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

Komplementinhibition mittels Eculizumab verstärkt den nephroprotektiven Effekt von ACE-Inhibitoren in einem COL4A3-Knockout-Mausmodell für das Alport-Syndrom

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Jan Jakob Valk

aus Hamburg Göttingen April 2019

Dekan:	Prof. Dr. H.K. Kroemer
Referent/in	Prof. Dr. O. Gross
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. M. Oppermann
Drittreferent/in:	Prof. Dr. M. Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 19.02.2020

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Komplementinhibition mittels Eculizumab verstärkt den nephroprotektiven Effekt von ACE-Inhibitoren in einem COL4A3-Knockout-Mausmodell für das Alport-Syndrom" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

(Unterschrift)

1.Einleitung	1
1.1 Alport-Syndrom	1
1.2 Pathologie des Alport Syndroms	1
1.2.1 Proteinurie und Nierenfibrose im Alport-Syndrom	2
1.3 Rolle des Komplementsystems bei der Entwicklung der Nierenfibrose	3
1.4 Blockade des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems	6
1.5 Eculizumab	7
1.5.1 Hypothese zur Wirksamkeit der Eculizumab-Therapie beim Alport-Syndrom.	8
2. Material und Methoden	. 10
2.1 Therapieschema	. 10
2.1.1 Mausstämme	.11
2.1.2 Versuchstierhaltung	.11
2.1.3 Genotypisierung	.11
2.1.3.1 PCR	.12
2.1.4 Gruppeneinteilung	. 14
2.1.5 Behandlung der Versuchstiere	. 14
2.2 Färbung	.16
2.2.1 Gewebegewinnung	.16
2.2.2 Gewebepräparation	.16
2.2.3 Immunhistochemische Färbung für Laminin	.16
2.2.4 Immunhistochemische Färbung für Fibronectin.	. 17
2.2.5 Begutachtung und Scoring	. 18
2.2.6 Laminin-Score	. 19
2.2.7 Fibronectin-Score	. 20
2.2.8 Immunhistochemische Färbung für Komplementfaktoren C3 und C5b-9	.21
2.3 Urinanalyse	.21
2.3.1 Uringewinnung	.21
2.3.2 Proteinfällung mit Chloroform/Methanol	.21
2.3.3 Elektrophorese	. 22
2.3.4 Proteinfärbung mit Coomassie-blue	. 22
2.4 Western-Blotting	.23
2.4.1 Herstellung der Lysate	.23
2.4.2 Proteinbestimmung	.23
2.4.3 Elektrophorese	. 23
2.4.4 Blotten	. 24
2.4.5 Detektion	. 24

	25
2.4.6 Stripping	
2.5 Serumharnstoffanalyse	
2.5.1 Serumgewinnung	
2.5.2 Harnstoffanalyse	
2.6 Statistische Methoden	
3.Ergebnisse	35
3.1 Überlebensdaten	
3.2 Histologie-Score	
3.2.1 Extrazelluläre Matrixakkumulation	
3.2.2 Narbengewebe	
3.2.3 Ergebnisse Komplementfärbung	
3.2.3.1 C3	
3.2.3.2 C5	44
3.3 Uringele	47
3.4 Western Blotting	
3.4 Western Blotting3.4.1 TGFβ	
 3.4 Western Blotting 3.4.1 TGFβ 3.4.2 CTGF. 	
 3.4 Western Blotting 3.4.1 TGFβ 3.4.2 CTGF 3.5 Harnstoffkonzentration im Serum	
 3.4 Western Blotting	

Abkürzungsverzeichnis

Angiotensin Converting Enzyme
angiotensin converting enzyme
inhibitor
analysis of variance
Alport-Syndrom
Basenpaare
Basalmembran
bovine-serum albumin
destilliertes Wasser
Desoxyribonukleinsäure
Eculizumab
extrazelluläre Matrix
crystallisable fragment
glomeruläre Basalmembran
Chlorwasserstoffsäure
Immunglobulin G
Membran-Angriffs-Komplex
Natriumchlorid
Objektträger
phosphat- buffered saline
polymerase chain reaction
Paraformaldehyd
proximale tubuläre Epithelzellen
Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
Raumtemperatur
Standardabweichung
Small-interfering RNA
Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Tris-buffered saline
transforming growth factor- β l
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Universitätsmedizin Göttingen
Umdrehungen pro Minute
über Nacht
Volt
X-Chromosomal vererbtes Alport-
Syndrom

1.Einleitung

1.1 Alport-Syndrom

Das Alport-Syndrom ist eine progressive vererbbare Nierenerkrankung. Die typischen Symptome sind eine in der Kindheit beginnende Hämaturie, eine Proteinurie mit zunehmender Beeinflussung der Nierenfunktion und letztendlich ein Nierenversagen im Erwachsenenalter. Bei mehr als zwei Dritteln der Betroffenen besteht zudem eine sensorineurale Schwerhörigkeit. Außerdem die Erkrankung kann mit einem pathognomonischen vorderen Lenticonus und einer Leiomyomatose einhergehen (Hudson et al. 2003, Kashtan 2015).

Die Vererbung ist uneinheitlich. Etwa 80% der Betroffenen weisen einen X -chromosomal rezessiven Erbgang auf. Verantwortlich ist eine Mutation im Gen für die α 5-Kette des Kollagen-Typ IV COL4A5 (Chromosom Xq2-48). Die weiteren Mutationen betreffen die für die α 3- und α 4-Ketten des Kollagen-Typ IV verantwortlichen Gene COL4A3 und COL4A4 (Chromosom 2q 35-37) und werden autosomal rezessiv vererbt (Hudson et al. 2003).

Darüber hinaus werden etwa 5% der Fälle autosomal dominant vererbt (Kashtan 2015).

1.2 Pathologie des Alport Syndroms

Die glomeruläre Filtrationsbarriere besteht aus drei Schichten: dem fenestrierten Endothel, der glomerulären Basalmembran (GBM) und der podozytären Schlitzmembran.

Die GBM besteht wie alle Basalmembranen zu einem großen Teil aus Kollagen-Typ IV, Lamininen, Nidogenen, Heparansulfat und Proteoglykanen (Timpl 1989).

Kollagen-Typ IV besteht aus jeweils drei von sechs existierenden α -Ketten. Jeweils drei α -Ketten bilden ein Triplehelix-Protomer des Kollagen-Typ-IV, welche sich zu einem verzweigten Kollagen-Typ IV-Netzwerk verknüpfen. Im Falle der reifen GBM sind dies bei Nagetieren und beim Menschen die Ketten $\alpha 3, \alpha 4$ und $\alpha 5$ (Miner und Sanes 1994 und Kalluri et al. 1997). Beim Alport-Syndrom besteht ein Defekt in einer dieser drei Ketten, sodass eine inkorrekte Bildung der $\alpha 3, \alpha 4, \alpha 5$ Triplehelices mit folgender Degradation der hieraus resultierenden Kollagen Typ IV-Protomere, die Folge ist. Dies führt zu einer Persistenz der embryonalen Kollagen-Typ IV-Form bestehend aus zwei $\alpha 1$ -Ketten und einer $\alpha 2$ -Kette. Die $\alpha 1, \alpha 1, \alpha 2$ -Protomere verfügen über weniger Disulfidbrücken als die adulte $\alpha 3, \alpha 4, \alpha 5$ -Form, was eine geringere Widerstandsfähigkeit gegenüber den beachtlichen hydrostatischen Kräften, welche im Glomerulum herrschen, zur Folge hat (Hudson et al. 2003). Dies wird als ein Grund für die abnehmende Funktionsfähigkeit der GBM beim Alport-Syndrom diskutiert.

Darüber hinaus hat die veränderte Struktur des Kollagen-Typ IV weitere Konsequenzen.

Die Podozyten verfügen über Rezeptoren, die mit den Kollagen-Typ-IV Ketten kommunizieren und ihnen so ermöglichen die extrazelluäre Matrix (EZM) zu regulieren (Curat und Vogel 2002). Eine besondere Rolle kommt hier dem Discoidin-Domain-Rezeptor 1 (DDR1) zu (Vogel et al. 1997). Es wird postuliert, dass die Podozyten über diesen Rezeptor die embryonalen Kollagen-Typ-IV-Ketten erkennen und über die Ausschüttung verschiedener Wachstumsfaktoren und Chemokinen versuchen, diesen Zustand zu korrigieren (Gross et al. 2010). Dies führt im Verlauf zu einem Funktionsverlust der GBM, einer Akkumulation von EZM und letztendlich zu einer progressiven Nierenfibrose

1.2.1 Proteinurie und Nierenfibrose im Alport-Syndrom

Der Funktionsverlust der GBM führt sukzessive zu einer Proteinurie. Die Proteinurie wirkt entscheidend mit bei der Entwicklung einer Nierenfibrose. Bei COL4A3-Knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass einer Verschlechterung der Nierenfunktion fünf Wochen einer starken Proteinurie vorausgingen (Cosgrove et al. 1996). Die zunehmende Proteinmenge in den Tubuli führt zu einer erhöhten Reabsorptionsleistung und damit zur Aktivierung proinflamatorischer und profibrotischer Signalwege in den proximalen Tubulus-Zellen (PTECs) (Abbate et. al 2006). Eine wichtige Rolle spielen hier die profibrotischen Mediatoren *transforming growth factor-\beta-1* (TGF β -1) und *connective tissue growth factor* (CTGF). TGF β -1 wird von den PTECs, Podozyten und Makrophagen gebildet. Dies sorgt für ein Fortschreiten der Erkrankung im Tubulointerstitium und im Falle der Podozyten zur Enstehung der Glomerulosklerose (Lee 2012). TGF β -1 führt zu einer Aktivierung von Fibro- und Myofibroblasten, die unter anderem mit einer Bildung von Kollagen sowie Fibronectin reagieren (Sayers et al. 1999).

