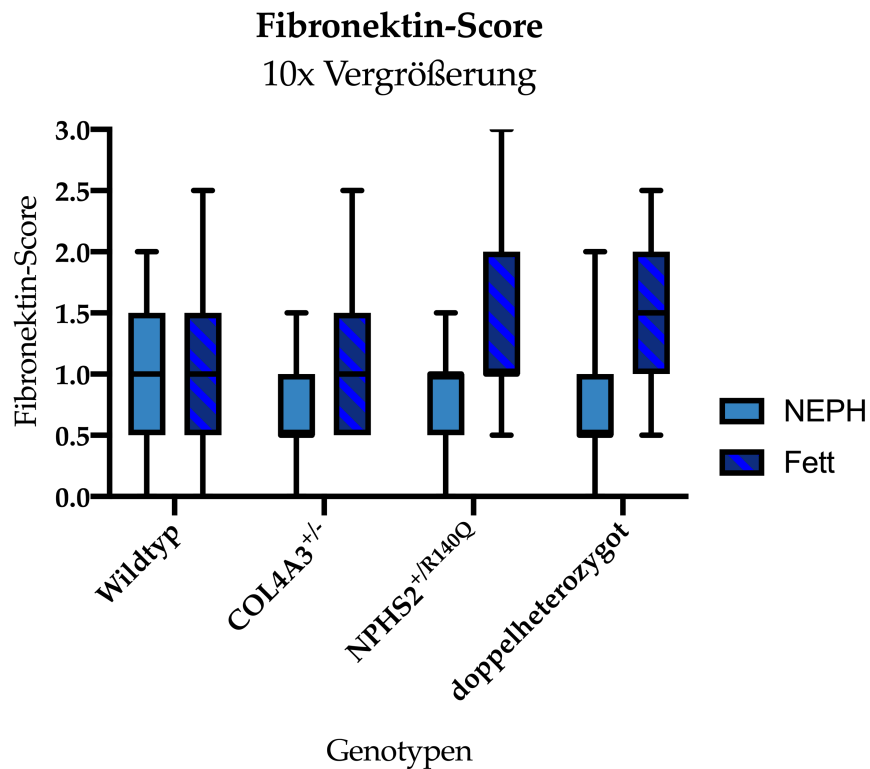


Abbildung 18 **Fibronektin-Score Übersicht**

Oben: Vergleich des Fibronektin-Scores nach Genotypen und Gruppen (NEPH und Fett) unterteilt in der zehnfachen Vergrößerung. **Unten:** Vergleich des Fibronektin-Scores nach Genotypen und Gruppen (NEPH und Fett) unterteilt in der 40-fachen Vergrößerung.

Tabelle 20 Wertetabelle des Fibronektin-Scores, NEPH/Fett-Vergleich

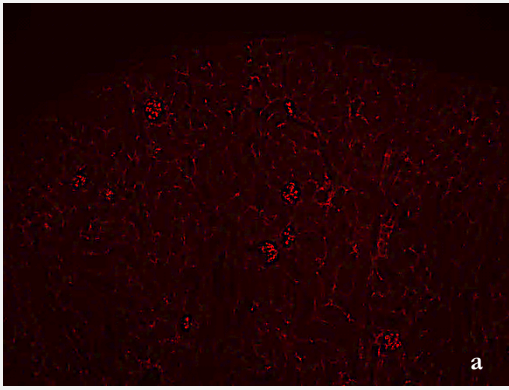
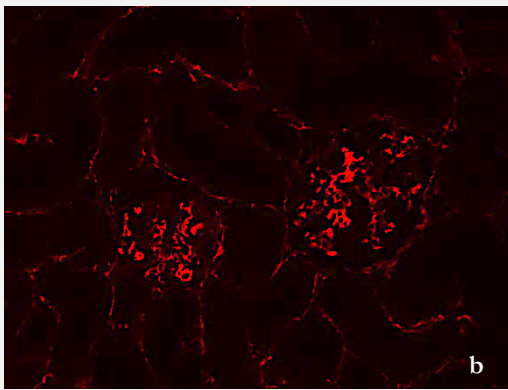
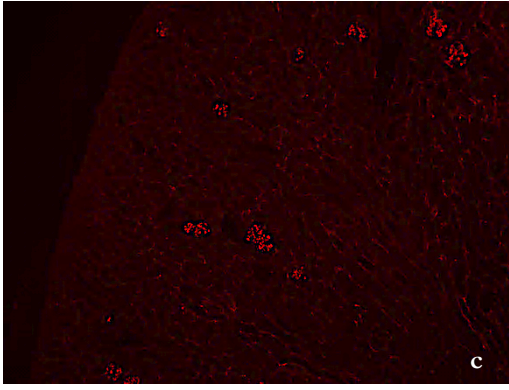
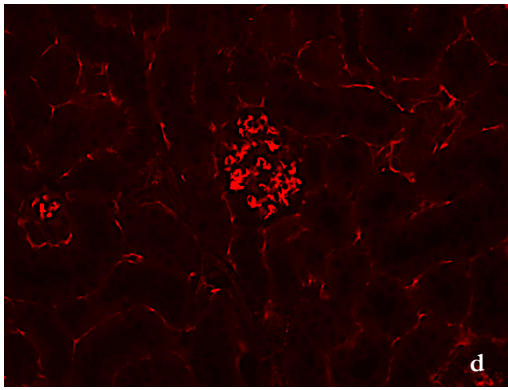
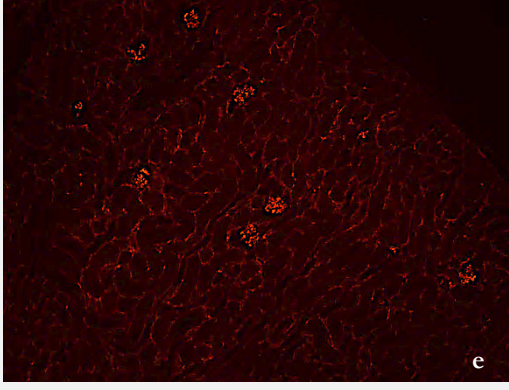
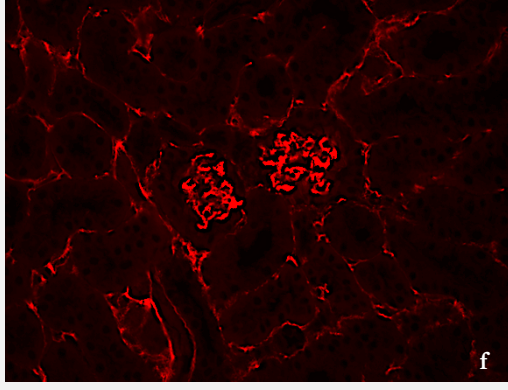
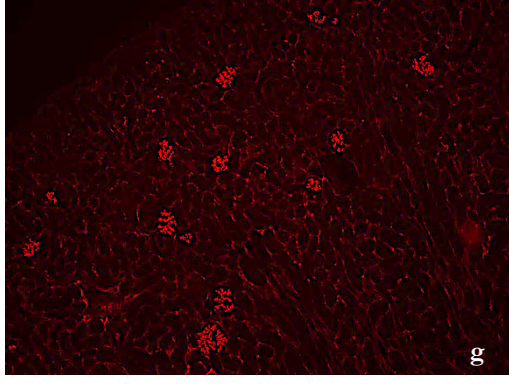
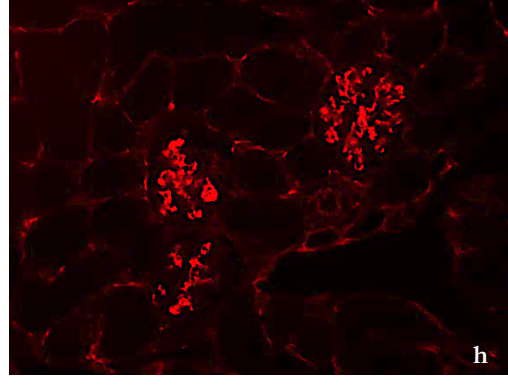
Es wurde der Median mit 25. und 75. Perzentile in Klammern angegeben. Im oberen Abschnitt befinden sich die Werte für die zehnfache (10x), im unteren für die 40-fache Vergrößerung (40x).

	Genotyp	NEPH	Fett	p-Wert
10x	<i>COL4A3</i> ^{+/-}	0,5 (0,5; 1,0)	1,0 (0,5; 1,5)	p = 0,0007
	<i>NPHS2</i> ^{+ /R140Q}	1,0 (0,5; 1,0)	1,0 (1,0; 2,0)	p < 0,0001
	doppelheterozygot	0,5 (0,5; 1,0)	1,5 (1,0; 2,0)	p < 0,0001
40x	Wildtyp	1,0 (1,0; 1,5)	1,0 (1,0; 1,5)	p = 0,0465
	<i>NPHS2</i> ^{+ /R140Q}	1,0 (1,0; 1,5)	1,5 (1,0; 2,0)	p < 0,0001
	doppelheterozygot	1,0 (0,5; 1,5)	1,5 (1,0; 2,0)	p < 0,0001

Tabelle 21 Wertetabelle des Fibronektin-Scores, Genotyp-Vergleich in der Fett-Gruppe

Es wurde der Median mit 25. und 75. Perzentile in Klammern angegeben. Im oberen Abschnitt befinden sich die Werte für die zehnfache (10x), im unteren für die 40-fache Vergrößerung (40x).

	Fett-Gruppe	Fibronektin-Score	p-Wert
10x	Wildtyp vs. <i>NPHS2</i> ^{+ /R140Q}	1,0 (0,5; 1,5) vs. 1,0 (1,0; 2,0)	p = 0,0267
	Wildtyp vs. doppelheterozygot	1,0 (0,5; 1,5) vs. 1,5 (1,0; 2,0)	p = 0,0005
	<i>COL4A3</i> ^{+/-} vs. doppelheterozygot	1,0 (0,5; 1,5) vs. 1,5 (1,0; 2,0)	p = 0,0102
40x	Wildtyp vs. <i>NPHS2</i> ^{+ /R140Q}	1,0 (1,0; 1,5) vs. 1,5 (1,0; 2,0)	p = 0,0029
	Wildtyp vs. doppelheterozygot	1,0 (1,0; 1,5) vs. 1,5 (1,0; 2,0)	p = 0,0014

		Zehnfache Vergrößerung	40-fache Vergrößerung
NIEPH	Wildtyp		
			
NIEPH	COL4A3 ^{-/-}		
			

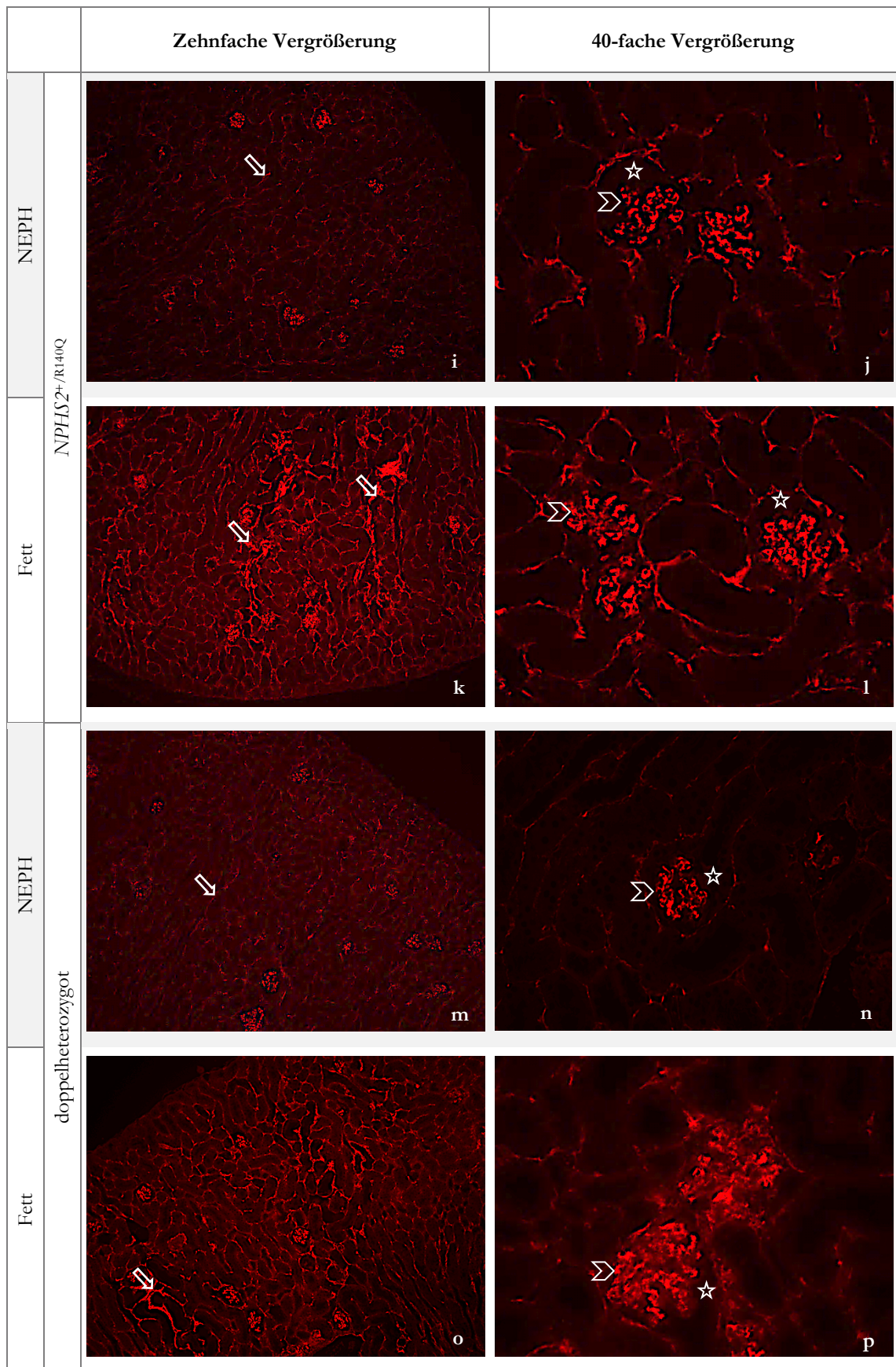


Abbildung 19 **Beispielbilder der Fibronektin-Färbung a-p**

Die Bilder wurden nach Gruppe (erste Spalte) und Genotyp (zweite Spalte) sortiert. Zu sehen ist die zehnfache Vergrößerung (dritte Spalte) und die 40-fache Vergrößerung (vierte Spalte). Durch Anfärben

von Fibronectin werden Areale fibrotischer Umbauprozesse sichtbar gemacht. Betrachtet man die Bildpaare der Gruppen, die sich signifikant unterschieden, erkennt man die Unterschiede. So zeigen sich in **19 k** (*NPHS2^{+ / R140Q}*, Fett-Gruppe) und **19 o** (doppelheterozygot, Fett-Gruppe) die interparenchymatösen Septen (\Rightarrow) im Vergleich zu den korrespondierenden Bildern der NEPH-Gruppe (**19 i** und **19 m**) verdickt. Insgesamt sind bei den beiden Bildern der Fett-Gruppe mehr Signalanreicherungen interparenchymatös zu sehen. Auch in der 40-fachen Vergrößerung fällt auf, dass das Kapillarkonvolut (Σ) der Glomeruli der *NPHS2^{+ / R140Q}*- und der doppelheterozygoten Mäusen in der Fett-Gruppe (**19 p** und **19 l**) plumper aussieht als in der NEPH-Gruppe (**19 n** und **19 j**) und dass der Raum zwischen Bowman-Kapsel und Glomerulus (Kapillarkonvolut) (\star) in den genannten Bildern bei den Fett-Mäusen schmaler ist als der der NEPH-Mäuse. Im **19 p** ist der Raum kaum noch zu sehen.

3.2.3.2 Laminin-Score

Laminin ist ein Protein der Basalmembran. Durch das Anfärben kann eine Akkumulation von extrazellulärer Matrix im Bereich der Basalmembran sichtbar gemacht werden.