Eine parallele Aktivierung und Anlockung von T-Zellen und Makrophagen über verschiedene Chemokine und Cytokine, wie TNF- α , beschleunigen diesen Prozess (Ryu et al. 2011).

Die Folge ist ein zunehmender bindegewebiger Umbau mit Verdrängung des eigentlichen Nierengewebes und konsekutiv ein Funktionsverlust des Nierengewebes.

1.3 Rolle des Komplementsystems bei der Entwicklung der Nierenfibrose

Das Komplementsystem ist ein Bestandteil des angeborenen Immunsystems, es spielt eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Pathogenen und reguliert Entzündungsprozesse (Ricklin et al. 2010). Es ist eine biochemische Kaskade. die aus ca. 50 Serumund membrangebundenen Proteinen besteht (Ricklin und Lambris 2013). Grob zusammengefasst führen drei Mechanismen zu einer Aktivierung des Komplementsystems: der klassische Weg, der Lektin-Weg und der alternative Weg. Der klassische Weg beginnt mit der Aktivierung des C1-Komplexes, indem die C1q-Komponente das Fc-Fragment von IgG- oder IgM-Antikörpern und andere Strukturen bindet und im Verlauf die C4- und C2-Komponente spaltet, aktiviert und mit ihnen die C3-Konvertase bildet.

Die Aktivierung des Lektin-Weges verläuft analog zum klassischen Weg. Hier werden Kohlenhydrate, Mannose, auf fremden mikrobiellen Oberflächen durch Lektine erkannt, wie z.B. durch das *mannose-binding lectin* (MBL). Verschiedene Proteasen aktivieren nun gemeinsam C4 und C2 und bilden mit diesen die C3-Konvertase.

Der alternative Weg basiert auf einer spontanen Hydrolyse von C3 und einer direkten Bindung des Spaltproduktes C3b und seinem wichtigsten Co-Faktor, Faktor B, an bakterielle Membranen. Die spontane Hydrolyse dient einer regelmäßigen Kontrolle körpereigener Zellen, die die aktivierte C3-Komponente sofort wieder inaktivieren. Auf körperfremden oder apoptotischen Zellen erfolgt diese Inaktivierung nicht (Harboe und Mollnes 2008).

Alle drei Wege führen zu einer Aktivierung der C3-Komponente und letztendlich zur Bildung des zelllysierenden Membran-Angriff-Komplexes MAC/C5b-9.

Auf jeder Stufe der Kaskade existieren verschiedene membranständige oder im Serum gelöste Inhibitionsmechanismen (Zipfel und Skerka 2009).



Abb. 1: Schematischer Aufbau der Komplementsystemkaskade und wichtiger Inhibtoren

(Quelle: Sarma JV und Ward PA (2011): The Complement System) Mit freundlicher Genehmigung des Verlages "Springer Nature"

Das Komplementsystem scheint über verschiedene Mechanismen im Rahmen der Proteinurie auf die Tubulus-Zellen, die Glomeruli und das Interstitium zu wirken (Turnberg et al. 2006). Neben Albumin und diversen weiteren Proteinen gelangen durch die Schädigung der GBM auch Bestandteile des Komplementsystems in erhöhtem Maße in das glomeruläre Filtrat. Die filtrierten Komplementproteine wirken direkt auf die PTECs (Abbate et al. 2006). Die PTECs verfügen zudem nicht über Komplementsystem-Inhibitoren und sind deswegen gegenüber einer Aktivierung des Komplementsystems relativ schutzlos. Im Speziellen sind dies der *decay accelerating factor* (DAF) und das *membrane cofactor protein* (MCP), Inhibitoren auf C3-Ebene, kombiniert mit einer nur geringen Präsenz von HRF-20 (CD-59), einem Inhibitor des MAC/C5b-9 (Ichida et al. 1994).

Hinzu kommt, dass die PTECs selber in der Lage sind, die Komplementkomponente C3 zu synthetisieren und im Bereich ihres apikalen Bürstensaumes Proteine mit C3-Konvertase Eigenschaften aufweisen (Zhou et al. 2001, David et al. 1997). Das azide ammoniumreiche Milieu der Niere, besonders der Medulla, fördert zudem die Aktivierung der C3-Komponente über den alternativen Aktivierungsweg (Herbert et al. 1992).

Tiermodellversuche zeigen, dass die Aktivierung des Komplementsystems durch die anaphylaktisch wirksamen C3a- und C5a-Komponenten über ihre auf dem renalen Epithel und lokalen Makrophagen exprimierten Rezeptoren (C3aR und C5aR) zu einer TGF- β 1 vermittelten Akkumulation von EZM und einer Bildung diverser Chemokine und Cytokine führen. Diese bewirken verschiedene Entzündungsreaktionen und regen ebenfalls die Produktion von TGF- β 1 an (Tang et al. 2009 und Peng et al. 2012).

Die Endstrecke des Komplementsystems, der MAC/C5b-9, spielt eine entscheidende Rolle beim durch Proteinurie vermittelten tubulointerstitiellen und glomerulären Schaden. Sublytische Konzentrationen des MAC/C5b-9-Komplexes induzieren zum einen eine vermehrte Bildung von Kollagen-Typ IV durch die PTECs und führen somit zu einer vermehrten Akkumulation von EZM und zum anderen stimulieren sie die Synthese verschiedener proinflammatorischer Cytokine und reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (David et al. 1997, Abe et al. 2004). Ein weiterer Indikator für die entscheidende Funktion des MAC/C5b-9-Komplexes als Mediator der tubulointerstitiellen Nierenfibrose zeigte sich bereits 2002 bei einem Versuch mit C6-defizienten Ratten, die nicht fähig sind, den MAC/C5b-9-Komplex zu bilden. Die C6-defizienten Tieren waren bei gleich ausgeprägter Proteinurie annähernd komplett geschützt vor der Entwicklung einer tubulointerstitiellen Fibrose, wohingegen die C6-kompetenten Tiere eine starke tubulointerstitielle Fibrose entwickelten (Nangaku et al. 2002).

1.4 Blockade des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems

Die Blockade des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) mittels ACE-Hemmstoffen (ACEi) ist die Standardtherapie bei Alport-Syndrom-Patienten (Savige et al. 2013). Am deutlichsten ist die Wirksamkeit dieses Therapieansatzes durch die Daten des European Alport Registers belegt. So konnte gezeigt werden, dass Patienten, die mit einsetzender Proteinurie bereits mit einem ACE-Inhibitor behandelt wurden, im Median 18 Jahre später als unbehandelte Patienten dialysepflichtig wurden. Bei Patienten, die zu Beginn der ACE-Inhibitor-Therapie bereits im Stadium 3 und 4 des chronischen Nierenversagens waren, konnte die Nierenersatztherapie um drei Jahre verzögert werden (Gross et al. 2012). Angiotensin-Rezeptor 1-Antagonisten stellen eine *second-line* Therapieoption neben dem ACEi dar (Kashtan 2015).

In einer Studie mit Col4A3-Knockout-Mäusen, die vor Einsetzen der Proteinurie mit einem ACEi behandelt wurden, konnten eine Verdopplung der Überlebensdauer und eine verringerte Akkumulation von EZM im Vergleich mit unbehandelten Versuchstieren beobachtet werden (Gross et al. 2003). Zhang et al. konnten die Sicherheit und Effektivität des Einsatzes von ACEi auch bei pädiatrischen Alport-Patienten bestätigen und untermauern (Zhang et al. 2016).

Der genaue Wirkmechanismus dieser Therapie ist noch nicht abschließend geklärt. Allerdings spricht viel für einen direkten antiproteinurischen Bluthochdruck-unabhängigen Effekt der Blockade des RAAS (Sato et al. 2005, Schießl et al. 2015). Dieser Effekt wird durch die Abnahme der GFR und vor allem des Filtrationsdruck bewirkt. Darüber hinaus ist wohlbekannt, dass ein lokales RAAS über Angiotensin II direkt auf die Entwicklung der Nierenfibrose wirkt. Dies geschieht über die Ausschüttung verschiedener proinflamatorischer Proteine und besonders über TGFb-1 (Mezzano et al. 2001, Murphy et al. 2015).

1.5 Eculizumab

Eculizumab ist ein gegen die C5-Komponente des Komplementsystems gerichteter monoklonaler humanisierter Antikörper, der die Bildung von C5a und des MAC/C5b-9 verhindert (Rother et al. 2007).

Eculizumab ist bisher zur Therapie der paroxymalen nächtlichen Hämoglobinurie und des atypischen hämolytisch-urämischen Syndroms zugelassen. Zudem wird Eculizumab zunehmend im Rahmen der Nierentransplantation, besonders bei der Antikörper induzierten Rejektion, eingesetzt (Barnett et al. 2013).

In unseren Versuchen verwendeten wir den murinen BB5.1 Antikörper, der eine mit Eculizumab vergleichbare Inhibition der C5-Komponente bewirkt. Dieser Antikörper wurde bereits in mehreren Studien erfolgreich im Rahmen der rheumatoiden Arthritis, des Ischämie Reperfusion- induzierten Nierenschadens und der anti-Myeolidase-Antikörper vermittelten Glomerulonephritis eingesetzt (Wang et al. 1995, de Vries et al. 2003, Huugen et al. 2007). 1.5.1 Hypothese zur Wirksamkeit der Eculizumab-Therapie beim Alport-Syndrom

Neben dem schon erwähnten Einfluss des Komplementsystems auf die Entwicklung der Nierenfibrose existieren weitere Anhaltspunkte für eine Wirksamkeit einer Blockade der Endstrecke des Komplementsystems bei proteinuretischen Nierenerkrankungen.

So konnte an einem durch Puromycin-Aminonucleosid induzierten Nierenschaden bei Ratten die Bildung des MAC/C5b-9-Komplexes verhindert werden und daraufhin ein Ausbleiben eines tubulointerstitiellen Nierenschadens durch die Behandlung mit dem Inhibitor HRF-20 (CD-59) im Vergleich zu unbehandelten Versuchstieren nachgewiesen werden (He et al. 2005).

Zudem konnte im Urin von Patienten mit Proteinurie bei unterschiedlichen Nierenerkrankungen der MAC/C5b-9 nachgewiesen werden. Auf Grund seiner Größe lässt dies auf eine Filtration der Vorgängerstufen mit folgender Aktivierung schließen (Morita et al. 2000).

Durch die zusätzliche Blockade der Bildung von C5a, dem Anaphylatoxin, ist eine weitere Wirksamkeit von Eculizumab zu erwarten. C5a-Rezeptor - Antagonisten konnten z. B. im Mausmodell eine deutliche Reduzierung der Nierenfibrose bewirken; Ähnliches war an C5a-Knockout-Versuchstieren zu beobachten (Boor et al. 2007).

Also lässt sich zusammenfassen, dass das Eculizumab das Potenzial hat, beim Alport-Syndrom die negativen Folgen der Proteinurie zu vermindern. Dies ist eine vielversprechende Ausgangslage für die Co-Medikation von Eculizimab mit dem ACEi, der bekanntermaßen das Ausmaß der Proteinurie verringert.

Die Datenlage und die mittlerweile vorhandene klinische und präklinische Routine im Umgang mit diesem Medikament sowie die Verfügbarkeit eines murinen Analogons bewogen uns, unsere Studie mit Eculizumab durchzuführen.



Abb.2: Durch die Proteinurie wird tubulär das Komplementsystem bis hin zum "membrane attack complex" aktiviert. Eculizumab bindet C5 und blockiert damit die Komplementkaskade (modifiziert nach Abbate et al. 2006)

Mit freundlicher Genehmigung der "American Society of Nephrology"

2. Material und Methoden

2.1 Therapieschema

Die Versuchstiere wurden in folgende Gruppen aufgeteilt:

Gruppe 1: Placebo-Behandlung ab der 4. Woche

Gruppe 2: Ramipril-Behandlung ab der 4. Woche

Gruppe 3: Eculizumab ab der 4. Woche

Gruppe 4: Ramipril ab der 4. Woche plus Eculizumab ab der 6. Woche

Die Entscheidung, den mit Ramipril behandelten Tiere erst ab der 6. Woche mit Eculizumab zu spritzen, wurde auf Grund der nephroprotektiven Eigenschaften des ACE-Inhibitors in Bezug auf fibrotischen Umbau und Proteinurie getroffen. So konnte gezeigt werden, dass die Proteinurie bei ACEi behandelten COL 4A3 –/–-Mäusen im Vergleich zu unbehandelten COL A3 –/–-Tieren um ca. zwei Wochen verzögert auftrat (Gross et al. 2003). Dabei wurde davon ausgegangen, dass eine etwaige Therapie mit Eculizumab in der klinischen Praxis erst nach einer gewissen Verschlechterung der Nierenfunktion im Verlauf der ACEi-Therapie ihren Einsatz fände. Diese Vermutung stützt sich zum einen auf die etablierte und gut verträgliche ACEi-Therapie (Tilson und Barry 2010).

Die ACEi-Therapie wurde früh mit 4 Wochen begonnen, also vor, bzw. zu Beginn der Proteinurie. Eine möglichst frühe ACEi-Therapie ist beim Alport-Syndrom empfohlen (Kashtan et al. 2015).

Die nicht ACEi therapierten Versuchstiere wurden ab der vierten Lebenswoche mit Eculizumab bzw. dem Placebo, behandelt, um den direkten Effekt der Eculizumab-Therapie beurteilen zu können.

2.1.1 Mausstämme

Als Versuchstiere dienten COL4A3–/–-Mäuse. Heterozygote COL4A3-Züchtungspaare wurden genutzt, um homozygote COL4A3–/–-Tiere zu züchten. Die Mäuse basierten auf einem genetischen 129/SvJ-Hintergrund. Der 129/SvJ-Stamm wurde ausgewählt, da bei diesem Stamm phänotypisch dieselben Symptome inklusive identischer Pathogenese wie beim humanen Alport-Syndrom auftreten. An diesem 129/SvJ-Stamm wurden bereits mehrere Vorversuche durchgeführt.

Der Tierversuchsantrag wurde regelgerecht gestellt und genehmigt. Das Aktenzeichen des Tierversuchsantrages lautet: 33.9.- G12/710 Es wurden insgesamt 64 homozygote COL4A3 –/–-Tiere zur Untersuchung genehmigt. Die Zahl der genehmigten Tiere wurde nicht überschritten.

2.1.2 Versuchstierhaltung

Die Aufzucht fand in einer pathogenfreien Atmosphäre in den Räumlichkeiten der Zentralen Tierversuchs Einrichtung der UMG statt. Dabei wurden 12 h Licht-und Dunkelheitsintervalle eingehalten. Verwendet wurden Käfige des Typs IVF. Die Mäuse wurden in Gruppen von 3-5 Tieren gehalten. Ausreichend Wasser und Nahrung stand zu jeder Zeit zur Verfügung. Als Futter wurde das R/M-H (V153x) der Firma Snniff verwendet.

Die gesamte Studie wurde von Veterinären der Einrichtung beaufsichtigt und entsprach den Auflagen des zuvor genehmigten Tierversuchsantrags.

2.1.3 Genotypisierung

Zur Gewinnung von genomischer DNA für die Genotypisierung wurde Gewebe der distalen Schwanzspitze verwendet. Für die Genotypisierung benutzten wir das NucleoSpin® Tissue Kit von Macherey-Nagel (REF 740952.250). Verfahren wurde nach Herstellerangaben.

2.1.3.1 PCR

Pro Probe wurde Folgendes angesetzt:

10 μl DNA 0,5 μl Primer forward (20pM) 0,5 μl Primer reverse (20pM) 0,5 μl Primer mutant (20pM) 0,5 μl dNTP(je 10mM) 0,2 μl Taq (F-100, Biozym) 2,5 μl 10x Puffer 10,3 μl dH₂O

Die PCR wurde wie folgt durchgeführt:

95°C	4 min		
64°C	1 min	h	
72°C	2 min 30 sec		3x
95°C	1 min		
62°C	1 min		
72°C	2 min 30 sec	\int	3x
95°C	1 min	h	
60°C	1 min		
72°C	2 min 30 sec		41x
95°C	1 min		
58°C	1 min	1	
72°C	4 min	1	
72°C	1 min	1	

Primer forward:

CCA GGC TTA AAG GGA AAT CC Primer reverse

CCT GCT AAT ATA GGG TTC GAG A

Primer mutant:

AAT CGC CAA TGA CAA GAC G

Anschließend wurden die Proben auf Gele aus 1,5% Agarose in 1xTAE transferiert. Jedes Gel enthielt zusätzlich 10 μ l/ μ g Ethidiumbromid zum Fluoreszenznachweis der DNA.

Die Proben wurden anschließend für 40 min bis 60 min laufen gelassen.

Anschließend wurden die Gele mit einem Geldokumentationssystem KDS1D 2.0 von Kodak fotografiert und ausgewertet.

Die untere Bande bei 900 bp stellt den Wildtyp dar, die obere bei 1000 bp die COL4A3-Knockout- Mutation. Sind beide vorhanden, steht dies für den heterozygoten Genotyp.





Die untere Bande bei 900 bp stellt den Wildtyp dar, die obere bei 1000 bp die COL4A3-Knockout- Mutation. Sind beide vorhanden, steht dies für den heterozygoten Genotyp.

2.1.4 Gruppeneinteilung

Nach der Ermittlung des richtigen Genotyps durch PCR wurden die COL4A3-/-- Mäuse in folgende Gruppen eingeteilt:

Gruppe 1: Placebo-Behandlung ab der 4. Woche

Gruppe 2: Placebo-Behandlung ab der 6. Woche plus Ramipril ab der 4. Woche

Gruppe 3: Eculizumab ab der 4. Woche

Gruppe 4: Eculizumab ab der 6. Woche plus Ramipril ab der 4. Woche

Je Gruppe wurden 16 Mäuse verwendet, von denen je 4 nach 7,5 bzw. 9,5 Wochen mittels Genickbruch getötet wurden. Von diesen Tieren wurden die Nieren, Serum und Urin gesammelt. Die 8 Tiere der Überlebensgruppen wurden kurz vor Eintreten des terminalen Nierenversagens ebenfalls durch Genickbruch getötet. Das beginnende terminale Nierenversagen ist durch eine zunehmende Apathie, Gewichtsverlust und verringerte Nahrungsaufnahme zu erkennen.