Die Ergebnisse des Fibronectin-Scores ließen sich beim Laminin-Score nicht reproduzieren. Der Laminin-Score der Fett-Gruppe war lediglich bei den *NPHS2^{+ / R140Q}*-Mäusen in der zehnfachen Vergrößerung signifikant höher als der der NEPH-Gruppe ($p = 0,0008$). Innerhalb der Genotypen unterschieden sich nur in der NEPH-Gruppe die Wildtyp-Mäuse in zehnfacher Vergrößerung signifikant von den *NPHS2^{+ / R140Q}*-Mäusen ($p = 0,0145$). Es ist anzumerken, dass die Wildtyp-Mäuse mit einem medianen Score von 1,5 (25. Perzentile: 1,0; 75. Perzentile: 1,625) signifikant oberhalb der *NPHS2^{+ / R140Q}*-Mäuse mit 1,0 (25. Perzentile: 0,0; 75. Perzentile: 1,5) lagen, was den Ergebnissen des Fibronectin-Scores entgegensteht. Die genauen Werte der signifikanten Unterschiede sind der Tabelle 22 und Tabelle 23 zu entnehmen. Die Ergebnisse wurden Abbildung 20 graphisch dargestellt.

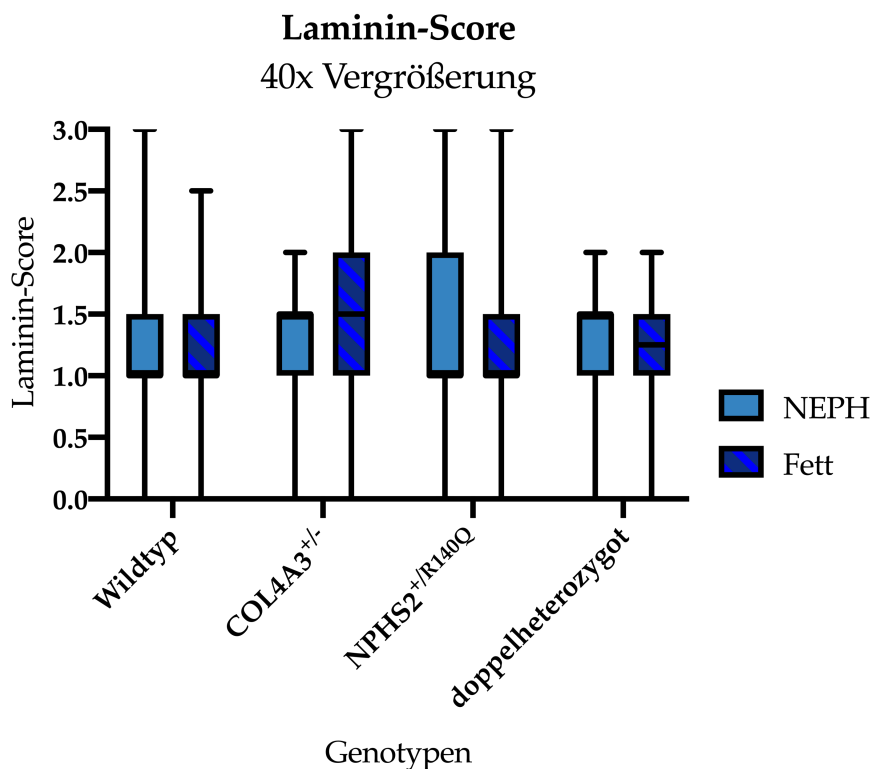
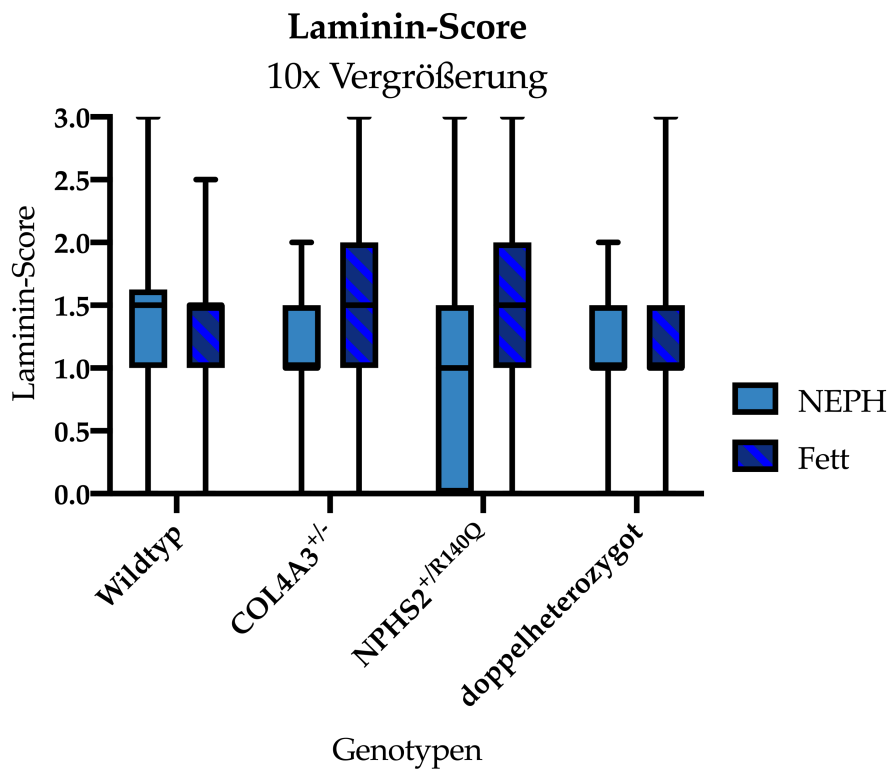


Abbildung 20 **Laminin-Score Übersicht**

Oben: Vergleich des Laminin-Scores nach Genotypen und Gruppen (NEPH und Fett) unterteilt in zehnfache Vergrößerung. **Unten:** Vergleich des Laminin-Scores nach Genotypen und Gruppen (NEPH und Fett) unterteilt in 40-fache Vergrößerung.

Tabelle 22 Wertetabelle des Laminin-Scores, NEPH/Fett-Vergleich

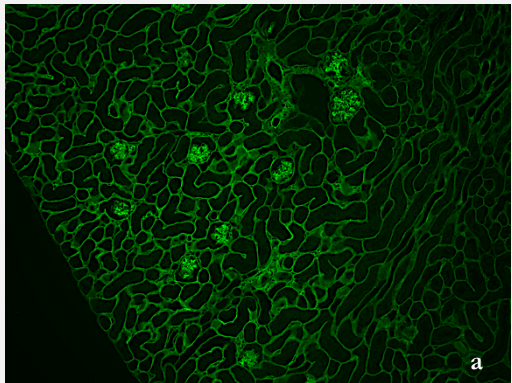
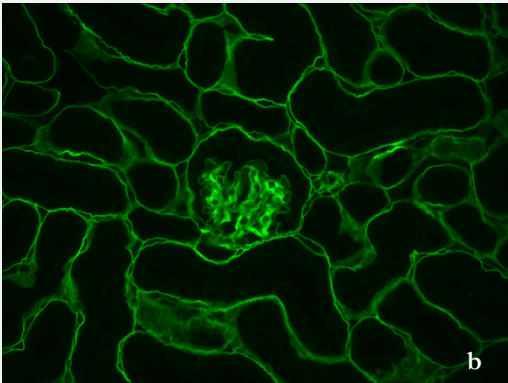
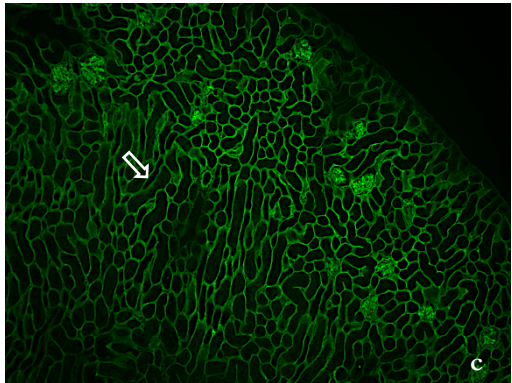
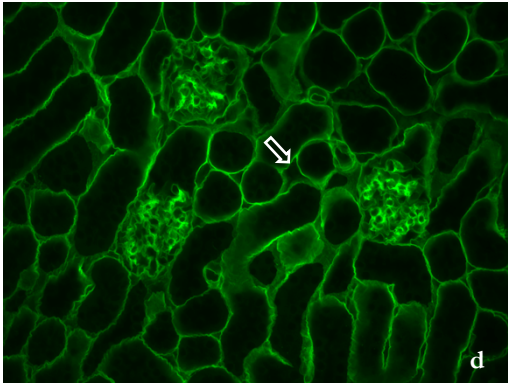
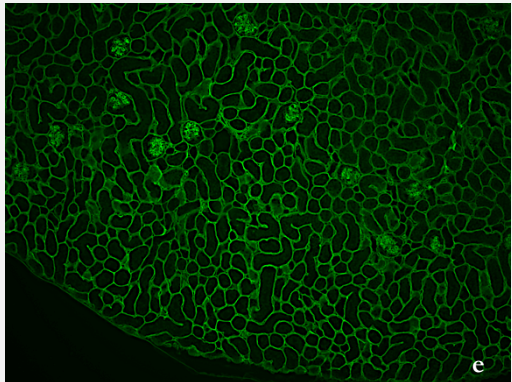
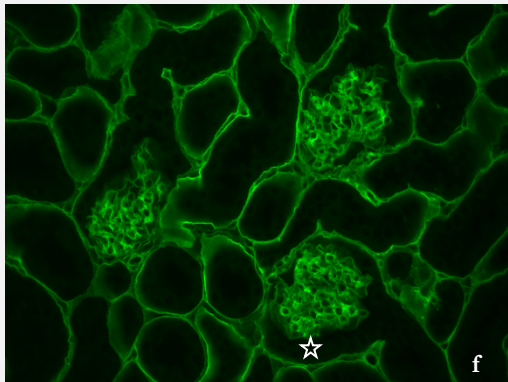
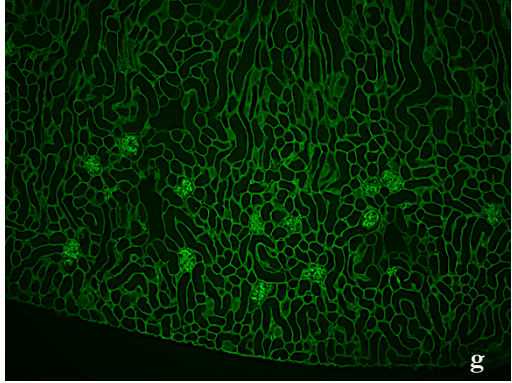
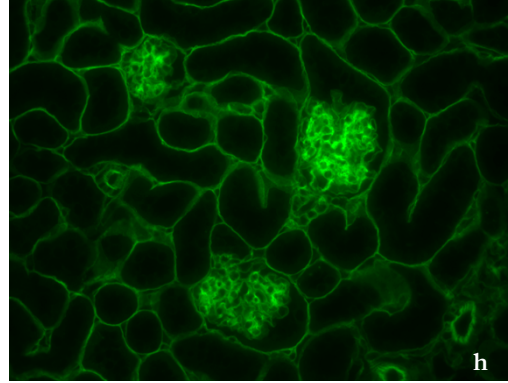
Es wurde der Median mit 25. und 75. Perzentile in Klammern angegeben. Lediglich die *NPHS2⁺/R140Q*-Mäuse zeigten in der zehnfachen (10x) Vergrößerung einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

	Genotyp	NEPH	Fett	p-Wert
10x	<i>NPHS2⁺/R140Q</i>	1,0 (0,0; 1,5)	1,5 (1,0; 2,0)	p = 0,0008

Tabelle 23 Wertetabelle des Laminin-Scores, Genotyp-Vergleich in der NEPH-Gruppe

Es wurde der Median mit 25. und 75. Perzentile in Klammern angegeben. Lediglich die Wildtyp-Mäuse der NEPH-Gruppe zeigten in der zehnfachen (10x) Vergrößerung einen signifikanten Unterschied zu den *NPHS2⁺/R140Q*-Mäusen.

	NEPH-Gruppe	Laminin-Score	p-Wert
10x	Wildtyp vs. <i>NPHS2⁺/R140Q</i>	1,5 (1,0; 1,625) vs. 1,0 (0,0; 1,5)	p = 0,0145

		Zehnfache Vergrößerung	40-fache Vergrößerung
NEPH	Wildtyp		
			
Fett	COL4A3 ^{-/-}		
			

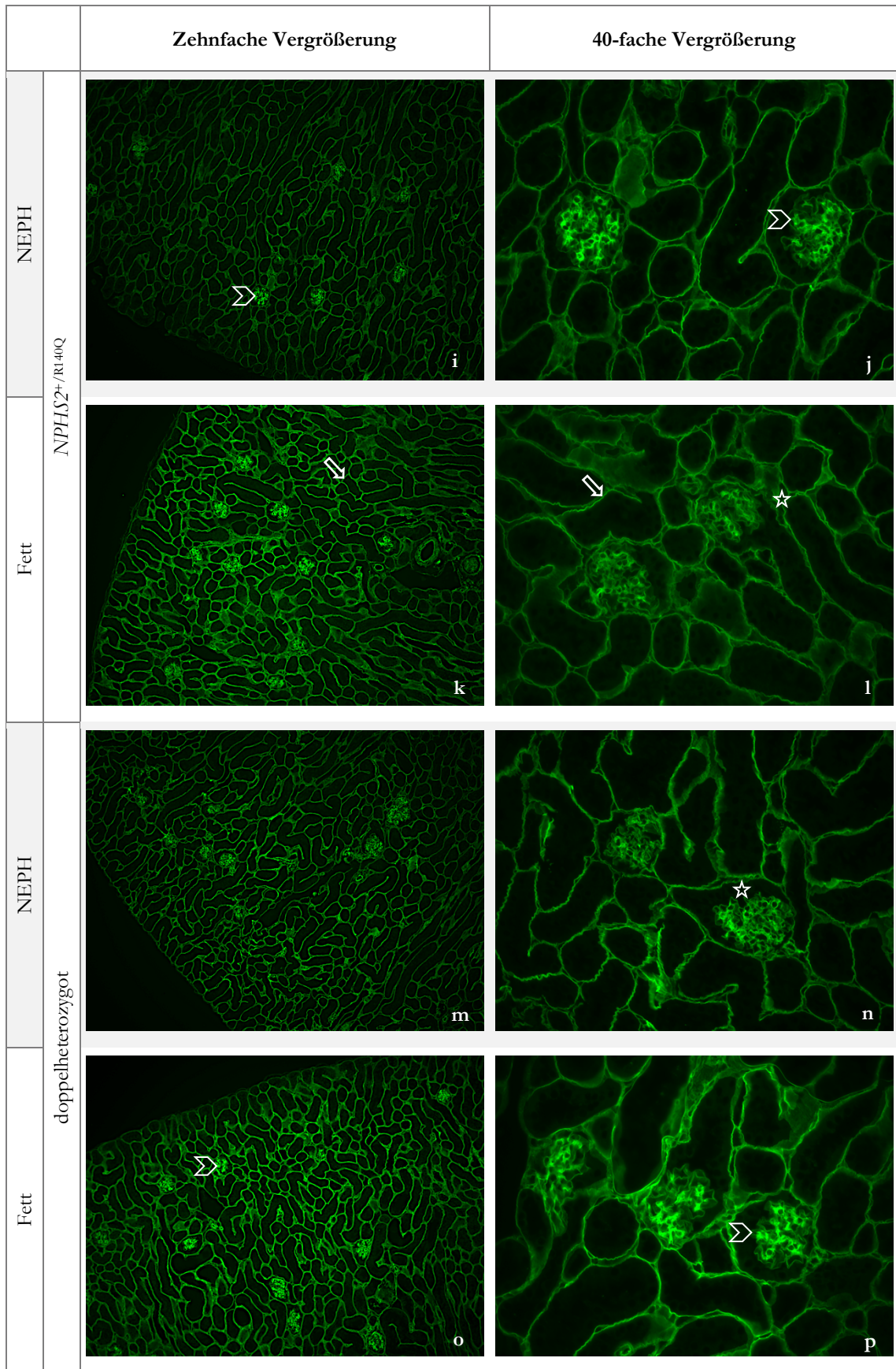


Abbildung 21 Beispielbilder der Laminin-Färbung a-p

Die Bilder wurden nach Gruppe (erste Spalte) und Genotyp (zweite Spalte) sortiert. Zu sehen ist die zehnfache Vergrößerung (dritte Spalte) und die 40-fache Vergrößerung (vierte Spalte). Es wurden die gleichen Mäuse wie im Fibronectin-Score dargestellt. Durch Anfärben von Laminin werden Basalmembranen bzw. extrazelluläre Matrix sichtbar gemacht. Die Auswertung des Laminin-Scores ergab größtenteils keine signifikanten Unterschiede. Lediglich in der zehnfachen Vergrößerung unterschied sich in der NEPH-Gruppe der Wildtyp (**21 a**) signifikant von dem *NPHS2^{+/R140Q}*-Genotyp (**21 i**). Die Färbung in **21 i** wirkt schwächer, die Linien sind feiner und insgesamt reichert sich weniger Signal an. Dies steht im Widerspruch zu den Erwartungen und mit den Ergebnissen der Fibronectin-Scores, bei dem sich die Mäuse der NEPH-Gruppe in der zehnfachen Vergrößerung nicht signifikant voneinander unterschieden. Des Weiteren wurde die *NPHS2^{+/R140Q}*-Mäuse der Fett-Gruppe (**21 k**) in der zehnfachen Vergrößerung signifikant schlechter gescort als die der NEPH-Gruppe (**21 i**). In **21 k** (*NPHS2^{+/R140Q}*, Fett-Gruppe) stellen sich die Basalmembranen der Tubuli heller dar. Die Glomeruli reichern stärker Signal an, die Basalmembranen der Kapillarkonvolute sind nicht so gut abzugrenzen, wie im **21 i** (*NPHS2^{+/R140Q}*, NEPH-Gruppe). Basalmembran der Tubuli (\Rightarrow), Glomerulus (Σ), Raum zwischen Glomerulus (Kapillarkonvolut) und Bowman-Kapsel (\star).

3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammengefasst wirkte sich eine fettreiche Ernährung negativ auf den metabolischen Stoffwechsel und die Nierenfunktion und -histologie aus. Obwohl es zu keiner signifikanten Gewichtszunahme oder Leberverfettung in der Fett-Gruppe kam, lag die durchschnittliche Cholesterin-Konzentration i. S. signifikant höher als in den Kontroll-Gruppen SHAM und NEPH. Bei den uninephrektomierten Tieren lag die Cholesterin-Konzentration ebenfalls über der der SHAM-Gruppe. Es zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied. Zwischen den Genotypen konnte kein Unterschied in Bezug auf den metabolischen Stoffwechsel festgestellt werden.

Die Harnstoff-Konzentration i. S. als Verlaufsparemeter für die Nierenfunktion wurde signifikant durch die fettreiche Ernährung erhöht. Die durchschnittliche Harnstoff-Konzentration i. S. der Fett-Gruppe lag signifikant über der der SHAM- und NEPH-Gruppe. Die Werte der SHAM- und NEPH-Gruppe unterschieden sich ebenfalls signifikant. Nach Uninephrektomie stieg die durchschnittliche Harnstoff-Konzentration i. S. an.

Bei fettreich ernährten Mäusen kam es abhängig vom Genotyp zu einer vermehrten Fibrosierung der Niere bzw. der Glomeruli. In der zehnfachen Vergrößerung, in der vor allem der Nierenfibrosegrad beurteilt wurde, fiel der Score bei den Tieren mit erhöhtem genetischen Risiko signifikant schlechter aus als in der NEPH-Gruppe. In der 40-fachen Vergrößerung, in der vor allem der Glomerulosklerosegrad beurteilt wurde, wurden in der Fett-Gruppe Wildtyp-

Mäuse, *NPHS2*^{+/^{R140Q}}- und doppelheterozygote Tiere signifikant schlechter gescort. Auch innerhalb der Fett-Gruppe unterschied sich der Fibrosegrad je nach Genotyp. Sowohl in der zehnfachen als auch in der 40-fachen Vergrößerung war der Score der *NPHS2*^{+/^{R140Q}}- und der doppelheterozygoten Mäuse höher als der der Wildtyp-Mäuse. In der zehnfachen Vergrößerung wurden außerdem die doppelheterozygoten Mäuse schlechter gescort als die *COL4A3*^{+/-}-Mäuse. Die Ergebnisse ließen sich im Laminin-Score als Marker für die extrazelluläre Matrixakkumulation nicht reproduzieren. Es zeigte sich lediglich eine signifikant erhöhte Matrixakkumulation in der zehnfachen Vergrößerung bei den *NPHS2*^{+/^{R140Q}}-Mäusen der Fett-Gruppe im Vergleich zur NEPH-Gruppe. In der NEPH-Gruppe wurden sogar die Wildtyp-Mäuse signifikant schlechter gescort als die *NPHS2*^{+/^{R140Q}}-Mäuse.

Obwohl histologische Veränderungen und eine erhöhte Harnstoff-Konzentration i. S. in der Fett-Gruppe beobachtet wurden, hatte dies keine Auswirkung auf die relative Proteinurie, weder in Abhängigkeit vom Genotyp, noch von der Proteingröße. Da männliche Mäuse physiologischer Weise mehr Proteine über den Urin ausscheiden, wurde die relative Proteinurie sowohl geschlechtsabhängig, als auch -unabhängig betrachtet.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, im Mausmodell die Auswirkungen fettreicher Ernährung auf eine funktionelle Einzelniere mit den genetischen Risikokonstellationen *COL4A3*^{+/-} und bzw. oder *NPHS2*^{+/^{R140Q}} zu untersuchen. Dies sollte die Situation simulieren, dass ein für das Alport-Syndrom heterozygoter Elternteil seinem homo- bzw. hemizygoten Kind mit terminaler Niereninsuffizienz eine Niere spendet. Da das Alport-Syndrom zu ca. 85 % X-chromosomal vererbt wird, gibt es diese Situation recht häufig. *Modifier*-Gene wie z. B. das *NPHS2*-Gen stehen unter Verdacht, den Verlauf bei heterozygoten Alport-Patienten zu beeinflussen, sodass auch diese eine terminale Niereninsuffizienz entwickeln können.

Eine fettreiche Ernährung, die meist zur einer erhöhten Kalorienzufuhr und Übergewicht führt, hat womöglich auch Einfluss auf den Verlauf. Als Bestandteil des metabolischen Syndroms gilt Übergewicht als Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen und mindestens als sekundärer Risikofaktor für eine chronische Niereninsuffizienz. Durch diese Arbeit sollen den Betroffenen wissenschaftlich fundierte Empfehlungen an die Hand gegeben werden können, sodass frühzeitig eine *Lifestyle*-Modifikation und ggf. eine Therapie eingeleitet werden kann.

4.1 Metabolische Veränderungen

4.1.1 Gewicht

Die Prävalenz von Übergewicht ist in den letzten Jahrzehnten weltweit angestiegen und hat ein epidemisches Ausmaß angenommen. Von 1975 bis 2016 hat sich die Adipositas-Prävalenz weltweit verdreifacht. Es sterben global betrachtet mehr Menschen an Über- als an Untergewicht (WHO 2020). Dazu trägt möglicherweise der „westliche Lebensstil“ bei, der besonders in Industrienationen verbreitet ist. Er beinhaltet vor allem den Konsum von Fertiggerichten, Fast Food und gesüßten Getränken. Die Portionsgrößen sind meist übermäßig. Außerdem haben die genannten Nahrungsmittelformen durch den hohen Zucker- und Fettanteil eine hohe Kaloriendichte und einen hohen glykämischen Index (Prentice und Jebb 2003; Rosenheck 2008).

Übergewicht geht mit vielen Komorbiditäten einher. An den Auswirkungen von Übergewicht oder Nahrungsmitteln wie Fast Food und Fertiggerichten auf die Nierenfunktion ist bisher noch nicht viel geforscht worden. Es ist bereits bekannt, dass mit steigender Inzidenz von Übergewicht auch die Inzidenz von Dialysepflichtigkeit steigt (Hsu et al. 2006; Kramer et al. 2006). Eine japanische prospektive Studie über drei Jahre mit 986 Teilnehmer konnte zeigen,

dass Übergewicht ($\text{BMI} > 25 \text{ kg/m}^2$) signifikant mit dem Auftreten einer chronischen Niereninsuffizienz vergesellschaftet ist. Diese wurde als GFR-Abfall unter $60 \text{ ml/kg/1,73 m}^2$ oder als eine einfach positive Proteinurie auf dem Urineststreifen definiert (Kawamoto et al. 2020). Übergewicht stellt also möglicherweise einen unabhängiger Risikofaktor für das Auftreten einer chronischen Niereninsuffizienz dar.

Optimaler Weise wäre das Gewicht der Fett-Mäuse signifikant im Verlauf der fettreichen Diät angestiegen. Die Mäuse der Fett-Gruppe wurden insgesamt für ca. 35 Tage, also fünf Wochen, fettreich ernährt. Zu keinem Zeitpunkt lag das Gewicht der Fett-Gruppe signifikant über dem der NEPH-Gruppe. Zum Ende des Beobachtungszeitraums scheint das Gewicht der Fett-Gruppe stärker anzusteigen als das der NEPH-Gruppe (siehe Abbildung 6 und Abbildung 7). Möglicherweise hätten die Mäuse der Fett-Gruppe noch ein Übergewicht entwickelt, wäre der Beobachtungszeitraum länger gewesen. Van Herck et al. (2017) beschreiben in einem *Review* unterschiedliche Tier-Modelle zur Forschung an der NAFLD. Die *High-Fat*-Diät wird dort mit einem Fettanteil von 45 % bis 75 % angegeben. Der Fettanteil des Nacktmausfutters, das die Mäuse der Fett-Gruppe erhalten haben, lag lediglich bei 17 %. Übergewicht entwickelt sich laut diesem *Review* nach zehn Wochen fettreicher Ernährung (Ito et al. 2007; Van Herck et al. 2017). Auch ein Experiment an *Sprague-Dawley* Ratten lieferte ähnliche Ergebnisse. Die Ratten wurden nach fünf Tagen Eingewöhnung für weitere 28 Tage mit der *Liquid Lieber DeCarli* Diät (Fettanteil 35,9 %) ernährt. Auch wenn sich Unterschiede in der Leberhistologie und in den Blutfettwerten zeigte, unterschied sich das Gewicht der Ratten nicht signifikant von dem der Kontrollgruppe, die ein Standard Haltungsfutter erhielt (Alwahsh et al. 2014). Dies spricht dafür, dass der Zeitraum der fettreichen Ernährung zu kurz gewählt wurde, um ein Übergewicht bei den Mäusen entstehen zu lassen.

Durch die zusätzliche Gabe von 30%-iger Fruktose-Trinklösung zur *High-Fat*-Diät hätte eine Gewichtszunahme unterstützt werden können. Dadurch tritt ein Übergewicht schon nach acht Wochen Diät auf (Sellmann et al. 2015; Van Herck et al. 2017). Der zusätzliche Fruktose-Konsum würde auch dem westlichen Ernährungsstil entsprechen, der vor allem aus Lebensmitteln und Getränken mit einem hohen Fett- und Zuckergehalt besteht.

Um die Kalorienzufuhr der Mäusen zu quantifizieren, hätte man die Futtermenge täglich wiegen können. Am genauesten wäre dieses Vorgehen bei Mäusen in Einzelhaltung. Um die Belastung der Mäuse im Experiment möglichst gering zu halten, wurde bewusst darauf verzichtet. Als Kompromiss hätte man die durchschnittliche Futteraufnahme pro Maus ermitteln können. So hätte man nachvollziehen können, ob die Mäuse der Fett-Gruppe tatsächlich mehr Kalorien zu

sich nahmen oder insgesamt weniger Futter fraßen und die totale Kalorienzufuhr somit die Gleiche war.

Ist die Niere vorgeschädigt, wie es bei den Alport-Patienten der Fall ist, sind die Auswirkungen von Übergewicht möglicherweise noch fataler. Da die Prävalenz von Übergewicht über die letzten Jahre global anstieg und immerhin 1 % der Bevölkerung schätzungsweise heterozygot für das Alport-Syndrom ist, sollte weiter an diesem Themenfeld geforscht werden. So könnte man das Experiment mit einem höheren Fettanteil des Futters mit oder ohne zusätzliches Fruktose-Trinkwasser wiederholen. Der Beobachtungszeitraum sollte auf mindestens zehn Wochen *High-Fat*-Diät verlängert werden.

4.1.2 Cholesterin-Konzentration i.S.

Trotz nicht erfolgter Gewichtszunahme stieg die Cholesterin-Konzentration i. S. bei der Fett-Gruppe signifikant an. Sowohl in dem Haltungsfutter als auch in dem Nacktmausfutter war kein Cholesterin enthalten. Dementsprechend muss durch die vermehrte Aufnahme von Lipiden mehr Cholesterin vom Körper synthetisiert worden sein. Beim Menschen wird nur ein Drittel des Cholesterin-Spiegels im Blut über die Nahrung beeinflusst (Grundy 2016; Jenkins et al. 2003). Die Cholesterin-Konzentration ist also möglicherweise auch bei Mäusen nur begrenzt durch die Ernährung beeinflussbar.

Bei den Fett-Mäusen stieg die Cholesterin-Konzentration im Vergleich zu der SHAM-Gruppe um das 1,3-fache und im Vergleich zur NEPH-Gruppe um das 1,23-fache an. In dem oben genannten Experiment, bei dem Ratten mit einer *Liquid Lieber DiCarli High-Fat*-Diät 33 Tage lang ernährt wurden, stieg die Cholesterin-Konzentration ebenfalls auf das 1,3-fache an, also auch um ca. 30 % (Alwahsh et al. 2014).

Neben der Ernährung können auch Erkrankungen der Niere die Cholesterin-Konzentration i. S. beeinflussen. Im Rahmen des nephrotischen Syndroms verliert der Körper über die Nieren massiv Proteine. Die Leber synthetisiert kompensatorisch als Reaktion auf die Hypoproteinämie mehr Lipide, also auch mehr Cholesterin, um den onkotischen Druck des Bluts aufrechtzuerhalten (Vaziri 2016). Allerdings konnte kein größerer Proteinverlust bei den Mäusen der Fett-Gruppe festgestellt werden (siehe 3.2.1), was diese Erklärung unwahrscheinlich macht.

Es ist interessant, dass obwohl die Mäuse nicht übergewichtig geworden sind, die Cholesterin-Konzentration durch die Ernährung signifikant angestiegen ist. Eine Hypercholesterinämie ist ein wichtiger kardiovaskulärer Risikofaktor. Erkrankungen wie Atherosklerose und arterieller Bluthochdruck können die Nierenfunktion sekundär negativ beeinflussen. Gerade bei einer

vorgeschädigten Niere sollte die Hypercholesterinämie also möglichst konsequent behandelt werden (Mach et al. 2019). Die Cholesterin-Konzentration kann durch eine Ernährungsumstellung maximal um 30 % gesenkt werden. Eine weitere effektive und einfache Möglichkeit ist die Gabe von Statinen, die die Cholesterin-Synthese hemmen. Sowohl bei übergewichtigen, als auch bei normalgewichtigen Alport-Patienten sollte die Blutfettwerte kontrolliert und ggf. im Normalbereich eingestellt werden, um die Niere(n) optimal zu schützen.

4.1.3 Grad der Leberverfettung

Durch eine fettreiche Ernährung kann eine nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung entstehen. Hätte man bei den Mäusen der Fett-Gruppe eine NAFLD in der Leberhistologie nachgewiesen, wäre das ein weiterer Hinweis gewesen, dass sich die Ernährung mit Nacktmausfutter auf den Metabolismus ausgewirkt hat. Die Mäuse der Fett-Gruppe zeigten jedoch keine signifikante Mehrverfettung der Leber. Es war lediglich eine fokalemikro- bis medivesikuläre Leberverfettung ohne Krankheitswert zu sehen. Einige Mäuse zeigten eine stärkere Fetteinlagerung als andere. Eine Systematik ließ sich nicht erkennen (siehe Abbildung 9).