2.1.5 Behandlung der Versuchstiere

Eculizumab-Therapie

Mäusen der Therapie-Gruppen wurden ab der 4. bzw. 6. Woche den Angaben des Herstellers (Alexion Pharmaceuticals) gemäß 3 Mal pro Woche 40 mg/kg Körpergewicht des aus der Maus stammenden C5-Antikörpers BB5.1 (Eculizumab) subkutan injiziert.

Vor jeder Behandlung wurden die Versuchstiere unter einer laufenden Sterilbank gewogen, um die Dosis Eculizumab zu errechnen. Anschließend wurden unter einer laufenden Sterilbank 1-ml-Einweg-Spritzen der Marke transcoject® mit der bestimmten Menge Eculizumab aufgezogen und mit der jeweiligen Mausnummer beschriftet. Wir verwendeten Sterican® 26G Kanülen von B. Braun.

Zur Vermeidung von Irritationen bzw. Infekten im Gewebe um die Injektionsstelle herum wurde abwechselnd in den rechten und den linken Oberschenkel sowie in den Nacken injiziert.

Bei den Placebo-Gruppen wurde analog verfahren. Als Placebo wurde 100 ml steriles 0,9% NaCl verwendet.

Die Behandlung mit Eculizumab, bzw. Placebo wurde in allen Studiengruppen in der 13. Lebenswoche beendet.

Dieses Vorgehen wurde zuvor von der Ethikkommission genehmigt und von den Veterinären des Tierstalls überwacht.

Ramipril-Therapie

Die Ramipril-Therapie erfolgte oral über das Trinkwaser in einer Konzentration von 2,5 mg/ Liter. 40 mg des pulverförmigen Ramiprils wurden dafür mit 1ml 100% Ethanol mit einem Vortexer vermischt, bis eine homogene Lösung entstand. Diese homogene Lösung wurde mit 11 Leitungswasser in einer zuvor autoklavierten Glasflasche vermischt.

Die Gabe der Ramipril-Lösung erfolgte mittels 250-ml-Trinkflaschen, deren Inhalt drei Mal pro Woche erneuert wurde. Zudem wurden die Trinkflaschen alle 14 Tage ausgewechselt.

2.2 Färbung

2.2.1 Gewebegewinnung

Aus allen vier Studiengruppen wurden je drei Mäuse nach 7,5 und nach 9 Wochen durch Genickbruch getötet. Die Nieren wurden freipräpariert und je Maus eine Niere für die immunhistochemischen Färbungen und die andere für die Western-Blot-Untersuchungen verwendet.

2.2.2 Gewebepräparation

Die entnommen Mausnieren wurden in zwei gleich große Hälften entlang der Nierenlängsachse geschnitten und in je einer Histokammer mindestens 6 h bei 4 °C in (PFA) gelagert. Anschließend erfolgte ein Waschschritt in (PBS) über 1 h. Daraufhin wurden die Nieren zwecks Lagerung in 70 % Ethanol überführt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Die Einbettung in Paraffin erfolgte gemäß eines Standardprotokolls. Die eingebetteten Nieren wurden mit Hilfe eines Mikrotoms (Leica, Wetzlar) in 3 µm dicke Schnitte geschnitten, auf Objektträger (Menzel-Gläser Superfrost® Plus) aufgetragen, üN bei 37 °C getrocknet und dann bei 4 °C gelagert.

2.2.3 Immunhistochemische Färbung für Laminin

Die Objektträger (OT) wurden in 3 Schritten von jeweils 10 min mit Xylol entparaffiniert. Es folgte eine Rehydrierung in einer absteigenden Ethanolverdünnungsreihe (2x100%, 96\%, 70\%, 50% a 5 min). Vor Beginn des Andauprozesses wurden die OT für 5 min mit dH₂O gespült.

Für die Antigendemaskierung wurde ProteinaseK von DAKO verwendet. Diese wurde in einem Mischungsverhältnis von 1:50 in Tris HCL pH 7,6 für 5min bei 37 °C inkubiert. Pro Nierenschnitt wurden ca. 80 µl verwendet Nach drei Waschschritten von jeweils 10 min in 1x TBS wurde die Proben in 5% BSA/TBS über 1 h geblockt. 80 μl des 1:25 in TBS verdünnten primären anti-Laminin-Antikörpers (Ab11575 *rabbit* IgG) wurden auf die Schnitte gegeben. Die Inkubation des primären Antikörpers erfolgte üN bei 4 °C.

Es folgten 3 Waschschritte in 1xTBS von jeweils 10 min. Die Schnitte wurden dann 30 min in 5% Normalserum (*goat*/TBS) geblockt. Der sekundäre Antikörper (*goat anti rabbit* Alexa 488) wurde nun in einem Verhältnis von 1:200 in 5% Normalserum (*goat*/TBS) auf die Schnitte aufgetragen. Die Inkubationszeit betrug eine h bei RT in Dunkelheit. Es folgten 3 Waschschritte von 15 min in TBS, bevor die Schnitte mit Deckgläsern auf den OT fixiert wurden. Hierfür fand ein Fluoreszenz Mounting Medium von DAKO Verwendung. Die OT wurden nun ebenfalls in Dunkelheit einen Tag bei RT inkubiert. Hier wurde eine feuchte Kammer verwendet, um ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern. Die Lagerung fand bei 4 °C statt.

Auf jedem OT wurde ein Schnitt als Negativkontrolle verwendet, um unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers auszuschließen. Dafür wurde an Stelle des primären Antikörpers lediglich ca. 80 µl TBS aufgetragen. Alle anderen Schritte waren identisch.

2.2.4 Immunhistochemische Färbung für Fibronectin.

Die Färbung für Fibronectin wurde bis auf wenige Schritte genauso ausgeführt wie die des Laminins. Deshalb wird an dieser Stelle nur auf die Unterschiede eingegangen. Die Antigendemaskierung wurde mittels eines Citratpuffers mit pH 6,1 bei 90 °C in einem Dampfkocher über 40 min. durchgeführt. Als primärer Antikörper wurde der FN (C-20): sc 6952 *goat polyclonal* in 5% Esel-Serum 1:50 eingesetzt. Das Blocken wurde mittels 5% Esel-Serum/TBS durchgeführt. Als sekundärer Antikörper wurde der Alexa488 *donkey anti goat*/invitrogen A11055 verwendet. Alle weiteren Schritte entsprechen denen der Laminin Färbung.

2.2.5 Begutachtung und Scoring

Anschließend wurden die Schnitte unter einem Mikroskop (Axciovert S100 TV) begutachtet. Bei einer 100x und 200x Vergrößerung wurden Fotos des gesamten Kortex gemacht und in schwarz-weißer Form den verblindeten Scorern in kodierter Form vorgelegt. Dabei waren die Bilder in vier Gruppen aufgeteilt, jeweils die 100x und 200x Vergrößerungen der beiden Färbungen. Innerhalb der Gruppen waren die einzelnen Bilder in zufälliger Reihenfolge sortiert. Die Scorer vergaben nun 0-3 Punkte je nach Ausmaß der Fibrose. Anschließend wurde der Mittelwert der Ergebnisse der drei Scorer gebildet und aus diesem wiederum ein Mittelwert errechnet. Diese wurden untereinander quantitativ verglichen.

2.2.6 Laminin-Score

Wert	Beispielbild	Glomerulum	Tubulointerstitium
0		Struktur des Kapillarknäuels klar zu erkennen, freies Lumnen der Bowman-Kapsel	Struktur klar erkennbar, keine fibröse Erweiterung des Interstitiums, keine Fibroseinseln
1		Struktur des Kapillarknäuels klar zu erkennen, Aufhellung der Kapillarschlingen, beginnende Kapselbildung	Erkennbare strukturelle Anordnung der Tubuli, verbreitertes Interstitium mit einzelnen Fibroseinseln
2		Stark veränderte Kapillarstruktur, verschmälertes Bowman-Lumen	Unregelmäßige strukturelle Anordnung der Tubuli, verbreitertes Interstitium mit diffus verteilten Fibrosebereichen
3		Keine Struktur erkennbar, komplette glomeruläre Fibrose, Verschmelzung von Kapillarknäuel und Kapsel	Struktur durch Fibrose teilweise aufgehoben, breite bindegewebige Durchsetzung des Gewebes

2.2.7 Fibronectin-Score

Wert	Beispielbild	Glomerulum	Tubulointerstitium
0		Vereinzelte zarte Signalanreicherung um die Glomeruli	Vereinzelte zarte Signalanreicherung um die Gefäße sowie Gewebespalten
1		Vermehrte Signalanreicherung um die Glomeruli	Vermehrte Signalanreicherung im Interstitium, Fibroseinseln
2		Deutliche Fibrose um Glomeruli	Deutliche Fibrosestreifen, beginnende Verdrängung des Nierengewebes
3		Breite Vernarbung	Breite Vernarbung des Gewebes und Aufhebung der tubulointerstitiellen Struktur

2.2.8 Immunhistochemische Färbung für Komplementfaktoren C3 und C5b-9

Die Färbung der Komplementfaktoren C3 und C5b-9 wurde entsprechend dem Protokoll der Lamininfärbung durchgeführt. Lediglich die verwendeten Antikörper wichen ab.

C3: Primärantikörper: C3 (Abcam, *chicken polyclonal to* C3/C3a, ab 48581) in TBS 1:50 Sekundärantikörper: *Goat anti chicken* Alexa 488 (Abcam, ab 96947) in 5%BSA/TBS 1:400 C5b-9:

Primärantikörper: C5b-9 (Abcam, rabbit polyclonal to C5-9, ab 5581) Sekundärantikörper: *Goat anti rabbit* Alexa 488 (invitrogen, A11008) 1:200 in 5%BSA/TBS

2.3 Urinanalyse

2.3.1 Uringewinnung

Urin wurde bei jeder Maus im Alter von 4,5, 6, 7,5, und 9 Wochen gesammelt. Dies erfolgte durch bei lebenden Mäusen spontane Blasenentleerung auf einen sterilen Untergrund unter einer laufenden Sterilbank und durch eine direkte Punktion der Blase nach der Tötung. Der Urin wurde in zuvor beschrifteten Eppendorf Cups bei -20 °C gelagert.

2.3.2 Proteinfällung mit Chloroform/Methanol

20 μ l der Urinprobe wurden mit 100 μ l dH₂O aufgefüllt. Anschließend wurden 400 μ l Methanol und 100 μ l Chloroform hinzugegeben, alles gründlich im Vortexer vermischt und bei 15000 UpM für 1 min zentrifugiert. Es entstand ein zweiphasiges System, wobei sich die Proteine an der Grenzschicht als dünner weißer Niederschlag sammelten. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Es wurden 400 μ l Methanol beigefügt und das Ganze bei 15000 UpM für 2 min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde zweimal durchgeführt. Anschließend wurde der Überstand entfernt und die Probe bei 4 °C üN gelagert.

2.3.3 Elektrophorese

Zu jeder Probe wurden $18 \,\mu$ l des Probenpuffers (NuPage, Invitrogen) zugegeben und für 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend 5 min auf Eis gelagert. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 15.000 UpM für 1 min erfolgte die Auftragung auf ein 4-12% Polyacrylamid-Fertigel (NuPage, Invitrogen).

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte zunächst 30 min bei 80 V und dann weitere 60-75 min bei 100 V. Als Marker verwendeten wir den ProSieve Quad Color 4,6-300 kDa.

2.3.4 Proteinfärbung mit Coomassie-blue

Die Proteinfärbung wurde nach einer Standard Coomassie-blue-Methode durchgeführt.

- 20 µl Roti-Blue-Färbelösung
- 20 µl Methanol
- 60 µl H₂O
- 20 µl Essigsäure

Anschließend wurden die Gele üN mit Leitungswasser gewaschen, bis der Hintergrund klar erschien.

Anschließend wurden die Gele mit einem Hewlett Packard Office Jet R 45 Scanner eingescannt und die relative Dichte der einzelnen Banden durch das KDS1D 2.0 Kodak-Programm errechnet. Anschließend wurde die relative Proteinurie der nieder- und hochmolekularen Fraktion sowie des Albumins bezogen auf eine Standardurinprobe einer 7,5 Wochen alten Alport-Maus errechnet.

2.4 Western-Blotting

2.4.1 Herstellung der Lysate

Jeweils eine Niere wurde mit einem Messerhomogenisator (Ultra-Turrax) in 500 μ l Kaliumphosphatlysepuffer auf Eis für 30 sec in 5-ml-Röhrchen (Sarstedt) homogenisiert. Das Homogenat wurde in 1,5-ml-Eppendorf-Cups für 10 min bei 16.500 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -80 °C konserviert.

2.4.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von Bradford durchgeführt. Dafür wurden die Lysate mit dH₂O 1:10 verdünnt. Mit BSA wurde eine Standardreihe mit 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,5 und 2,0 mg/ml hergestellt. Jeweils 20 μ l der Standards und der Proben wurden mit 980 μ l der Bio-Rad Protein Assay Start-Reagenz vermischt.

Die optische Dichte der Proteinlösungen wurde im Photometer (Shimadzu, UV-120-01) bei 595 nm gegen einen Leerwert ($20 \ \mu l \ H_2O + 980 \ \mu l$ Reagenz) gemessen. Aus diesen Messwerten wurde eine Eichkurve erstellt und anhand dieser die jeweilige Proteinkonzentration bestimmt.

2.4.3 Elektrophorese

Je Probe wurden 40 μ g Protein in 20 μ l mit 2 μ l 10x-Reduktionspuffer (NuPage, Invitrogen) und 5 μ l 4x-Probenpuffer gemischt, 5 min bei 95 °C

denaturiert und auf ein Polyacrylamid-Fertiggel (4-12%) aufgetragen. Der Marker (ProSieve, Quad Color, 4,6-300 kD) wurde entsprechend Herstellerangaben nicht denaturiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 80 V für 20 min und dann bei 120 V für 60-75 min. Als Laufpuffer wurde 1:20 mit dH₂O verdünntes NuPage MOPS-SDS-Running-Buffer verwendet.

2.4.4 Blotten

Das Gel wurde zwischen zwei Whatman-Papier-Streifen in einer Bio-Rad-Tankblot-Apparatur über 60 min bei 100 V auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Whatman-Papiere und zwei Pads wurden vorher 5 min in Transferpuffer gelagert. Die PVDF-Membran wurde 10 sec in Methanol aktiviert und anschließend in Transferpuffern äquilibriert.

Nach dem Blotten wurde die Membran in TBST gewaschen und für 60 min in 5%-Magermilchpulver (Merck)/TBST geblockt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen.

2.4.5 Detektion

Die Membran wurde jeweils mit dem primären Antikörper in TBST verdünnt bei 4 °C üN inkubiert.

Primärantikörper:

TGF-β:Monoklonaler Antikörper aus Maus (R&D Sytems, MAB240)
1:2000
CTGF: Polyklonaler *rabbit*-anti Maus (Biovision, 5553R)
1:2000
Actin: Polyklonaler *rabbit*-anti Maus (Sigma, A2103)
1:5000

Anschließend wurde die Membran 3x15 min mit TBST gewaschen und eine Stunde mit einem Peroxidase markierten Sekundärantikörper in 5%-Magermilchpulver/TBST inkubiert.

Sekundärantikörper:

TGF-β: HRP-*rabbit-anti* Maus (DAKO P0161) 1:20000 CTGF: HRP-*goat-anti rabbit* (DAKO P0448) 1:10000 Actin: HRP-*goat-anti rabbit* (DAKO P0448) 1:20000

Anschließend wurde die Membran 4x15 min mit TBST gewaschen. Die Proteinbanden wurden mit einer Chemolumineszenz-Reaktion detektiert. Dafür wurde die Membran eine Minute mit 3 ml Chemolumineszenz-Reagenz (Western Lightning Plus, PerkinElmer) und 3 ml Oxidierendem Reagenz (Western Lightning Plus, PerkinElmer) inkubiert. Abschließend wurde die Membran mit einem Röntgenfilm (Biomax, Kodak) je nach Protein für 2 bis 60 min in der Dunkelkammer exponiert und der Film in einem Filmentwickler (Konica SRX 101A) entwickelt.

2.4.6 Stripping

Nach jeder Entwicklung eines der drei Proteine wurde die Membran jeweils gestrippt, um den primären und sekundären Antikörper wieder zu entfernen. Die Membran wurde zunächst in TBST gewaschen und 15 min in der Antibody-Stripping-Solution Uptima von Interbiotech inkubiert und anschließend 5 min in dH₂O gewaschen. Nach jeder Behandlung wurde die Membran für 60 min in 5%-Milchpulvert/TBST geblockt, bzw. nach dem letzen Antikörper in TBST aufbewahrt.

2.5 Serumharnstoffanalyse

2.5.1 Serumgewinnung

Bei jeder Maus, die den Tötungsgruppen zugeordnet war, wurde direkt nach der Tötung Blut durch Punktion des rechten Vorhofes entnommen. Dieses wurde nach 30 min bei RT für 2 min bei 8000g zentrifugiert, das Serum abgenommen und bei -20 °C aufbewahrt.

2.5.2 Harnstoffanalyse

Die Serumharnstoffkonzentration wurde mit dem Cobas8000 Modular Analyzer Series (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) der Abteilung Klinische Chemie der UMG bestimmt.

2.6 Statistische Methoden

Die Ergebnisse der quantitativen Untersuchungen wurden zunächst mittels einer einfachen Varianzanalyse (ANOVA) untersucht und anschließend in einer post-hoc-Tukey-Analyse auf signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen analysiert.

Bei dem histologischen Scoring wurden vor der Auswertung die Ergebnisse der einzelnen Bewerter auf einen signifikanten interindividuellen Unterschied der Scorer getestet. Dies erfolgte durch einem ANOVA Test für Messwiederholungen.

Die Analysen wurden mit dem Programm Statistica durchgeführt.

Alle Graphen wurden mit dem Programm Graphpad Prism 5 erstellt. Eine statistische Beratung erfolgte durch die Kurzberatung des Institutes für Medizinische Statistik der Universitätsmedizin Göttingen.