Eine mögliche Erklärung nennen Van Herck et al. (2017) in dem Paper über NAFLD-Tiermodelle. Dort tauchte eine Leberverfettung bei Ratten nach zwei Wochen *High-Fat*-Diät (Fettanteil 42 %) auf, verschwand wieder und manifestierte sich in der sechsten Woche erneut. Gauthier et al. (2006), die das Experiment an Ratten ursprünglich durchführten, beschreiben dieses Phänomen als Pufferreaktion der Leber vor vermeintlich schädlichen Stoffen. So nahm die Leberverfettung bei den Ratten in den ersten zwei Wochen um 200 % zu, während sie nach sechs Wochen nur um 17 % höher war als die anfängliche. Zwischenzeitlich fiel der Leberverfettungsgrad fast auf ursprüngliche Werte zurück. Die Mäuse der Fett-Gruppe erhielten fünf Wochen lang eine fettreiche Ernährung. Somit liegen sie genau in dem Intervall, in dem die Leberverfettung zurückgeht. Hätte man den Beobachtungszeitraum auf mindestens sechs Wochen ausgedehnt, wäre womöglich eine Mehrverfettung der Leber feststellbar gewesen.

Eine NAFLD ist einer der häufigsten Gründe für ein Leberversagen. In einer Metaanalyse von 86 Studien aus 22 Ländern im Zeitraum zwischen 1989 bis 2015 wurde die globale Prävalenz auf ca. 25 % geschätzt. Ca. 60 % davon entwickelten eine nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH), also eine verfettungs-bedingte Entzündung der Leber. Es ist anzumerken, dass nur 51 % der NAFLD- und 81 % der NASH-Patienten adipös waren. Es ist also keine Grundvoraussetzung, dass man übergewichtig ist, um eine NAFLD oder NASH zu entwickeln. Ca. 40 % der NASH-Patienten entwickelten eine Leberfibrose. Die allgemeine Mortalität lag bei NAFLD-Patienten bei 15,44 pro 1000 Personen/Jahr. Bei NASH-Patienten lag sie sogar bei

25,56 pro 1000 Personen/Jahr. Die entsprechenden leber-spezifischen Mortalitätsraten lagen bei 0,77 pro 1000 Personen/Jahr und 11,77 pro 1000 Personen/Jahr (Younossi et al. 2016). Die NAFLD ist also eine ernst zu nehmende Erkrankung, die die Gesamtmortalität steigert.

Die NAFLD ist mit dem Auftreten einer chronischen Niereninsuffizienz assoziiert. Dies zeigten zwei unabhängige Metaanalysen (Kaps et al. 2020; Mantovani et al. 2018). Kaps et al. (2020) führten die Metaanalyse an deutschen Daten zwischen 2000 und 2015 durch. Es wurden 48057 Fälle mit NAFLD inkludiert. Die Daten zeigten ein um 58 % erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer chronische Niereninsuffizienz bei Vorliegen einer NAFLD. Die häufigsten Komorbiditäten waren Adipositas, Diabetes mellitus Typ 2 und Hyperlipidämie. Es ist wahrscheinlich, dass die genannten Erkrankungen als unabhängige Risikofaktoren alleine schon die Nierenfunktion negativ beeinflussen. Häufig treten sie im Rahmen des metabolischen Syndroms zusammen auf.

Durch eine Wiederholung des Experiments mit einem höheren Fettanteil der Nahrung und einem längeren Beobachtungszeitraum könnten weitere wichtige Erkenntnisse darüber gewonnen werden, wie sich eine NAFLD auf Nieren auswirkt, mit und ohne genetischen Risikokonstellationen. Dies könnte dazu beitragen, den Zusammengang zwischen Ernährung, Übergewicht, Leber- und Nierenfunktion besser zu verstehen. Womöglich könnten weitere Ursachen für den variablen Verlauf bei heterozygoten Alport-Patienten gefunden. Hätte das Auftreten einer NAFLD einen signifikanten Einfluss auf Nierenfunktion der Alport-Patienten, könnte man durch einfache Maßnahmen wie eine Ernährungsumstellung das Auftreten einer ESRD verhindern oder zumindest verzögern.

4.2 Auswirkungen auf die Nierenfunktion

4.2.1 Proteinurie

Eine Proteinurie liegt ab einem Proteinverlust von mehr als 150 mg am Tag über den Urin vor. Anhand der Größe der ausgeschiedenen Proteine lassen sich Rückschlüsse auf den Ort der Schädigung schließen. Physiologischerweise können kleine Proteine die Blut-Harn-Schranke passieren und werden sekundär durch die Tubuli wieder resorbiert. Tauchen somit vermehrt kleine Proteine im Urin auf, spricht man von einer selektiven tubulären Proteinurie. Die Tubuli sind nicht mehr in der Lage, die kleinen Proteine im ausreichenden Maß aus dem Urin zu entfernen. Als Leitprotein gilt das β 2-Mikroglobulin (ca. 11,7 Da). Bei einer glomerulären Schädigung treten vermehrt große Proteine in den Urin über. Bei der selektiven glomerulären

Proteinurie ist das vor allem Albumin (ca. 66 kDa), bei der nicht-selektiven glomerulären Proteinurie kommen sehr große Proteine hinzu wie IgG (Immunglobulin G) (ca. 150 kDa).

Aus diesem Grund wurde neben der Gesamtproteinurie hochmolekulare, niedermolekulare Proteine und Albumin betrachtet und verglichen. Pro Laufspur wurden somit drei Banden analysiert.

Der Vergleich der SHAM- und NEPH-Gruppe zeigte, dass sich die Uninephrektomie nicht auf die Proteinurie der Mäuse auswirkte. Es zeigte sich auch kein Unterschied zwischen den einzelnen Genotypen. Auch eine Metaanalyse aus dem Jahr 2006, in der 84 Studien aus 27 Ländern untersucht wurden, ergab, dass bei Patienten, die eine Niere gespendet hatten, die Proteinurie nur marginal auf 154 mg/d (Norm: 150 mg/d) anstieg und die GFR nach initialem Abfall konstant blieb. Der Beobachtungszeitraum lag bei mindestens fünf Jahren nach Spende (Garg et al. 2006). Ob die verbliebene Niere durch eine Hyperfiltration nach Uninephrektomie geschädigt wird, wird derzeit kontrovers diskutiert. Es gibt sowohl Studien und Experimente, die dafür und dagegen sprechen. Fakt ist, dass die Nierenmasse durch eine Uninephrektomie um 50 % reduziert wird und das gesamte Plasmavolumen nun durch eine Niere filtriert werden muss. Kompensatorisch wird die GFR der verbliebenen Niere gesteigert. Im Tiermodell konnte beispielsweise bei uninephrektomierten *Sprague-Dawley* Ratten gezeigt werden, dass die GFR eines einzelnen Nephrons 55 Tage nach Uninephrektomie um ca. 85,5 % im Vergleich zur Kontrollgruppe anstieg (Celsi et al. 1989). Auch eine Studie an 21 Lebendnierenspendern ergab, dass die GFR bereits kurz nach der Uninephrektomie um ca. 38 % anstieg (ca. ein halbes bis ein Jahr postoperativ). Danach blieb die GFR auf diesem Level bei ca. sechs Jahren Follow-up konstant (Lenihan et al. 2015). Ein starker Abfall der GFR nach Uninephrektomie ist also nicht zu erwarten.

Durch die Entfernung einer Niere kommt es durch die Hyperfiltration zu einem Druckanstieg im Glomerulus. Die Aufgabe von Podozyten und Epithelzellen ist es, steigende Druckverhältnisse im Glomerulus zu neutralisieren und so auch bei hohen Drücken eine intakte Blut-Harn-Schranke zu gewährleisten. Durch die Hyperfiltration wird mehr biomechanischer Stress auf den glomerulären Filter ausgeübt. Zum einen werden die Kapillaren durch Steigerung des renalen Plasmaflusses gedehnt, zum anderen wird die GFR pro Nephron gesteigert, sodass die Podozyten vermehrt Scherkräften durch den Fluss des Primärurins durch die Schlitzmembran ausgesetzt sind. Friedrich et al. konnten in *in vitro* Experimenten an murinen Podozyten zeigen, dass Podozyten unter mechanischem Stress durch laminare Strömung ihr Aktinskelett verändern. Die maximale physiologische Flussrate im Glomerulus bei Mäusen wird auf 0,3 dyne/cm² geschätzt. Bei niedrigen Flussraten (0,015 dyne/cm²), trat eine Aktivierung

des Zytoskeletts unter Ausbildung von Lamellopodien (fußartige Fortsätze) auf. Bei steigender Flussrate ($0,25 \text{ dyne/cm}^2$) im hoch physiologischen Bereich kam es zum Zellverlust und zur Zellmigration, sodass Lücken im Epithel entstanden. Bei einer Flussrate von $0,5 \text{ dyne/cm}^2$ waren nur noch 16 % der Podozyten vorhanden. Diese zeigten einen ausgeprägten Schaden (Endlich et al. 2001; Friedrich et al. 2006). Durch die hohen Scherkräfte werden in den Podozyten apoptotische Vorgänge in Gang gesetzt (Huang et al. 2012).

Glomeruläre Hypertension war bei uninephrektomierten Ratten mit einem erhöhten Risiko für Glomerulosklerose assoziiert (Kretzler et al. 1994). Auch beim Menschen konnte gezeigt werden, dass hohe glomeruläre Drücke zu einer FSGS führen können (Brenner und Mackenzie 1997, zitiert nach Rosenberg und Kopp 2017).

Meehan et al. (2009) führten Experimente zum Thema biomechanischer Stress an Podozyten von Alport-Mäusen durch. 15 Stunden zyklischer Zug (10 %) führten zu einer Zerstörung des Aktinskeletts und zu einer vermehrten Expression von pro-inflammatorischen Proteinen wie Interleukin-6 und Matrixmetalloproteasen. Auch im Mausmodell mit Alport-Mäusen führte eine arterielle Hypertonie zu einer höheren Albuminurie und zu einer gesteigerten Expression von Interleukin-6 und Matrixmetalloproteasen. Durch Salzzufuhr ließ sich der Effekt noch verstärken. Man kann davon ausgehen, dass die Druckverhältnisse für den glomerulären Filter eines Alport-Patienten im Glomerulus chronisch zu hoch sind, da mutationsbedingt nur defektes Kollagen IV $\alpha 3/4/5$ oder weniger stabiles Kollagen IV $\alpha 1/1/2$ gebildet wird (Kalluri et al. 1997; Pieri et al. 2014). Die Folgen sind der fortschreitende Glomerulusverlust und Glomerulosklerose.

Bei Schädigung der Podozyten durch erhöhte Druckverhältnisse im Glomerulus wäre zu erwarten gewesen, dass die Proteinurie der NEPH-Gruppe signifikant gegenüber der SHAM-Gruppe ansteigt und dass die Genotypen mit einer *COL4A3*^{+/-}-Mutation und/ oder mit einem R140Q-Polymorphismus mehr Proteine ausscheiden. Jedoch zeigten auch Studien an Lebendnierenspendern, dass die Proteinurie nach Nierenspende kaum anstieg (Garg et al. 2006).

Kommen jedoch weitere Faktoren hinzu, die die Hyperfiltration bzw. glomerulären Hochdruck verstärken, wie zum Beispiel Adipositas oder Diabetes mellitus Typ 2, wäre es möglich, dass die Podozyten bzw. der glomeruläre Filter so weit geschädigt werden, dass es zur vermehrten Proteinurie und zum Nierenfunktionsverlust kommt. Bei übergewichtigen Menschen nimmt das Plasmavolumen zu und damit auch das Volumen, das durch die Nieren filtriert werden muss (Chagnac et al. 2000; Srivastava et al. 2018). Eine Studie ergab, dass das Risiko eine ESRD zu entwickeln bei adipösen Patienten 20 Jahre nach Lebendnierenspende 86 % höher ist als bei normalgewichtigen Lebendnierenspendern (Locke et al. 2017). Die Mäuse der Fett-Gruppe

unterschieden sich nicht signifikant in der Proteinurie zur NEPH-Gruppe. Auch bei den einzelnen Genotypen innerhalb der Fett-Gruppe zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Zum einen entwickelten die Mäuse der Fett-Gruppe kein signifikantes Übergewicht, somit ist auch nicht davon auszugehen, dass sich das Plasmavolumen steigerte und die Hyperfiltration verstärkt wurde. Möglicherweise war auch die Dauer der fettreichen Ernährung zu kurz, um ausreichend systemische Wirkung zu zeigen. Wie in Abschnitt 4.1.1 beschrieben dauert es bis zu zehn Wochen bis sich ein Übergewicht durch eine *High-Fat*-Diät einstellt.

4.2.2 Harnstoff-Konzentration i. S.

Obwohl sich die Gruppen und Genotypen nicht signifikant in der Proteinurie unterschieden, stieg die Harnstoff-Konzentration i. S. der Fett-Mäuse signifikant im Vergleich zur SHAM- und zur NEPH-Gruppe an. Die durchschnittliche Harnstoff-Konzentration der Fett-Gruppe lag ca. 83,6 % über der der SHAM-Gruppe und ca. 28,4 % über der der NEPH-Gruppe. Dafür sind mehrere Ursachen denkbar. Zum einen ist Harnstoff i. S. ein Nierenfunktionsparameter. Nimmt die Nierenfunktion ab, wird weniger Harnstoff über den Urin ausgeschieden und akkumuliert im Blut (Bradley 1946, zitiert nach Clark et al. 2019). Jedoch steigt die Harnstoff-Konzentration erst ab einem Nierenfunktionsverlust von 75 % über den Normalbereich an. Außerdem unterliegt er im Gegensatz zu Kreatinin stärkeren Schwankungen. Je nachdem, ob sich der Körper gerade in Diurese oder Antidiurese befindet, schwankt der Harnstoffanteil, der aus dem Urin zurückresorbiert wird (Bagnasco 2005). Zum anderen wird die Harnstoff-Konzentration i. S. über die Nahrung beeinflusst (Maroni et al. 1985). Harnstoff ist das Endprodukt des Aminosäuren-Stoffwechsels. Mit der Aufnahme von Proteinen über die Nahrung steigt auch die Menge Harnstoff, die über den Urin ausgeschieden werden muss.

Der Proteinanteil des Nacktmausfutters lag bei 30 % und damit 6 % über dem des Standard Haltungsfutters. Die Fett-Mäuse nahmen also insgesamt mehr Proteine über die Nahrung auf, was zu einer Harnstoff-Konzentration-Erhöhung geführt haben könnte. Die Harnstoff-Konzentration der NEPH-Gruppe lag über der der SHAM-Gruppe, auch wenn sich kein signifikanter Unterschied zeigte. Möglicherweise hat die Uninephrektomie die Harnstoff-Konzentration leicht beeinflusst. Zumindest ist eine Tendenz zu erkennen. Die Harnstoff-Konzentration der Fett-Gruppe lag signifikant oberhalb der der NEPH-Gruppe. Zum einen entwickelten die Mäuse der Fett-Gruppe ernährungs-bedingt eine höhere Harnstoff-Konzentration. Sie nahmen jedoch nur 6 % mehr Proteine auf und dennoch lag die Harnstoff-Konzentration 86,3 % über der der SHAM-Gruppe. Daher ist es zum anderen möglich, dass die fettreiche Ernährung die Nierenfunktion negativ beeinflusst hat. Dafür sprechen die Ergebnisse des Fibronektin-Scores, die im nächsten Abschnitt diskutiert werden. Dagegen

spricht, dass sich die Proteinurie der Gruppen und Genotypen nicht signifikant voneinander unterscheiden. Eine Steigerung der Proteinurie hätte für eine Schädigung der glomerulären Filters gesprochen hätte.

4.2.3 Fibronektin Score

Wie oben schon erwähnt, ist nicht vollständig auszuschließen, dass die Nierenfunktion durch die fettreiche Ernährung abnahm. Auch im Fibronektin-Score unterschied sich die Fett-Gruppe signifikant von der NEPH-Gruppe. Unter Außer-Acht-Lassen des Genotyps lag der mediane Score der NEPH-Gruppe für die zehnfache Vergrößerung bei 0,5 (25. Perzentile: 0,5, 75. Perzentile: 1,0) und der der Fett-Gruppe bei 1,0 (25. Perzentile: 0,5, 75. Perzentile: 1,5) ($p < 0,0001$). Die Ergebnisse korrelieren mit den Ergebnissen der Harnstoff-Konzentration i. S.. Die fettreiche Ernährung ist demnach mit einer signifikanten Zunahme der Nierenfibrose assoziiert. Dabei zeigte sich auch eine Abhängigkeit vom Genotyp. Die *NPHS2^{+/-R140Q}*- und die doppelheterozygoten Mäuse waren von der interstitiellen Nierenfibrose und Glomerulosklerose stärker betroffen als die anderen Genotypen der Fett-Gruppe. Die *COL4A3^{+/-}*-Mäuse zeigten auch in der 40-fachen Vergrößerung eine stärker ausgeprägte Nierenfibrose als die *COL4A3^{+/-}*-Mäuse der NEPH-Gruppe. Ernährung und Genotyp scheinen also einen Einfluss auf die Ausprägung der Nierenfibrose und Glomerulosklerose zu haben.

Dies ist besonders interessant, da die Mäuse der Fett-Gruppe kein signifikantes Übergewicht entwickelten. Das Ergebnis spricht dafür, dass durch eine fettreiche Ernährung die Niere schon geschädigt wurde, bevor äußerliche Veränderungen sichtbar wurden. Dass die Einzelniere durch eine gesteigerte Hyperfiltration durch die Ernährung stärker geschädigt wurde, ist weniger wahrscheinlich, da das zu filtrierende Volumen mit dem Körpergewicht ansteigt.

Eine mögliche Erklärung sind die Hormone, die vom Fettgewebe sezerniert werden. Fettgewebe muss als endokrines Organ angesehen werden. Auch viszerales Fettgewebe, das nicht sichtbar ist, sezerniert Bestandteile des RAAS und pro-inflammatorische Zytokine (Hotamisligil et al. 1993; Karlsson et al. 1998; Weisberg et al. 2003). Zum einen kann das RAAS die Niere sekundär über eine Blutdrucksteigerung schädigen. Es wird vermutet, dass durch einen erhöhten Blutdruck die Hyperfiltration bei uninephrektomierten Patienten aggraviert wird (Serrano et al. 2018; Srivastava et al. 2018). Unter den gesteigerten Druckverhältnissen kommt es zu Lücken zwischen den Podozytenfortsätzen, was zu einer erhöhten Permeabilität des glomerulären Filters führt. Die Konsequenz ist eine Proteinurie (Chen HM et al. 2006). Zum anderen kann ANGII als Bestandteil des RAAS die Niere direkt schädigen. Experimente an Ratten zeigten, dass ANGII Fibroblasten in der Niere stimuliert. Über die Induktion der TGF-

β -Expression kam es zu einer Steigerung der Synthese von Kollagen Typ I und Fibronectin durch Mesangialzellen und damit zum Fortschreiten einer Glomerulosklerose (Kagami et al. 1994). Eine Transfektion mit humanen Genen für Renin und Angiotensinogen im Rattenmodell ergab ähnliche Ergebnisse. Über die linke Nierenarterie wurde mittels der *Hemagglutinating-Virus-of-Japan*(HVJ)-Liposom-Methode die Gene in die Ratten eingebracht. Die nicht transfizierte Niere galt als Kontrolle. Bereits sieben Tage nach Transfektion kam es zu einer vermehrten Ablagerung von extrazellulärer Matrix im Glomerulus und zu einer vermehrten Expression von α -Aktin-2 in den Mesangialzellen, was für eine myofibroblastische Transformation spricht (Arai et al. 1995). Angiotensin II zeigt nicht nur an Zellen der Glomeruli Wirkung. Auch an murinen proximalen Tubuluszellen führte Angiotensin II *in vitro* dosis- und zeitabhängig zu einer Hypertrophie mit konsekutiver tubulointerstitieller Fibrose und Apoptose. Die Apoptose konnte durch AT1-Rezeptorblocker (Lorsatan) oder durch Antioxidantien wie Ascorbinsäure, N-Acetylcystein oder Diphenylendoniumchlorid und durch anti-TGF- β -Antikörper verhindert werden (Bhaskaran et al. 2003). Oxidativer Stress und TGF- β scheinen also eine wichtige Rolle bei der ANGII-vermittelten pro-fibrotischen Wirkung zu spielen.

Die *in vitro* durch Bhaskaran et al. (2003) gemachten Beobachtungen traten auch bei Mäusen, die für 24 Wochen mit einer *High-Fat*-Diät (Fettanteil 58 %) ernährt wurden, in ähnlicher Weise auf. Histopathologisch kam es bei übergewichtigen Wildtyp-Mäusen zu einer Mesangiumproliferation und zu einer tubulären Hypertrophie mit Dilatation der Tubuli. Weiterhin war bei den übergewichtigen Wildtyp-Mäusen eine vermehrte interstitielle Makrophagen-Invasion durch M1-Makrophagen in den Nieren auffällig. Durch die Blockade des AT1-Rezeptors wurde die Makrophagen-Invasion verhindert und das Verhältnis zugunsten der M2-Makrophagen verschoben (Ma et al. 2011). M1-Makrophagen sezernieren vor allem pro-inflammatorische Zytokine wie Interleukin-6 und -1 β und TNF- α . Dem entgegen stehen M2-Makrophagen, deren Aufgabe es ist, Entzündungsreaktionen einzudämmen und Heilungsvorgänge von geschädigtem Gewebe in Gang zu setzen. Angiotensin II vermittelt führt Übergewicht also zu einem Makrophagen-Shift zugunsten der M1-Makrophagen und damit zu einer verstärkten Entzündungsreaktion in der Niere (Gordon 2003; Ma et al. 2011).

Ein weiterer Bestandteil des RAAS ist Aldosteron. Über Aldosteron wirkt das RAAS auch am Fettgewebe selbst (Vecchiola et al. 2016). Rondinone et al. (1993) konnten *in vitro* zeigen, dass sich murine Präadipozyten (3T3-L1-Zellen) durch die Wirkung von Aldosteron zu Adipozyten differenzieren. 2012 fanden Briones et al. (2012) *in vitro* an humanen und murinen Adipozyten heraus, dass die Zellen selbst in der Lage sind Aldosteron zu synthetisieren. Im retroperitonealen Fettgewebe von adipösen Mäusen mit Diabetes mellitus wurde eine gesteigerte Expression von pro-inflammatorischen Zytokine wie TNF- α und *Monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) und

eine verminderte Expression von Adiponektin nachgewiesen. Durch Hemmung des Mineralkortikoid-Rezeptors mit Eplerenon wurde die Wirkung von Aldosteron blockiert. Die gesteigerte Expression der Zytokine wurde damit unterdrückt und die Adiponektin-Expression stieg an (Guo et al. 2008). Studien zeigten auch beim Menschen einen Zusammenhang zwischen dem RAAS und Übergewicht. Eine Analyse der Framingham-Offspring-Studie ergab, dass erhöhte Aldosteron-Serumspiegel mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten des metabolischen Syndroms assoziiert sind (Ingelsson et al. 2007). Bei adipösen Menschen wurden erhöhte Serumspiegel und eine gesteigerte Expression von RAAS-Komponenten im Fettgewebe festgestellt. Durch Gewichtsverlust kam es zu einer signifikanten Abnahme der Serumspiegel und der Genexpression (Engeli et al. 2005). Aldosteron kommt somit eine Schlüsselrolle in der pro-inflammatorischen Wirkung von Fettgewebe zu, während ANGII eher pro-fibrotisch und pro-inflammatorisch an der Niere wirkt.

Eine erhöhte Expression von RAAS-Komponenten wäre eine mögliche Erklärung, warum die Mäuse der Fett-Gruppe im Fibronectin-Score höher gescored wurden als die Mäuse der NEPH-Gruppe. Laut Arai et al. (1995) wären bereits wenige Tage mit einer erhöhten Renin- und Angiotensinogen-Expression in der Niere ausreichend, um histopathologische Veränderungen im Sinne einer Glomerulosklerose hervorzurufen. Vor allem die vorgeschädigten Nieren zeigen möglicherweise eine erhöhte Vulnerabilität, da es bei den Wildtyp-Mäusen zu keiner signifikanten Nierenfibrose kam.

Neben dem RAAS spielen auch die Adipokine des Fettgewebes eine wichtige Rolle bei der Entstehung adipositas-assoziiierter Erkrankungen.

Das Adipokin Leptin wird von weißem Fettgewebe ausgeschüttet und hemmt u. a. über den Hypothalamus den Appetit. Je höher der Fettanteil des Körpers ist, desto mehr Leptin wird ausgeschüttet. Bei Adipositas kommt es jedoch zu einer zentralen Leptin-Resistenz, sodass der Regelkreislauf entkoppelt wird und trotz ausreichend gefüllter Energiespeicher eine weitere Nahrungsaufnahme erfolgt. Der Körperfettanteil steigt weiter an und damit auch die Leptin-Konzentration. Leptin wirkt nicht nur am Hypothalamus, sondern auch an der Niere und Nebenniere. An der Nebennierenrinde stimuliert Leptin direkt die Aldosteron-Ausschüttung (Huby et al. 2015). Außerdem zeigten *in vitro* Experimente, dass Mesangialzellen durch Leptin vermehrt TGF- β 1, Fibronectin und Kollagen Typ IV exprimierten (Cui et al. 2013). Es wurden somit leptin-vermittelt pro-fibrotische Prozesse in Gang gesetzt. Auch *in vivo* führten drei wöchige Dauerinfusionen mit Leptin bei Ratten zu einer gesteigerten TGF- β - und Kollagen-IV-Expression. Außerdem trat eine Proteinurie auf (Wolf et al. 1999). An durch Gentamicin induzierte apoptotische Tubuluszellen von Ratten führte eine kurze Exposition mit Leptin

(< 24 Stunden) zu einer Verminderung der Apoptose (Chen et al. 2011). Eine längere Exposition (> 48 Stunden) mit Leptin, wie es auch bei übergewichtigen Menschen der Fall wäre, aggravierte über eine vermehrte Expression von Cyclooxygenase-2 (COX-2) und Prostaglandin E2 (PGE2) die Apoptose. Im Mausmodell traten nach zehn Tagen Exposition gleiche Ergebnisse auf (Hsu et al. 2012). Interessanterweise führt ein durch Scherkräfte verursachter Stress bei Podozyten ebenfalls zu einer Aktivierung COX-2 und PGE2-Expression (Srivastava et al. 2014). Möglicherweise können Hyperfiltration und ein erhöhter Körperfettanteil synergistisch die Niere schädigen.

Ein anderes Adipokin ist Adiponektin. Es hat eine anti-inflammatorische und eine protektive Wirkung gegenüber oxidativem Stress, hemmt die hepatische Glukoneogenese, stimuliert die Oxidation von freien Fettsäuren und wirkt anti-diabetogen (Yamauchi et al. 2007). Jedoch wird der Adiponektin-Spiegel i. S. durch Angiotensin II gesenkt (Ran et al. 2006). Da ANGII u. a. auch von Adipozyten exprimiert wird (siehe oben), sinkt mit Zunahme des Körperfettanteils die Adiponektin-Konzentration. Bei adipösen Menschen sind die Adiponektin-Serumspiegel signifikant niedriger als bei normalgewichtigen Menschen (Arita et al. 1999). Adiponektin scheint eine nephroprotektive Wirkung zu haben. In einem Adiponektin Knock-out-Mausmodell kam es zu einer Verplumpung und Verbreiterung der Podozyten-Fortsätze mit konsekutiver Albuminurie, ähnlich wie es auch beim Alport-Syndrom auftritt. Durch Verabreichung von Adiponektin verschwand die Albuminurie wieder und die Podozyten-Morphologie verbesserte sich (Sharma et al. 2008). In einem anderen Experiment an 5/6-nephrektomierten Adiponektin-Knock-out-Mäusen verhinderte die Gabe von Adiponektin die Nierenfibrose und milderte die Albuminurie nach der Nierenteilresektion ab. Die Autoren Ohashi et al. (2007) gehen davon aus, dass nach einer (partiellen) Uninephrektomie Adiponektin in dem verbliebenen Nierengewebe akkumuliert und dort durch Hemmung von Inflammation und oxidativem Stress nephroprotektiv wirkt.

Eine Übersicht der Wirkungen der RAAS-Komponenten und Adipokine des Fettgewebes ist in Abbildung 22 zu sehen.

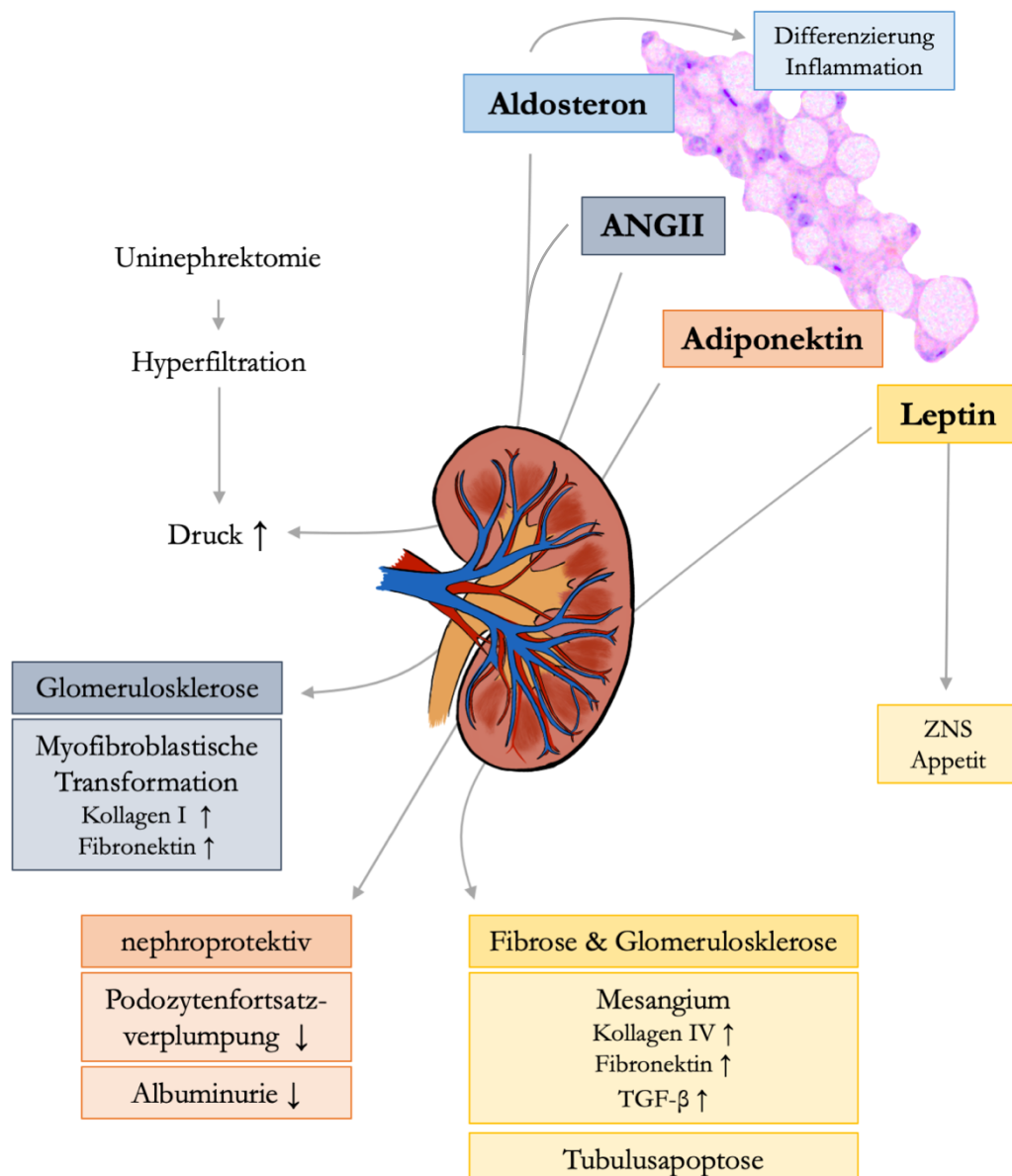


Abbildung 22 Wirkung des Fettgewebes auf die Niere - Übersicht

Schematisch ist die Wirkung der einzelnen RAAS-Komponenten und der Adipokine dargestellt, die vom Fettgewebe sezerniert werden. Durch eine Uninephrektomie kommt es zu einer Hyperfiltration und zu einem Druckanstieg im Glomerulus. Durch Steigerung des systemischen Blutdrucks durch Aldosteron und ANGII wird der glomeruläre Druck zusätzlich erhöht. Des Weiteren ist Aldosteron an der Differenzierung von Fettgewebe und dessen Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen beteiligt. ANGII bewirkt eine myofibroblastische Transformation im Glomerulus mit einer vermehrten Expression von Kollagen Typ I und Fibronectin. Auch Leptin steigert die Expression von Fibronectin und Kollagen Typ IV im Mesangium. Es aggraviert über TGF- β fibrotische Prozesse in der Niere und induziert eine Tubulusapoptose. Im zentralen Nervensystem (ZNS) hemmt es den Appetit. Bei Übergewicht kommt es durch eine zentrale Leptin-Resistenz zu einer Enthemmung des Appetits. Adiponektin ist das einzige bekannte nephroprotektive Adipokin und ist wichtig für die Integrität und Funktion der Schlitzmembran.