2.7 Material

Geräte und Programme Tabelle 1;

Produkt	Hersteller
Elisa Reader, Synergy HT	Bio - Tec, Bad Friedrichshall
Filmentwickler, SRX 101A	Konica
Gefrierschrank Vip Serie - 86 °	Sanyo, Bad Nenndorf
Graph Pad Prism 5	Graph Pad Prism Software Inc.
Heizblock – TRL 288	Libisch, Bielefeld
Bauknecht Kühlschrank	Bauknecht, Stuttgart
Autocut Mikrotom	Leica, Wetzlar
Mikropipetten 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop (Axciovert S100 TV)	ZEISS, Deutschland
DAKO Pen	DAKO, Dänemark
BioDoc Analyze	Biometra, USA
Pipetierhilfe	Roth, Karlsruhe
Programm zur densitometrischen Auswertung Image J	Roth, Karlsruhe
Scanner	Hewlett Packard Office Jet R 45

Steril Werkbank HERA Safe	Heraeus, Hanau
Omnifix® 40 Solo 1000 μl,	
Tank - Blot	Bio-Rad, München
Thermo Cycler – T professional	Biometra, USA
Ultra - Turrax T25	IKA Labortechnik ®, Staufen im Breisgau
Vortexer	IKA Labortechnik ®, Staufen im Breisgau
Wasserbad	IKA Labortechnik ®, Staufen im Breisgau
Western Blot Kassette	IKA Labortechnik ®, Staufen im Breisgau
X Cell Sure LockTM Novex mini Cell	Invitrogen, Karlsbad
Zentrifuge Mikro 200R	Hettich, Tuttlingen
Cobas®8000 Modular Analyzer	Roche®
Photometer (UV-120-01)	Shimadzu, Japan

Verbrauchsmaterialien Tabelle 2:

96 Loch platte	
Falcon® Blue Max TM, 15 ml,	Becton Dickinson,
50 ml Röhrchen	USA

Filterpapier für Western-Blot	Bio-Rad, München	
Einbettkassette - Universal	Kabe Labortechnik, Nümbrecht- Eisenroth	
Einmalpipetten ,5 ml, 10 ml	Greiner bio one	
Immunoblot PVDF Membran	Bio-Rad, München NuPage	
Tris – Glycine, 1,5 mm x 10/15 well	Invitrogen, Carlsbad	
Pipettenspitzen 200 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht	
Polyacrylamid-Fertiggel	Invitrogen, Carlsbad	
Röntgenfilm, Fuji Safelight Glass No. 8U	FUJIFILM, Düsseldorf	
Reaktionsgefäße, 1.6 ml	Biozym Scientific, Hess. Oldendorf	
Präzisionswischtücher	KIMTECH Science, Kimberley-Clark®	
Menzel Gläser Superfrost ® Plus 25 x 75 x 1,0 mm	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig	
Menzel-Gläser® 24 x 60 mm	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig	
Einmal-Injektions-Kanüle B. Braun Sterican ® Durchm. 0,55 x 25 mm 24 G x 1"	B.Braun AG, Melsungen	
Gentle Skin Einmalhandschuhe	Meditrade, Kiefersfelden	
Einwegspritzen 1 ml	Transcoject GmbH, Neumünster	

Färbelösung Roti®-Blue	Carl Roth GmbH + Co. KG
Essigsäure 100%	Merck KGaA
LDS Sample Buffer (4x)	NuPAGE® Invitrogen, Carlsbad
Novex® Tricine Running Buffer (10x)	Invitrogen, Carlsbad
Fluorescent Mounting Medium	DAKO, Dänemark
NucleoSpin® Tissue Kit v (REF 740952.250)	Macherey-Nagel, Düren

Antikörper und Medikamente Tabelle 3:

Eculizumab	Alexion Pharmaceuticals, USA
Ramipril	Sanofi, Frankreich
anti-Laminin Antikörper (Ab11575 rabbit IgG)	Abcam, England
Alexa488donkey anti goat A11055	Invitrogen, Carlsbad
anti-Fibronectin Antikörper FN (C-20): sc 6952 goat polyclonal	Santa Cruz Biotechnology, Inc. USA
chicken polyclonal to C3/C3a, ab 48581 C5b-9	Abcam, England
rabbit polyclonal to C5-9, ab 5581	Abcam, England
Primärantikörper Anti-TGF-β: Monoklonaler Antikörper aus Maus (MAB240)	R&D Systems, USA
Primärantikörper CTGF: Polyklonaler Rabbit- antiMaus(5553R)	Biovision, USA
--	--------------------
Primärantikörper Actin: Polyklonaler Rabbit-anti Maus (Sigma, A2103)	Sigma-Aldrich, USA
Sekundärantikörper TGF-β: HRP-rabbit-anti Maus (P0161)	DAKO, Dänemark
Sekundärantikörper CTGF: HRP-goat-anti rabbit (P0448)	DAKO, Dänemark
Sekundärantikörper Actin: HRP-goat-anti rabbit (P0448)	DAKO, Dänemark

Reagenzien, Lösungen und Chemikalien Tabelle 4:

Chloroform	Sigma-Aldrich, USA
Ethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Magermilch	Merck, Darmstadt
Western Lightning Plus ECL Roti Blue (5x) Gebrauchslösung	Roth, Karlsruhe
Molekulargewichtsmarker ProSieve, Quad Color, 4,6- 300 kD	Biozym,
Quick Start Reagenz	Invitrogen, Carlsbad
NuPage Polyacrylamid- Fertiggel (4-12%) Nukleotide	Invitrogen, Carlsbad

Col4A3 forward Primer 5 ['] - CCT-GCT-AAT-ATA- GGG-TTC-GAG-A - 3 [']	Finnzymes, Schwerte
Col4A3 reverse Primer 5 [´] - CCA-GGC-TTA-AAG- GGA-AAT-CC-3 [´]	Finnzymes, Schwerte
Col4A3 mutant Primer 5 ⁻ - AA T-CGC-CAA-TGA- CAA-GAC-G-3 ⁻	Finnzymes, Schwerte
Taq - Polymerase	Finnzymes, Schwerte
Tris-HCL	Roth, Karlsruhe
Tween	Merck, Darmstadt
EDTA	Sigma-Aldrich, USA
EGTA	Sigma-Aldrich, USA
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumvandat NP-40	Roth, Karlsruhe
Brij-35	Roth, Karlsruhe
PMSF	Sigma-Aldrich, USA
NP-40	MP - Biomedicals
Pepstatin	
Leupeptin	
®-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich, USA

Kaliumphosphat	Merck, Darmstadt
Acetat	Merck, Darmstadt
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Salzsäure	Sigma-Aldrich, USA
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, USA
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt

Verwendete Puffer Tabelle 5:

Antibody Stripping Buffer	Uptima, Frankreich
NuPage LDS sample Buffer	Invitrogen, Karlsbad
Reduktionspuffer Western Blot	Thermo Scientific
Taq - Puffer	Finnzymes, Schwerte
NuPage LDS 4x Probenpuffer	Invitrogen, Carlsbad
NuPage MOPS SDS 20x	Invitrogen, Carlsbad
NuPage 20x Transferpuffer	Invitrogen, Carlsbad

Stripping Puffer	Thermo Scientific

50X TAE-Puffer

2 mM Tris-HCL, pH 8.3

1 M CH3COOH

100 ml EDTA

TBS-T-Puffer

1 mM Tris-HCL, pH 8,0

150 mM NaCl 0.2% Tween20

6x PCR-Probenpuffer

10 mM Tris-HCL (pH 7,6)

+ 0.03 % Bromphenolblau

+ 60 % Glycerol

+ 60 mM EDTA

Lysepuffer

10 mM Kaliumphosphatpuffer (pH=7,0) 10 mM EDTA 5 mM EGTA 10 mM MgCl 50 mM ® - Glycerophosphat 1 mM Natriumvanadat 0,5% NP-40 0,1% Brij-35 1 mM PMSF 10 μM Pepstatin 10 μM Leupeptin

3. Ergebnisse

3.1 Überlebensdaten

Die Versuchstiere der Placebo-Gruppe lebten im Mittel 66,5 Tage (SD: 6,65), die der Eculizumab-Gruppe im Mittel etwa drei Tage länger (69,3 Tage, SD: 4,36). Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant.

Die anderen Gruppen (ACEi und ACEi + Eculizumab) wiesen ein hoch signifikant längeres Überleben auf. Die Mäuse der ACEi-Gruppe lebten 101,1 Tage (SD: 10,73), die mit Eculizumab und ACEi behandelten Mäuse lebten im Durchschnitt sogar 107,9 Tage (SD: 11,11). Damit lebten die Versuchstiere der Kombinationsgruppe aus ACEi + Eculizumab im Mittel mehr als 6 Tage länger als jene der ACEi-Gruppe. Allerdings erwies sich dieser Unterschied nicht als signifikant.

Somit lebten die Versuchstiere der Ramipril- Gruppen erheblich länger als die der Placebo- oder der Eculizumab-Gruppe. Der Effekt von Ramipril vergrößert sich durch die zusätzliche Therapie mit Eculizumab noch etwas.



Abb. 4: Die x-Achse stellt die Überlebensdauer in Tagen dar, die y-Achse den jeweiligen prozentuellen Anteil noch lebender Versuchstiere. Je Versuchsgruppe wurden 8 Tiere verwendet.