Wären die Mäuse der Fett-Gruppe übergewichtig geworden, was zu einer Abnahme des Adiponektin-Spiegels geführt hätte, wäre es möglicherweise zur signifikanten Steigerung der Proteinurie und Schädigung des glomerulären Filters gekommen. Gerade bei einer vorgeschädigten Basalmembran wären die Auswirkungen möglicherweise noch dramatischer gewesen. Durch ANGII und Aldosteron, die vom Fettgewebe vermehrt ausgeschüttet worden wäre, wäre möglicherweise die Hyperfiltration noch verstärkt worden und die Glomerulosklerose und interstitielle Fibrose ausgeprägter gewesen. Es zeigten sich jedoch schon erste Hinweise auf pro-fibrotische Effekte der fettreichen Ernährung, die möglicherweise durch ANGII, Aldosteron und/ oder Leptin vermittelt wurden. Dabei waren vor allem Mäuse mit einer vorgeschädigten Niere betroffen. Das Experiment sollte ggf. nochmal an adipösen Mäusen durchgeführt werden, damit die Indizien dieses Experiment bestätigt werden können.

4.2.4 Laminin-Score

Der Zusammenhang zwischen Übergewicht und Laminin als Bestandteil der glomerulären Basalmembran wurde bisher noch nicht untersucht. Physiologischerweise wird im Glomerulus zunächst fetales Laminin-111 exprimiert. Ähnlich wie es bei Kollagen Typ IV der Fall ist, wird im Verlauf das Laminin-111 gegen adultes Laminin-521 in der Basalmembran des Glomerulus ausgetauscht (Miner 1998; Miner et al. 1997). Beim Alport-Syndrom kommt es zu einer vermehrten Ablagerung von Laminin-111 in der glomerulären Basalmembran und dadurch zur Basalmembranverdickung (Kashtan et al. 2001). Um herauszufinden, ob durch Genpolymorphismen und/ oder äußere Einflussfaktoren wie eine fettreiche Ernährung die GBM so geschädigt wird, dass es auch bei heterozygoten Alport-Mäusen zur Laminin-111 Ablagerung kommt, wurde Laminin-111 immunhistochemisch angefärbt. Eine vermehrte Ablagerung ließ sich jedoch nicht feststellen. Es zeigte sich lediglich in der zehnfachen Vergrößerung bei den *NPHS2^{+ / R140Q}*-Mäusen der Fett-Gruppe eine signifikant stärkere Matrixakkumulation als in der NEPH-Gruppe. Es ist schwierig zu unterscheiden, ob dies ein zufälliger Effekt ist oder ob die fettreiche Ernährung zu einer vermehrten Ablagerung von Laminin-111 geführt hat. Wie oben schon beschrieben, kommt es durch ANGII und durch Leptin zu einer vermehrten Ablagerung von Kollagen Typ I und IV (Cui et al. 2013; Kagami et al. 1994). Durch eine Wiederholung des Experiments mit übergewichtigen Mäusen könnte festgestellt werden, ob Übergewicht bei heterozygoten Alport-Mäusen zu pathologischen Ablagerungen in der GBM führt. Die Ergebnisse des Laminin-Scores sind eher nicht aussagekräftig und zum Teil sogar widersprüchlich, da die Wildtyp-Mäuse der NEPH-Gruppe höher gescored wurden als die *NPHS2^{+ / R140Q}*-Mäuse.

Bisher gibt es keine Literatur, die die Auswirkung von Übergewicht bei heterozygoten Alport-Patienten mit und ohne *Modifier*-Genvarianten untersucht. Übergewicht muss mittlerweile als Krankheit epidemiologischen Ausmaßes angesehen werden. Lange wurde der Zusammenhang zwischen Nierenfunktion und Übergewicht nur über die übergewicht-assozierten Erkrankungen wie arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus und Hyperlipidämie untersucht. Wie weiter oben beschrieben, wirkt Fettgewebe über das RAAS und die Hormone, die es ausschüttet, auch direkt an der Niere. In jedem Fall besteht eine Assoziation zwischen Übergewicht bzw. Adipositas und dem Auftreten einer chronischen Niereninsuffizienz (Hsu et al. 2006; Kramer et al. 2006; Mallamaci und Tripepi 2013; Mikolasevic et al. 2016). Ob Übergewicht oder Adipositas ein unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung einer chronischen Niereninsuffizienz ist, wird derzeit noch untersucht.

Um heterozygoten Alport-Patienten wissenschaftlich fundierte Empfehlungen geben zu können, sollte das Experiment wiederholt werden. Man könnte zusätzlich weitere wichtige Erkenntnisse über den Zusammenhang von Übergewicht und Nierenfunktion im Allgemeinen gewinnen. Im Wiederholungsexperiment sollte der Fettanteil des Futters für die Fett-Gruppe auf mindestens 40 % erhöht werden. Auch der Beobachtungszeitraum sollte verlängert werden, da laut Van Herck et al. (2017) erst nach zehn Wochen ein Übergewicht bei Mäusen zu erwarten ist. Weiterhin wäre es interessant zusätzlich die Expression und Konzentrationen der wichtigsten Hormone, die vom Fettgewebe sezerniert werden zu bestimmen (ANGII, Aldosteron, Adiponektin, Leptin). Eine Untersuchung der Nieren mittels Elektronenmikroskopie würde Veränderungen an Basalmembran und Podozyten sichtbar machen.

Sind die Auswirkungen von Übergewicht bei *COL4A3*^{+/-}-Mäusen mit und ohne *NPHS2*^{+/^{R140Q}}-Polymorphismus untersucht, könnten therapeutische Interventionen wie die Gabe von ACEi bei den übergewichtigen Mäusen untersucht werden, da es gut möglich ist, dass die negative Auswirkung des Fettgewebes auf die Niere über das RAAS damit unterbrochen würde.

5 Zusammenfassung

Das Alport-Syndrom ist eine hereditäre Nephritis, die bei den Betroffenen bereits zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr zu einer ESRD führt. Als einzige langfristige Therapieoption bleibt nur die Nierentransplantation. Da die Wartezeit derzeit in Deutschland ca. acht Jahre für eine Nierenspende beträgt, besteht in der betroffenen Familie häufig der Wunsch zur Lebendnierenspende. Ursächlich für das Alport-Syndrom sind Veränderungen in den *COL4A*-Genen, die für Bestandteile des Kollagen Typ IV $\alpha 3/4/5$ kodieren. In 85 % der Fälle wird das Alport-Syndrom X-chromosomal über das *COL4A5*-Gen vererbt. Damit ist die Mehrheit der Alport-Patienten männlich und Kinder heterozygoter Mütter. Obwohl die Mütter damit selbst ggf. vorgeschädigte Niere haben, möchten sie ihrem Kind helfen und eine Niere spenden. Wird die Spende durchgeführt, muss der Spender mit der Einzelniere das restliche Leben verbringen.

Die beschriebene Situation wurde im Mausmodell simuliert. Für das Experiment wurden *COL4A3*^{+/-}, *NPHS2*^{+/R140Q}- und doppelheterozygote Mäuse verwendet. Die Kontrollgruppe bestand aus Wildtyp-Mäusen. Ziel war es, die Auswirkung von fettreicher Ernährung bei heterozygoten Alport-Mäusen mit Einzelniere zu untersuchen. Es wurde außerdem der R140Q-Polymorphismus des *NPHS2*-Gens als mögliches *Modifier*-Gen untersucht. Es kodiert für das Protein Podocin, das Bestandteil der GBM ist. *Modifier*-Gene stehen unter Verdacht, den Verlauf bei Alport-Patienten maßgeblich zu beeinflussen und damit für eine starke Variabilität des Krankheitsverlaufs verantwortlich zu sein.

Die Mäuse wurden in drei Gruppen eingeteilt. Bei den Mäusen der NEPH- und Fett-Gruppe wurde um den 138. Lebenstag eine Niere entfernt. Die SHAM-Gruppe erhielt nur einen Bauchschnitt. Nach einer einwöchigen Eingewöhnungsphase erhielten die Mäuse der Fett-Gruppe Nacktmausfutter mit einem höheren Fettanteil. Die Kontrollgruppen erhielt weiterhin das Standard Haltungsfutter. Während des gesamten Experiments wurden regelmäßig Urinproben gesammelt und das Gewicht bestimmt. Um den 180. Lebenstag wurden die Mäuse mittels kraniozervikaler Dislokation getötet und Blutproben, Niere(en) und Leber entnommen.

Zur Beurteilung der metabolischen Veränderungen durch die fettreiche Ernährung wurde das Körpergewicht, die Cholesterin-Konzentration i. S. und der Grad der Leberverfettung beurteilt. Das Körpergewicht und der Grad der Leberverfettung der Fett-Gruppe unterschied sich nicht signifikant von den Kontrollgruppen. Die Cholesterin-Konzentration i. S. lag bei den Fett-Mäusen ca. 30 % über der der SHAM- und ca. 23 % über der der NEPH-Gruppe. Da in beiden Futtersorten kein Cholesterin enthalten war, muss durch die Diät vom Körper mehr Cholesterin synthetisiert worden sein. Beim Menschen sind maximal 30 % des Cholesterin-Spiegels durch die Ernährung beeinflussbar, sodass möglicherweise ein maximaler Effekt erzielt worden ist.

Die fettreiche Ernährung wirkte sich auch auf die Nierenfunktion aus. Obwohl die Fett-Mäuse kein signifikantes Übergewicht entwickelten, wurde die *COL4A3*^{+/-}-, die *NPHS2*^{+ / R140Q}- und die doppelheterozygoten Mäuse im Fibronectin-Score signifikant höher gescort als in der NEPH-Gruppe. Demnach kam es ernährungsbedingt zu einer vermehrten interstitiellen Fibrose und Glomerulosklerose. Eine mögliche Erklärung sind die vom Fettgewebe ausgeschütteten Hormone. So exprimiert Fettgewebe RAAS-Komponenten und Adipokine. U. a. haben ANGII und das Adipokin Leptin eine pro-fibrotische Wirkung in der Niere, indem sie die Expression von Kollagen Typ I, IV und Fibronectin steigern. Bei Übergewicht wird die Ausschüttung des Adipokins Adiponektin supprimiert. Adiponektin hat auf Grund seiner anti-inflammatorischen und anti-oxidativen Eigenschaften eine nephroprotektive Wirkung. Außerdem scheint es wichtig für Integrität der glomerulären Schlitzmembran zu sein. Bevor äußerliche Veränderungen sichtbar wurden, hat sich durch die fettreiche Ernährung möglicherweise schon vermehrt viszerales Fettgewebe gebildet oder die Hormon-Sekretion des Fettgewebes verändert. Damit einhergehend stieg bei den Mäusen der Fett-Gruppe die Harnstoff-Konzentration i. S. signifikant im Vergleich zur SHAM- und zur NEPH-Gruppe an. Die SHAM- und die NEPH-Gruppe unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Die Harnstoff-Konzentration i. S. ist ein Nierenfunktionsparameter. Die fettreiche Ernährung hatte also möglicherweise einen negativen Einfluss auf die Nierenfunktion. Tendenziell stieg die Harnstoff-Konzentration i. S. auch durch die Uninephrektomie an, auch wenn sich kein signifikanter Unterschied ergab. Eine weitere Ursache wäre jedoch auch der höhere Proteinanteil im Nacktmausfutter, da Harnstoff ein Endprodukt des Aminosäure-Stoffwechsels ist und mit einer erhöhten Proteinzufuhr auch die Harnstoff-Synthese steigt. Der Proteinanteil des Nacktmausfutters lag 6 % über dem des Standard Haltungsfutters. Ein signifikanter Unterschied in der Proteinurie konnte gruppen- oder genotyp-abhängig nicht festgestellt werden. Auch eine vermehrte Akkumulation von Laminin-111 in der GBM, wie es typisch für das Alport-Syndrom ist, konnte nicht festgestellt werden.

Ansatzweise konnte also gezeigt werden, dass eine Einzelniere gerade mit Vorschädigung durch eine fettreiche Ernährung negativ beeinflusst werden kann, sogar noch bevor ein sichtbares Übergewicht auftritt. Durch einfache Maßnahmen wie eine Ernährungsumstellung und körperliche Aktivität kann möglicherweise die Einzelniere nach Nierenspende bei heterozygoten Alport-Patienten effektiv geschützt werden. 1 % der Bevölkerung sind heterozygot für das Alport-Syndrom. Weltweit steigt die Prävalenz von Übergewicht. Daher ist es essenziell, den Einfluss von fettreicher Ernährung und Übergewicht auf (Einzel-)Nieren mit und ohne Risiko-Genvarianten weiter zu untersuchen, um Betroffenen wissenschaftlich fundierte Empfehlungen zukommen zu lassen und frühzeitig eine Therapie einzuleiten.

6 Literaturverzeichnis

Abdelmalek MF, Suzuki A, Guy C, Unalp-Arida A, Colvin R, Johnson RJ, Diehl AM, Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research N (2010): Increased fructose consumption is associated with fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 51, 1961-1971

Abrahamson DR (1986): Recent studies on the structure and pathology of basement membranes. *J Pathol* 149, 257-278

Abrahamson DR (1987): Structure and development of the glomerular capillary wall and basement membrane. *Am J Physiol* 253, F783-794

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

Ahmed A, Wong RJ, Harrison SA (2015): Nonalcoholic Fatty Liver Disease Review: Diagnosis, Treatment, and Outcomes. *Clin Gastroenterol Hepatol* 13, 2062-2070

Alport AC (1927): Hereditary Familial Congenital Haemorrhagic Nephritis. *Br Med J* 1, 504-506

Alves-Bezerra M, Cohen DE (2017): Triglyceride Metabolism in the Liver. *Compr Physiol* 8, 1-8

Alwahsh SM, Xu M, Schultze FC, Wilting J, Mihm S, Raddatz D, Ramadori G (2014): Combination of alcohol and fructose exacerbates metabolic imbalance in terms of hepatic damage, dyslipidemia, and insulin resistance in rats. *PLoS One* 9, e104220

Arai M, Wada A, Isaka Y, Akagi Y, Sugiura T, Miyazaki M, Moriyama T, Kaneda Y, Naruse K, Naruse M, et al. (1995): In vivo transfection of genes for renin and angiotensinogen into the glomerular cells induced phenotypic change of the mesangial cells and glomerular sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 206, 525-532

Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, et al. (1999): Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257, 79-83

Auwerx J, Staels B (1998): Leptin. *Lancet* 351, 737-742

Bagnasco SM (2005): Role and regulation of urea transporters. *Pflugers Arch* 450, 217-226

Barker DF, Hostikka SL, Zhou J, Chow LT, Oliphant AR, Gerken SC, Gregory MC, Skolnick MH, Atkin CL, Tryggvason K (1990): Identification of mutations in the COL4A5 collagen gene in Alport syndrome. *Science* 248, 1224-1227

Bataller R, Sancho-Bru P, Ginès P, Lora JM, Al-Garawi A, Solé M, Colmenero J, Nicolas JM, Jiménez W, Weich N, et al. (2003): Activated human hepatic stellate cells express the renin-angiotensin system and synthesize angiotensin II. *Gastroenterology* 125, 117-125

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

Bell PD, Lapointe JY, Sabirov R, Hayashi S, Peti-Peterdi J, Manabe K, Kovacs G, Okada Y (2003): Macula densa cell signaling involves ATP release through a maxi anion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4322-4327

Berg A, Bischoff SC, Colombo-Benkmann M, Ellrott T, Hauner H, Heintze C, Kanthak U, Kunze D, Stefan N, Teufel M, et al. (2014): Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur „Prävention und Therapie der Adipositas“ - Version 2.0.

Bhaskaran M, Reddy K, Radhakrishnan N, Franki N, Ding G, Singhal PC (2003): Angiotensin II induces apoptosis in renal proximal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 284, F955-965

Borém LMA, Neto JFR, Brandi IV, Lelis DF, Santos SHS (2018): The role of the angiotensin II type I receptor blocker telmisartan in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease: a brief review. *Hypertens Res* 41, 394-405

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

Bradley SE (1946): Biochemical abnormalities during renal insufficiency. *N Engl J Med* 235, 791-798

Brenner BM, Mackenzie HS (1997): Nephron mass as a risk factor for progression of renal disease. *Kidney Int Suppl* 63, S124-127

Brenner BM, Deen WM, Robertson CR (1976): Determinants of glomerular filtration rate. *Annu Rev Physiol* 38, 11-19

Bunag RD, Page IH, McCubbin JW (1966): Neural stimulation of release of renin. *Circ Res* 19, 851-858

Burke M, Pabbidi MR, Farley J, Roman RJ (2014): Molecular mechanisms of renal blood flow autoregulation. *Curr Vasc Pharmacol* 12, 845-858

Canella DS, Levy RB, Martins AP, Claro RM, Moubarac JC, Baraldi LG, Cannon G, Monteiro CA (2014): Ultra-processed food products and obesity in Brazilian households (2008-2009). *PLoS One* 9, e92752

CARDINAL-Studie (2017): A Phase 2/3 Trial of the Efficacy and Safety of Bardoxolone Methyl in Patients With Alport Syndrome - CARDINAL (NCT03019185); <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03019185>, abgerufen am 11.09.2020.

Carlstrom M, Wilcox CS, Arendshorst WJ (2015): Renal autoregulation in health and disease. *Physiol Rev* 95, 405-511

Carpenter CC, Davis JO, Ayers CR (1961): Relation of renin, angiotensin II, and experimental renal hypertension to aldosterone secretion. *J Clin Invest* 40, 2026-2042

Celsi G, Larsson L, Seri I, Savin V, Aperia A (1989): Glomerular adaptation in uninephrectomized young rats. *Pediatr Nephrol* 3, 280-285

Chagnac A, Weinstein T, Korzets A, Ramadan E, Hirsch J, Gafer U (2000): Glomerular hemodynamics in severe obesity. *Am J Physiol Renal Physiol* 278, F817-822

Chen HM, Liu ZH, Zeng CH, Li SJ, Wang QW, Li LS (2006): Podocyte lesions in patients with obesity-related glomerulopathy. *Am J Kidney Dis* 48, 772-779

Chen YC, Chen CH, Hsu YH, Chen TH, Sue YM, Cheng CY, Chen TW (2011): Leptin reduces gentamicin-induced apoptosis in rat renal tubular cells via the PI3K-Akt signaling pathway. *Eur J Pharmacol* 658, 213-218

Cheungpasitporn W, Thongprayoon C, O'Corragain OA, Edmonds PJ, Kittanamongkolchai W, Erickson SB (2014): Associations of sugar-sweetened and artificially sweetened soda with chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *Nephrology (Carlton)* 19, 791-797

Clark WR, Dehghani NL, Narsimhan V, Ronco C (2019): Uremic Toxins and their Relation to Dialysis Efficacy. *Blood Purif* 48, 299-314

Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L (2001): Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest* 108, 1875-1881

Cosgrove D, Liu S (2017): Collagen IV diseases: A focus on the glomerular basement membrane in Alport syndrome. *Matrix Biol* 57-58, 45-54

Cosgrove D, Rodgers K, Meehan D, Miller C, Bovard K, Gilroy A, Gardner H, Kotelianski V, Gotwals P, Amatucci A, et al. (2000): Integrin alpha1beta1 and transforming growth factor-beta1 play distinct roles in alport glomerular pathogenesis and serve as dual targets for metabolic therapy. *Am J Pathol* 157, 1649-1659

Cui W, Maimaitiyiming H, Qi X, Norman H, Wang S (2013): Thrombospondin 1 mediates renal dysfunction in a mouse model of high-fat diet-induced obesity. *Am J Physiol Renal Physiol* 305, F871-880

Dagher H, Buzza M, Colville D, Jones C, Powell H, Fassett R, Wilson D, Agar J, Savige J (2001): A comparison of the clinical, histopathologic, and ultrastructural phenotypes in carriers of X-linked and autosomal recessive Alport's syndrome. *Am J Kidney Dis* 38, 1217-1228

Endlich N, Kress KR, Reiser J, Uttenweiler D, Kriz W, Mundel P, Endlich K (2001): Podocytes respond to mechanical stress in vitro. *J Am Soc Nephrol* 12, 413-422

Engeli S, Böhnke J, Gorzelniak K, Janke J, Schling P, Bader M, Luft FC, Sharma AM (2005): Weight loss and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Hypertension* 45, 356-362

ERA-EDTA Registry: ERA-EDTA Registry Annual Report 2017. hrsg. v.: Amsterdam UMC IA, Department of Medical Informatics. ERA-EDTA Amsterdam 2019

Eurotransplant (2020a): Active Kidney Waitinglist 2020; <https://statistics.eurotransplant.org/reportloader.php?report=56893-6141-5854&format=pdf&download=1>, abgerufen am 16.06.2020.

Eurotransplant (2020b): Transplants in Germany 2020; <https://statistics.eurotransplant.org/reportloader.php?report=56077-6010&format=pdf&download=1>, abgerufen am 16.06.2020.

Finlayson JS, Asofsky R, Potter M, Runner CC (1965): Major urinary protein complex of normal mice: origin. *Science* 149, 981-982

Forster RP, Maes JP (1947): Effect of experimental neurogenic hypertension on renal blood flow and glomerular filtration rates in intact denervated kidneys of unanesthetized rabbits with adrenal glands demedullated. *Am J Physiol* 150, 534-540

Frese J, Kettwig M, Zappel H, Hofer J, Grone 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

Friedrich C, Endlich N, Kriz W, Endlich K (2006): Podocytes are sensitive to fluid shear stress in vitro. *Am J Physiol Renal Physiol* 291, F856-865

Funk SD, Lin MH, Miner JH (2018): Alport syndrome and Pierson syndrome: Diseases of the glomerular basement membrane. *Matrix Biol* 71-72, 250-261

Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR (2010): Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol* 316, 129-139

Garg AX, Muirhead N, Knoll G, Yang RC, Prasad GV, Thiessen-Philbrook H, Rosas-Arellano MP, Housawi A, Boudville N, Donor Nephrectomy Outcomes Research Network (2006): Proteinuria and reduced kidney function in living kidney donors: A systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *Kidney Int* 70, 1801-1810

Gauthier MS, Favier R, Lavoie JM (2006): Time course of the development of non-alcoholic hepatic steatosis in response to high-fat diet-induced obesity in rats. *Br J Nutr* 95, 273-281

Gibson J, Gilbert RD, Bunyan DJ, Angus EM, Fowler DJ, Ennis S (2013): Exome analysis resolves differential diagnosis of familial kidney disease and uncovers a potential confounding variant. *Genet Res (Camb)* 95, 165-173

Gomez IG, MacKenna DA, Johnson BG, Kaimal V, Roach AM, Ren S, Nakagawa N, Xin C, Newitt R, Pandya S, et al. (2015): Anti-microRNA-21 oligonucleotides prevent Alport nephropathy progression by stimulating metabolic pathways. *J Clin Invest* 125, 141-156

Gordon S (2003): Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3, 23-35

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 Suppl 4, iv124-130

Gross O, Weber M, Fries JW, Muller 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 (2012a): Safety and Efficacy of the ACE-Inhibitor Ramipril in Alport Syndrome: The Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled, Multicenter Phase III EARLY PRO-TECT Alport Trial in Pediatric Patients. *ISRN Pediatr* 2012, 436046

Gross O, Girgert R, Beirowski B, Kretzler M, Kang HG, Kruegel J, Miosge N, Busse AC, Segerer S, Vogel WF, et al. (2010): Loss of collagen-receptor DDR1 delays renal fibrosis in hereditary type IV collagen disease. *Matrix Biol* 29, 346-356

Gross O, Licht C, Anders HJ, Hoppe B, Beck B, Tönshoff B, Höcker B, Wygoda S, Ehrich JH, Pape L, et al. (2012b): Early angiotensin-converting enzyme inhibition in Alport syndrome delays renal failure and improves life expectancy. *Kidney Int* 81, 494-501

Grundy SM (2016): Does Dietary Cholesterol Matter? *Curr Atheroscler Rep* 18, 68

Guo C, Ricchiuti V, Lian BQ, Yao TM, Coutinho P, Romero JR, Li J, Williams GH, Adler GK (2008): Mineralocorticoid receptor blockade reverses obesity-related changes in expression of adiponectin, peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, and proinflammatory adipokines. *Circulation* 117, 2253-2261

Hackenthal E, Paul M, Ganten D, Taugner R (1990): Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev* 70, 1067-1116

Hamano Y, Grunkemeyer JA, Sudhakar A, Zeisberg M, Cosgrove D, Morello R, Lee B, Sugimoto H, Kalluri R (2002): Determinants of vascular permeability in the kidney glomerulus. *J Biol Chem* 277, 31154-31162

Heidet L, Gubler MC (2009): The renal lesions of Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol* 20, 1210-1215

Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM (1993): Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259, 87-91

Hsu CY, McCulloch CE, Iribarren C, Darbinian J, Go AS (2006): Body mass index and risk for end-stage renal disease. *Ann Intern Med* 144, 21-28

Hsu YH, Cheng CY, Chen YC, Chen TH, Sue YM, Tsai WL, Chen CH (2012): Long-term leptin treatment exerts a pro-apoptotic effect on renal tubular cells via prostaglandin E2 augmentation. *Eur J Pharmacol* 689, 65-71

Huang C, Bruggeman LA, Hydo LM, Miller RT (2012): Shear stress induces cell apoptosis via a c-Src-phospholipase D-mTOR signaling pathway in cultured podocytes. *Exp Cell Res* 318, 1075-1085

Huby AC, Antonova G, Groenendyk J, Gomez-Sanchez CE, Bollag WB, Filosa JA, Belin de Chantemele EJ (2015): Adipocyte-Derived Hormone Leptin Is a Direct Regulator of Aldosterone Secretion, Which Promotes Endothelial Dysfunction and Cardiac Fibrosis. *Circulation* 132, 2134-2145

Hudson BG (2004): The molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes: beacons for the discovery of the collagen IV family. *J Am Soc Nephrol* 15, 2514-2527

Hudson BG, Tryggvason K, Sundaramoorthy M, Neilson EG (2003): Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. *N Engl J Med* 348, 2543-2556

Ingelsson E, Pencina MJ, Tofler GH, Benjamin EJ, Lanier KJ, Jacques PF, Fox CS, Meigs JB, Levy D, Larson MG, et al. (2007): Multimarker approach to evaluate the incidence of the metabolic syndrome and longitudinal changes in metabolic risk factors: the Framingham Offspring Study. *Circulation* 116, 984-992

Ito M, Suzuki J, Tsujioka S, Sasaki M, Gomori A, Shirakura T, Hirose H, Ito M, Ishihara A, Iwaasa H, et al. (2007): Longitudinal analysis of murine steatohepatitis model induced by chronic exposure to high-fat diet. *Hepato Res* 37, 50-57

Ix JH, Sharma K (2010): Mechanisms linking obesity, chronic kidney disease, and fatty liver disease: the roles of fetuin-A, adiponectin, and AMPK. *J Am Soc Nephrol* 21, 406-412

Jais JP, Knebelmann B, Giatras I, De Marchi M, Rizzoni G, Renieri A, Weber M, Gross O, Netzer KO, Flinter F, et al. (2000): X-linked Alport syndrome: natural history in 195 families and genotype-phenotype correlations in males. *J Am Soc Nephrol* 11, 649-657

Jenkins DJ, Kendall CW, Marchie A, Faulkner DA, Wong JM, de Souza R, Emam A, Parker TL, Vidgen E, Lapsley KG, et al. (2003): Effects of a dietary portfolio of cholesterol-lowering foods vs lovastatin on serum lipids and C-reactive protein. *JAMA* 290, 502-510

Kagami S (2012): Involvement of glomerular renin-angiotensin system (RAS) activation in the development and progression of glomerular injury. *Clin Exp Nephrol* 16, 214-220

Kagami S, Border WA, Miller DE, Noble NA (1994): Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor-beta expression in rat glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 93, 2431-2437

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

Kaps L, Labenz C, Galle PR, Weinmann-Menke J, Kostev K, Schattenberg JM (2020): Non-alcoholic fatty liver disease increases the risk of incident chronic kidney disease. *United European Gastroenterol J*, 2050640620944098

Karlsson C, Lindell K, Ottosson M, Sjostrom L, Carlsson B, Carlsson LM (1998): Human adipose tissue expresses angiotensinogen and enzymes required for its conversion to angiotensin II. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 3925-3929

Kashtan CE: Alport Syndrome. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, Amemiya A (Hrsg): GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA) 1993, updated 21.02.2019

Kashtan CE, Kim Y, Lees GE, Thorner PS, Virtanen I, Miner JH (2001): Abnormal glomerular basement membrane laminins in murine, canine, and human Alport syndrome: aberrant laminin alpha2 deposition is species independent. *J Am Soc Nephrol* 12, 252-260

Kawamoto R, Kikuchi A, Akase T, Ninomiya D, Kasai Y, Ohtsuka N, Kumagi T (2020): Increased body mass index above the upper normal limit is significantly associated with renal dysfunction among community-dwelling persons. *Int Urol Nephrol* 52, 1533-1541

Kramer HJ, Saranathan A, Luke A, Durazo-Arvizu RA, Guichan C, Hou S, Cooper R (2006): Increasing body mass index and obesity in the incident ESRD population. *J Am Soc Nephrol* 17, 1453-1459

Kretzler M, Koeppen-Hagemann I, Kriz W (1994): Podocyte damage is a critical step in the development of glomerulosclerosis in the uninephrectomised-desoxycorticosterone hypertensive rat. *Virchows Arch* 425, 181-193

Kruegel J, Rubel D, Gross O (2013): Alport syndrome--insights from basic and clinical research. *Nat Rev Nephrol* 9, 170-178

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

Lentine KL, Kasiske BL, Levey AS, Adams PL, Alberú J, Bakr MA, Gallon L, Garvey CA, Guleria S, Li PK, et al. (2017): KDIGO Clinical Practice Guideline on the Evaluation and Care of Living Kidney Donors. *Transplantation* 101, 1-109

Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, Giacca A (2002): Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev* 23, 201-229