3.2 Histologie-Score

Pro Behandlungsgruppe wurde von vier Versuchstieren jeweils eine Niere nach 7,5 Wochen und von vier weiteren Versuchstieren nach 9,5 Wochen für die Histologie verwendet. Für jede Niere wurden Gewebeschnitte auf Laminin und auf Fibronectin gefärbt und Aufnahmen in 100 facher und 200facher Vergrößerung gemacht. Die Laminin-Färbung diente der Beurteilung der extrazellulären Matrixakkumulation, die Fibronectin Färbung der Beurteilung der Bildung von Narbengewebe. Die 100 fache Vergrößerung diente der Beurteilung der Glomerulosklerose, die 200 fache der Beurteilung der tubulointerstitiellen Fibrose.

Vor der Auswertung der Ergebnisse der Scores wurde auf einen signifikanten interindividuellen Unterschied der Scorer getestet. Dies erfolgte mit einem ANOVA-Test für Messwiederholungen. Es bestand kein signifikanter Unterschied, sodass für die Auswertung der Scoring-Ergebnisse pro Bild die Mittelwerte der drei einzelnen Scores verwendet werden konnten. Anschließend wurde eine einfache ANOVA mit einer posthoc-Tukey-Analyse durchgeführt, um die Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen zu bestimmen.

3.2.1 Extrazelluläre Matrixakkumulation

Die Nieren der Placebo-Alport-Mäuse wiesen eine deutliche Matrixakkumulation auf.

Die Wildtypen wiesen im Vergleich zu jeder Behandlungsgruppe in beiden untersuchten Altern hoch signifikant niedrigere Matrixakkumulationen im extrazellulären Raum auf (p=0,0001 bis 0,008).

Im glomerulären Score ergab sich ein hoch signifikanter Unterschied zwischen der Eculizumab und der Placebo-Gruppe im Alter von 7,5 Wochen (p=0,0001).

Die Eculizumab-Gruppe wies einen deutlich geringeren Score auf als die Placebo behandelten Versuchstiere (Eculizumab: 1,05 vs. Placebo: 1,80). Auch bei beiden anderen Gruppen(ACEi- und ACEi + Eculizumab) wurde im Vergleich zu der Placebo-Gruppe weniger Laminin in den Glomeruli nachgewiesen. Die Unterschiede waren allerdings geringer als im Vergleich zu der Eculizumab-Gruppe (Placebo: 1,80 vs. ACEi: 1,21 vs. Eculizumab+ACEi: 1,30).

Die Kombination aus Ramipril und Eculizumab wies in 7,5 Wochen alten Alport-Mäusen bessere Werte im glomerulärem Score auf, verglichen mit dem ACE-Inhibitor, allerdings nicht in signifikantem Maße (Scorer-Mittelwert: ACEi+Ecu:1,3 vs. ACEi:1,2 für 7,5 Wochen) (p=0,96).

Mit 9,5 Wochen wies die Eculizumab-Gruppe und die Placebo-Gruppe deutlich höhere Scoringwerte auf als mit 7,5 Wochen. In diesem Alter zeigte sich bei der ACEi-Gruppe hoch signifikant weniger extrazelluläre Matrix als bei der reinen Eculizumab- und bei der Placebo-Gruppe (p=0,01, bzw. p=0,0001).

Durch die Hinzugabe von Eculizumab zum ACEi konnte hier dieses Ergebnis noch in signifikantem Maße verbessert werden (ACEi+Ecu:1,2 vs. ACEi:1,5 für 9,5 Wochen) (p=0,04).



Histologie-Score Laminin glomerulärer Score

Abb. 5: Die y-Achse umfasst Score-Werte von 0 - 3. Dies entspricht dem Bewertungsspielraum der Scorer. Deutlich ersichtlich ist der Effekt des Eculizumab im Vergleich zu den Placebo behandelten Versuchstieren. Als ergänzende Medikation zum ACEi zeigt sich kein signifikanter Unterschied.

Im tubulointerstiiellem Score zeigte sich ein ähnliches Bild. Es zeigten sich geringere Lamininakkumulationen ebenfalls hoch signifikant der Eculizumab-Gruppe im Vergleich zu der Placebo-Gruppe im Alter von 7,5 Wochen (p=0,0001) und signifikant niedrigere Werte im Alter von 9,5 Wochen im Vergleich dieser Gruppen. Im Alter von 7,5 Wochen war die extrazelluläre Matrixakkumulation der Eculizumab-Gruppe hoch signifikant geringer als die der ACEi-Gruppe und die der Kombinationsgruppe aus ACEi und Eculizumab. (0,97 vs. 1,7, bzw. 1,5)(p=0,0001, bzw. p=0,004). Zwischen der ACEi- und der ACEi + Eculizumab-Gruppe lag kein signifikanter Unterschied vor (p=0,6). Mit 9,5 Wochen allerdings wies die ACEi-Gruppe geringere und die ACEi + Eculizumab signifikant geringere Lamininwerte als die Eculizumab-Gruppe auf (p=0,0002).



Histologie-Score Laminin tubulointerstitieller Score

Abb. 6: Die y-Achse umfasst Score-Werte von 0 - 3. Dies entspricht dem Bewertungsspielraum der Scorer. Ein deutlicher Effekt des Eculizumab ist

mit 7,5 Wochen im Vergleich zu der Placebo behandelten Versuchsgruppe ersichtlich. Als zusätzliche Medikation in Ergänzung zum ACEI zeigt sich auch bezüglich des tubulointerstiiellen Scores kein signifikanter Unterschied.

3.2.2 Narbengewebe

Der Indikator für die Bildung von Narbengewebe ist Fibronectin. Im glomerulärem Score wiesen die Versuchstiere der Eculizumab-Gruppe in beiden untersuchten Altern weniger Narbengewebe als die anderen Behandlungsgruppen auf. Der Unterschied zu der Placebo-Gruppe war mit 9,5 Wochen hoch signifikant (p=0,0001. Der Unterschied der ACEi- zur ACEi+Eculizumab-Gruppe war mit 7,5 Wochen nicht signifikant (p=0,99). Beide wiesen signifikant weniger Narbengewebe auf als die Placebo-Gruppe (p=0,001 für ACEi, bzw. p=0,0004 für ACEI+Eculizumab). Mit 9,5 Wochen hingegen zeigte sich ein hoch signifikanter Unterschied mit deutlich geringerer Narbenbildung bei der ACEi+Eculizumab-Gruppe als bei der ACEi-Gruppe (p=0,0001).

Auffällig war die signifikant höhere Narbenbildung der Wildtypkontrolle im Alter von 7,5 Wochen im Vergleich mit allen anderen Gruppen mit Ausnahme der reinen Placebo-Gruppe (p=0,001 bis p=0,0001).

Histologie-Score Fibronectin glomerulärer Score (10x)



Abb. 7: Die y-Achse umfasst Score-Werte von 0 - 3. Dies entspricht dem Bewertungsspielraum der Scorer. In beiden Altersgruppen fällt ein deutlicher signifikanter Unterscheid zwischen der Placebo und er Eculizumab-Gruppe auf. Mit 9,5 Wochen stellt sich ein deutlicher Effekt des Eculizumab als Zusatz zur ACEI-Monotherapie dar.

Auch im tubulointerstitiellem Score zeigten sich signifikant geringere Fibronectinmengen bei der Eculizumab-Gruppe im Vergleich mit der Placebo-Gruppe mit 7,5 und hoch signifikant geringere mit 9,5 Wochen (p=0,001, bzw. p=0,0001). Die ACEi- und die Kombinationsgruppe aus ACEi und Eculizumab zeigten weniger, aber nicht signifikant weniger Narbengewebe als die Eculizumab-Gruppe (p=0,06, bzw. p= 0,12). Mit 7,5 Wochen war bei der ACEi+Eculizumab-Gruppe weniger Narbengewebe als bei der ACEi-Gruppe nachweisbar. Allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant (p=0,98). Mit 9,5 Wochen hingegen war bei der ACEi+Eculizumab-Gruppe ein deutlicher Effekt sichtbar und diese Versuchsgruppe wies weniger Fibronectin auf als die ACEI-Gruppe. Der Unterschied war hoch signifikant (p=0,0001).

Histologie-Score Laminin tubulointerstitieller Score



Abb. 8: Die y-Achse umfasst Score-Werte von 0 - 3. Dies entspricht dem Bewertungsspielraum der Scorer. In beiden Altersgruppen ist ein signifikanter Unterschied zu Gunsten der Eculizumab-Gruppe im Vergleich mit der Placebo-Gruppe erkennbar. Mit 9,5 Wochen stellt sich auch im tubulointerstitiellem Score ein deutlicher Effekt des Eculizumab als Zusatz zur ACEI-Monotherapie dar.

3.2.3 Ergebnisse Komplementfärbung

Die Komplementfärbung für C3 und C5 wurde sowohl mit einer Vergrößerung von 200x als auch bei 400-facher Vergrößerung untersucht. Pro Versuchsgruppe wurden jeweils die Nieren von mindestens 3 Tieren im Alter von je 7,5 und 9,5 Wochen gefärbt und bewertet.