Locke JE, Reed RD, Massie A, MacLennan PA, Sawinski D, Kumar V, Mehta S, Mannon RB, Gaston R, Lewis CE, et al. (2017): Obesity increases the risk of end-stage renal disease among living kidney donors. *Kidney Int* 91, 699-703

Logan DW, Marton TF, Stowers L (2008): Species specificity in major urinary proteins by parallel evolution. *PLoS One* 3, e3280

Longo I, Porcedda P, Mari F, Giachino D, Meloni I, Deplano C, Brusco A, Bosio M, Massella L, Lavoratti G, et al. (2002): COL4A3/COL4A4 mutations: from familial hematuria to autosomal-dominant or recessive Alport syndrome. *Kidney Int* 61, 1947-1956

Ma LJ, Corsa BA, Zhou J, Yang H, Li H, Tang YW, Babaev VR, Major AS, Linton MF, Fazio S, et al. (2011): Angiotensin type 1 receptor modulates macrophage polarization and renal injury in obesity. *Am J Physiol Renal Physiol* 300, F1203-1213

Mach F, Baigent C, Catapano AL, Koskinas KC, Casula M, Badimon L, Chapman MJ, De Backer GG, Delgado V, Ference BA, et al. (2019): 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk: The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and European Atherosclerosis Society (EAS). *European Heart Journal* 41, 111-188

Mallamaci F, Tripepi G (2013): Obesity and CKD progression: hard facts on fat CKD patients. *Nephrol Dial Transplant* 28 Suppl 4, iv105-108

Mantovani A, Zaza G, Byrne CD, Lonardo A, Zoppini G, Bonora E, Targher G (2018): Nonalcoholic fatty liver disease increases risk of incident chronic kidney disease: A systematic review and meta-analysis. *Metabolism* 79, 64-76

Marcuccilli M, Chonchol M (2016): NAFLD and Chronic Kidney Disease. *Int J Mol Sci* 17, 562

Maroni BJ, Steinman TI, Mitch WE (1985): A method for estimating nitrogen intake of patients with chronic renal failure. *Kidney Int* 27, 58-65

Matsubara M, Maruoka S, Katayose S (2002): Inverse relationship between plasma adiponectin and leptin concentrations in normal-weight and obese women. *Eur J Endocrinol* 147, 173-180

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

Mendonca RD, Pimenta AM, Gea A, de la Fuente-Arrillaga C, Martinez-Gonzalez MA, Lopes AC, Bes-Rastrollo M (2016): Ultraprocessed food consumption and risk of overweight and

obesity: the University of Navarra Follow-Up (SUN) cohort study. *Am J Clin Nutr* 104, 1433-1440

Michelotti GA, Machado MV, Diehl AM (2013): NAFLD, NASH and liver cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10, 656-665

Mikolasevic I, Milic S, Turk Wensveen T, Grgic I, Jakopcic I, Stimac D, Wensveen F, Orlic L (2016): Nonalcoholic fatty liver disease - A multisystem disease? *World J Gastroenterol* 22, 9488-9505

Miner JH (1998): Developmental biology of glomerular basement membrane components. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 7, 13-19

Miner JH, Sanes JR (1994): Collagen IV alpha 3, alpha 4, and alpha 5 chains in rodent basal laminae: sequence, distribution, association with laminins, and developmental switches. *J Cell Biol* 127, 879-891

Miner JH, Patton BL, Lentz SI, Gilbert DJ, Snider WD, Jenkins NA, Copeland NG, Sanes JR (1997): The laminin alpha chains: expression, developmental transitions, and chromosomal locations of alpha1-5, identification of heterotrimeric laminins 8-11, and cloning of a novel alpha3 isoform. *J Cell Biol* 137, 685-701

Mochizuki T, Lemmink HH, Mariyama M, Antignac C, Gubler MC, Pirson Y, Verellen-Dumoulin C, Chan B, Schröder CH, Smeets HJ, et al. (1994): Identification of mutations in the alpha 3(IV) and alpha 4(IV) collagen genes in autosomal recessive Alport syndrome. *Nat Genet* 8, 77-81

Moschidou D, Corcelli M, Hau KL, Ekwalla VJ, Behmoaras JV, De Coppi P, David AL, Bou-Gharios G, Cook HT, Pusey CD, et al. (2016): Human Chorionic Stem Cells: Podocyte Differentiation and Potential for the Treatment of Alport Syndrome. *Stem Cells Dev* 25, 395-404

Musso G, Cassader M, Cohnen S, Pinach S, Saba F, Gambino R (2015): Emerging Liver-Kidney Interactions in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Trends Mol Med* 21, 645-662

NCD Risk Factor Collaboration (2016): Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *Lancet* 387, 1377-1396

OECD (2017): Health at a Glance 2017: OECD Indicators, OECD Publishing, Paris. http://dx.doi.org/10.1787/health_glance-2017-en.

Ohashi K, Iwatani H, Kihara S, Nakagawa Y, Komura N, Fujita K, Maeda N, Nishida M, Katsube F, Shimomura I, et al. (2007): Exacerbation of albuminuria and renal fibrosis in subtotal renal ablation model of adiponectin-knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 1910-1917

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

Pieri M, Stefanou C, Zaravinos A, Erguler K, Stylianou K, Lapathitis G, Karaiskos C, Savva I, Paraskeva R, Dweep H, et al. (2014): Evidence for activation of the unfolded protein response in collagen IV nephropathies. *J Am Soc Nephrol* 25, 260-275

Pierides A, Voskarides K, Athanasiou Y, Ioannou K, Damianou L, Arsali M, Zavros M, Pierides M, Vargemezis V, Patsias C, et al. (2009): Clinico-pathological correlations in 127 patients in 11 large pedigrees, segregating one of three heterozygous mutations in the COL4A3/ COL4A4 genes associated with familial haematuria and significant late progression to proteinuria and chronic kidney disease from focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 24, 2721-2729

Pollak MR, Quaggin SE, Hoenig MP, Dworkin LD (2014): The glomerulus: the sphere of influence. *Clin J Am Soc Nephrol* 9, 1461-1469

Ponticelli C, Moroni G, Glasscock RJ (2014): De novo glomerular diseases after renal transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol* 9, 1479-1487

Poti JM, Braga B, Qin B (2017): Ultra-processed Food Intake and Obesity: What Really Matters for Health-Processing or Nutrient Content? *Curr Obes Rep* 6, 420-431

Prentice AM, Jebb SA (2003): Fast foods, energy density and obesity: a possible mechanistic link. *Obes Rev* 4, 187-194

Ran J, Hirano T, Fukui T, Saito K, Kageyama H, Okada K, Adachi M (2006): Angiotensin II infusion decreases plasma adiponectin level via its type 1 receptor in rats: an implication for hypertension-related insulin resistance. *Metabolism* 55, 478-488

Roeb E, Steffen HM, Bantel H, Baumann U, Canbay A, Demir M, Drebber U, Geier A, Hampe J, Hellerbrand C, et al. (2015): S2k Guideline non-alcoholic fatty liver disease. *Z Gastroenterol* 53, 668-723

Rondinone CM, Rodbard D, Baker ME (1993): Aldosterone stimulated differentiation of mouse 3T3-L1 cells into adipocytes. *Endocrinology* 132, 2421-2426

Rosenberg AZ, Kopp JB (2017): Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Clin J Am Soc Nephrol* 12, 502-517

Rosenheck R (2008): Fast food consumption and increased caloric intake: a systematic review of a trajectory towards weight gain and obesity risk. *Obes Rev* 9, 535-547

Ruster C, Wolf G (2011): Angiotensin II as a morphogenic cytokine stimulating renal fibrogenesis. *J Am Soc Nephrol* 22, 1189-1199

Savigne 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

Sayers R, Kalluri R, Rodgers KD, Shield CF, Meehan DT, Cosgrove D (1999): Role for transforming growth factor-beta1 in alport renal disease progression. *Kidney Int* 56, 1662-1673

Schermer B, Benzing T (2009): Lipid-protein interactions along the slit diaphragm of podocytes. *J Am Soc Nephrol* 20, 473-478

Schienkiewitz A, Brettschneider A-K, Damerow S, Schaffrath Rosario A (2018): Overweight and obesity among children and adolescents in Germany. Results of the cross-sectional KiGGS Wave 2 study and trends. *Journal of Health Monitoring* 3, 15-22

Sellmann C, Priebs J, Landmann M, Degen C, Engstler AJ, Jin CJ, Gattner S, Spruss A, Huber O, Bergheim I (2015): Diets rich in fructose, fat or fructose and fat alter intestinal barrier function and lead to the development of nonalcoholic fatty liver disease over time. *J Nutr Biochem* 26, 1183-1192

Serrano OK, Sengupta B, Bangdiwala A, Vock DM, Dunn TB, Finger EB, Pruett TL, Matas AJ, Kandaswamy R (2018): Implications of excess weight on kidney donation: Long-term consequences of donor nephrectomy in obese donors. *Surgery* 164, 1071-1076

Sharma K, Ramachandrarao S, Qiu G, Usui HK, Zhu Y, Dunn SR, Ouedraogo R, Hough K, McCue P, Chan L, et al. (2008): Adiponectin regulates albuminuria and podocyte function in mice. *J Clin Invest* 118, 1645-1656

Skott O, Briggs JP (1987): Direct demonstration of macula densa-mediated renin secretion. *Science* 237, 1618-1620

Srivastava T, Hariharan S, Alon US, McCarthy ET, Sharma R, El-Meanawy A, Savin VJ, Sharma M (2018): Hyperfiltration-mediated Injury in the Remaining Kidney of a Transplant Donor. *Transplantation* 102, 1624-1635

Srivastava T, Alon US, Cudmore PA, Tarakji B, Kats A, Garola RE, Duncan RS, McCarthy ET, Sharma R, Johnson ML, et al. (2014): Cyclooxygenase-2, prostaglandin E2, and prostanoid receptor EP2 in fluid flow shear stress-mediated injury in the solitary kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 307, F1323-1333

Te Riet L, van Esch JH, Roks AJ, van den Meiracker AH, Danser AH (2015): Hypertension: renin-angiotensin-aldosterone system alterations. *Circ Res* 116, 960-975

Temme J, Kramer A, Jager KJ, Lange K, Peters F, Müller G-A, Kramar R, Heaf JG, Finne P, Palsson R, et al. (2012): Outcomes of male patients with Alport syndrome undergoing renal replacement therapy. *Clin J Am Soc Nephrol* 7, 1969-1976

Torra R, Furlano M (2019): New therapeutic options for Alport syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 34, 1272-1279

Tryggvason K, Wartiovaara J (2005): How does the kidney filter plasma? *Physiology (Bethesda)* 20, 96-101

Van Herck MA, Vonghia L, Francque SM (2017): Animal Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease-A Starter's Guide. *Nutrients* 9, 1072

Vaziri ND (2016): Disorders of lipid metabolism in nephrotic syndrome: mechanisms and consequences. *Kidney Int* 90, 41-52

Vecchiola A, Lagos CF, Carvajal CA, Baudrand R, Fardella CE (2016): Aldosterone Production and Signaling Dysregulation in Obesity. *Curr Hypertens Rep* 18, 20

Viridis A, Duranti E, Rossi C, Dell'Agnello U, Santini E, Anselmino M, Chiarugi M, Taddei S, Solini A (2015): Tumour necrosis factor- α participates on the endothelin-1/nitric oxide imbalance in small arteries from obese patients: role of perivascular adipose tissue. *Eur Heart J* 36, 784-794

Vizjak A, Ferluga D (2008): Spectrum of collagen type IV nephropathies: from thin basement membrane nephropathy to Alport syndrome. *Srp Arh Celok Lek* 136 Suppl 4, 323-326

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 D, Mohammad M, Wang Y, Tan R, Murray LS, Ricardo S, Dagher H, van Agtmael T, Savige J (2017): The Chemical Chaperone, PBA, Reduces ER Stress and Autophagy and

Increases Collagen IV alpha5 Expression in Cultured Fibroblasts From Men With X-Linked Alport Syndrome and Missense Mutations. *Kidney Int Rep* 2, 739-748

Wang ZV, Scherer PE (2016): Adiponectin, the past two decades. *J Mol Cell Biol* 8, 93-100

Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. (2003): Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112, 1796-1808

WHO World Health Organisation (2020): Obesity and overweight; <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>, abgerufen am 22.08.2020.

Williamson DA (1961): Alport's syndrome of hereditary nephritis with deafness. *Lancet* 2, 1321-1323

Wolf G, Hamann A, Han DC, Helmchen U, Thaiss F, Ziyadeh FN, Stahl RA (1999): Leptin stimulates proliferation and TGF-beta expression in renal glomerular endothelial cells: potential role in glomerulosclerosis. *Kidney Int* 56, 860-872

Yamauchi T, Nio Y, Maki T, Kobayashi M, Takazawa T, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Kawamoto S, Kubota N, Kubota T, et al. (2007): Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med* 13, 332-339

Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M (2016): Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 64, 73-84

Yuste C, Gutierrez E, Sevillano AM, Rubio-Navarro A, Amaro-Villalobos JM, Ortiz A, Egido J, Praga M, Moreno JA (2015): Pathogenesis of glomerular haematuria. *World J Nephrol* 4, 185-195

Zallocchi M, Johnson BM, Meehan DT, Delimont D, Cosgrove D (2013): alpha1beta1 integrin/Rac1-dependent mesangial invasion of glomerular capillaries in Alport syndrome. *Am J Pathol* 183, 1269-1280

Zenker M, Tralau T, Lennert T, Pitz S, Mark K, Madlon H, Dotsch J, Reis A, Muntefering H, Neumann LM (2004a): Congenital nephrosis, mesangial sclerosis, and distinct eye abnormalities with microcoria: an autosomal recessive syndrome. *Am J Med Genet A* 130A, 138-145

Zenker M, Aigner T, Wendler O, Tralau T, Muntefering H, Fenski R, Pitz S, Schumacher V, Royer-Pokora B, Wuhl E, et al. (2004b): Human laminin beta2 deficiency causes congenital nephrosis with mesangial sclerosis and distinct eye abnormalities. *Hum Mol Genet* 13, 2625-2632

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Oliver Gross, der schon viele Jahre in der Alport-Forschung eine Schlüsselrolle einnimmt. Er schenkte mir das Vertrauen, dieses Projekt umzusetzen. Wöchentlich informierte er sich über den Fortschritt des Experiments und stand mir mit wertvollen Ratschlägen und Anregungen zur Seite.

Ich danke außerdem Diana Rubel. Sie investierte etliche Stunden in die Planung und Umsetzung dieses Experiments. U. a. führte sie die Operationen durch und kümmerte sich anschließend um die Analgesie und das Wohl der Mäuse. Sie führte mich in die Methoden ein und ging mit mir auf Fehlersuche, wenn ein Versuch mal nicht auf Anhieb funktionierte. Ohne sie wäre das gesamte Projekt so nicht umsetzbar gewesen.

Außerdem danke ich meinen Doktorgeschwistern Dr. med. Stephan Benda und Marcus Brüggemann. Wir teilten uns die Betreuung der Mäuse, motivierten uns zum Weitermachen, wenn es mal nicht so lief wie geplant, und unterstützten uns gegenseitig bestmöglich.

Ich danke Heike Hühn und Kashan David, die einen Großteil der Genotypisierungen durchführten und die Grundversorgung des Labors sicherstellten.

Außerdem danke ich:

- Den Scornern des Fibronectin- und Laminin-Scores Prof. Dr. med. Oliver Gross, Dr. med. Ann-Kathrin Schäfer und Jan Böckhaus
- der klinischen Chemie der Universitätsmedizin Göttingen, die für uns die Blutanalysen durchführte.
- der AG Zeisberg und den Laboren der Pädiatrie für die Kooperation und Nutzung von Laborgeräten.
- den Tierärzten und -pflegern der zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen für die Betreuung unserer Versuchstiere.
- Dr. Fabian Kück aus dem Institut für medizinische Statistik, Göttingen als beratender Beistand während der statistischen Auswertung

Ich danke allen, die dazu beigetragen haben, dieses Experiment umzusetzen und diese Arbeit zu vollenden.