3.2.3.1 C3

Die Kontrolltiere des Wildtyps wiesen die geringste spezifische Färbung auf. Eine sichtbare Eigenfluoreszenz war allerdings teilweise zu beobachten. Die stärkste Färbung war bei den Tieren der Placebo-Gruppe zu sehen. Eine spezifische Anfärbung war hier insbesondere im Bereich der apikalen Tubulus-Zellen zu beobachten. Darüber hinaus war in der 40x Vergrößerung eine diffuse Färbung des Interstitiums, sowie in diversen Glomeruli zu sehen



Abb.9: C3Placebo,7,5 WochenAMarkiert: Ablagerungen im Tubulusepithel

Abb.10:C3Placebo,9,5 Wochen

Auf einigen Schnitten der reinen Eculizumab-Gruppe wurde eine dezentere Färbung, besonders im Bereich der Tubulus-Zellen beobachtet als in den Nieren der Placebo-Gruppe. Im Interstitium und den Glomeruli der mit Eculizumab behandelten Nieren war zudem die Dichte an spezifisch angefärbten Bereichen geringer als bei der Placebo-Gruppe. Diese Beobachtung zeigte sich in beiden untersuchten Altersgruppen, wobei der Unterschied bei den 7,5 Wochen alten Mäusen stärker ausgeprägt war. Zudem wiesen bei der Eculizumab-Gruppe einige Schnitte nur eine sehr schwache Färbung auf.



Abb.11: C3Eculizumab,9,5 Wochen

Bei den nur mit ACEi behandelten Nieren war die Gesamtmenge an spezifisch gefärbten Arealen deutlich geringer als bei beiden bisher beschriebenen Gruppen. Im Interstitium war wenig spezifische Färbung nachweisbar, in den Glomeruli wurde nur vereinzelt eine Anfärbung für C3 gefunden. Am stärksten war nach der Behandlung mit ACEi die Färbung im Bereich der Tubulus-Zellen, am ehesten Lumen nah.



Abb. 12: C3ACEi,7,5 Wochen Markiert: glomeruläre tubuläre Ablagerungen

Abb. 13: C3ACEi,9,5 Wochen markiert: leichte glomeruläre und Ablagerungen

Bei der Kombinationsgruppe, die sowohl mit Eculizumab als auch mit ACEi behandelt worden war, erreichte die Färbung der Schnitte der 7,5 Wochen alten Versuchstiere ähnlich schwache Werte wie bei denen der Wildtypen mit sehr wenig Färbung. Lediglich bei einem Tier war in sehr wenigen Bereichen der Niere im Interstitium und den Glomeruli eine spezifische Färbung zu erkennen.

Bei den Tieren im Alter von 9,5 Wochen zeigte sich bei dieser Behandlungsgruppe ein ähnliches Bild.



Abb. 14: C3ACEi+Eculizumab 7,5 Wochen

3.2.3.2 C5

Bei den Färbungen auf die Komplementkomponente C5 waren die Wildtypen weitestgehend frei von spezifischen Anfärbungen. Auch bei dieser Färbung war eine deutliche Eigenfluoreszenz beobachtbar.

Die reine Placebo-Gruppe wies im Alter von 7,5 Wochen ein gemischtes Bild mit Nierenbereichen ohne große Mengen spezifischer Färbung und solchen mit stärkerer Färbung auf. Besonders die Glomeruli und die Bowmansche Kapsel waren deutlich mit C5 gefärbt.

Im Alter von 9,5 Wochen war bei der Placebo-Gruppe zunehmend eine spezifische Färbung in der Peripherie der Gefäße und im Bereich der Tubuli sowie in geringerem Maße im Interstitium sichtbar.



Abb. 15: C5Placebo7, 5 WochenAbb. 16: C5Placebo9,5 WochenMarkiert: Ablagerungen um die Tubuli und im Bereich des Glomerulums

Die reine Eculizumab-Gruppe zeigte insgesamt in beiden Altern etwas weniger spezifische Färbung als die Placebo-Gruppe, speziell im Bereich der Tubuli.



Abb. 17: Eculizumab7,5 Wochen Abb. 18: Eculizumab9,5 Wochen Die ACEi-Gruppe wies mit 7,5 Wochen in großen Bereichen nur sehr geringe Mengen an spezifischer Färbung auf. In manchen Nieren waren jedoch spezifisch angefärbte Bereiche im Bereich der Tubuli und der Glomeruli erkennbar, wenn auch nur diskret. Mit 9,5 Wochen war eine deutliche Zunahme der angefärbten Bereiche sichtbar. Sowohl die Zellen der Tubuli als auch die Glomeruli wiesen deutlich mehr Komplementablagerungen auf als die Schnitte der 7,5 Wochen alten Tiere. Der Gesamteindruck war vergleichbar mit den 9,5 Wochen alten Versuchstieren der reinen Eculizumab-Gruppe.



Abb. 19: ACEi7,5 WochenAbb. 20: ACEi9,5 WochenMarkiert: Ablagerungen um die Tubuli und im Bereich der BowmanschenKapsel

Bei der Kombinationsgruppe, die mit ACEi und Eculizumab behandelt wurden, war das Bild dem der Wildtypen sehr ähnlich. In einigen Bereichen war nur eine geringe spezifische Färbung der Tubulus-Zellen nachweisbar, der Großteil der Nieren war aber frei von spezifisch angefärbten Komplementablagerungen.



Abb. 21: C5ACEi+Eculizumab9,5 Wochen

3.3 Uringele

In den Uringelen wurde der therapeutische Effekt von Eculizumab in Kombination mit Ramipril im Vergleich zu einer Ramipril-Monotherapie auf die relative Proteinurie untersucht. Zudem wurde eine Wildtyp-Kontrolle aufgetragen. Es wurde jeweils Urin aus der 4,5., 6., 7,5. und 9,5. Lebenswoche untersucht. Insgesamt ließ sich in fast allen Gelen ein deutlicher Anstieg der Proteinurie mit zunehmendem Alter der Versuchstiere nachweisen. Lediglich die Proben der 9,5-Wochen alten Mäuse zeigten regelmäßig wieder abnehmende Proteinuriewerte.

In einem weiteren Ansatz wurde der therapeutische Effekt von Eculizumab gegenüber einer Placebo-Probe getestet. Es wurde ebenfalls Urin aus der 4,5., 6., 7,5. und 9,5. Lebenswoche verwendet.

Mittels einer gelelektrophoretischen Auftrennung der im Urin enthaltenen Proteine ist es möglich, das Ausmaß der Proteinurie je nach molekularer Größe zu bestimmen. Bei dieser semiquantitativen Auswertung wurde die Proteinmenge jeweils in Relation zu einer gepoolten 7,5 Wochen alten Placebo-Referenz-Probe ermittelt.

Die Proteinurie wurde für hochmolekulare Proteine, Albumin und niedermolekulare Proteine bestimmt. Eine verstärkte Ausscheidung der hochmolekularen Fraktion steht für einen glomerulären Schaden, die niedermolekulare für einen tubulointestitiellen, und das Albumin reflektiert eine Mischung aus beidem.

Von besonderem Interesse war der therapeutische Effekt von Eculizumab in Kombination mit Ramipril im Vergleich zu einer Ramipril-Monotherapie auf die relative Proteinurie. Zudem wurde eine Wildtyp-Kontrolle aufgetragen.

Die hochmolekularen Banden befanden sich im Bereich oberhalb der 70 kDa. In diesem Bereich zeigte sich eine signifikante bei 6w, bei 7,5 Wochen sogar eine hoch signifikante Erhöhung der Proteinausscheidung der Placebo Gruppe im Vergleich mit der Wildtyp-Kontrollgruppe (p=0,0001 bei 7,5 Wochen und p=0,005 bei 6 Wochen). Mit Ausnahme der 9,5 Wochen alten

Versuchstiere lag die Proteinurie der Mäuse in der ACEi und der ACEi+Eculizumab-behandelten Gruppe signifikant niedriger als in der Placebo-Gruppe (p zwischen 0,004 und 0,0001). Sowohl die ACEi-Gruppe als auch die ACEi+Eculizumab-Gruppe wiesen eine geringere Proteinurie im hochmolekularen Bereich auf als die Eculizumab-Gruppe. Bei der ACEi-und der ACEi+Eculizumab-Gruppe zeigten sich in keinem Alter signifikante Unterschiede (p=0,84 bis p=0,99).



relative Proteinurie: hoch molekulare Proteine

Abb. 22: Die y-Achse stellt die relative Proteinurie hoch molekularerer Proteine bezogen auf eine gepoolte Urinprobe verschiedener 7,5 Wochen alter Versuchstiere der Placebo-Gruppe dar. Insgesamt zeigt sich eine geringere Proteinurie bei den mit Eculizumab therapierten Versuchstieren im Vergleich zu der Placebo-Gruppe und noch einmal geringere Werte bei den mit dem ACEi behandelten Gruppen. Eculizumab als Zusatztherapie zum ACEi erzielte keinen signifikanten Effekt.

Die molekulare Größe von Albumin beträgt 65-70 kDa. Auch hier war die Proteinausscheidung der Wildtypen am geringsten. Der Urin der Mäuse aus der Placebo- und der Eculizumab-Gruppe wies ähnlich hohe Proteinmengen auf. Mit Ausnahme der 4,5 Wochen alten Tiere zeigte sich kein positiver Effekt durch die zusätzliche Gabe von Eculizumab neben dem ACEi. Mit 6 Wochen, 7,5 Wochen und 9,5 Wochen wiesen die Versuchstiere der ACEi+Eculizumab-Gruppe durchgehend leicht höhere Albuminwerte auf als die ACEi-Gruppe.



relative Proteinurie: Albumin

Abb. 23: Die y-Achse stellt die relative Albinumiere bezogen auf eine gepoolte Urinprobe verschiedener 7,5 Wochen alter Versuchstiere der Placebo-Gruppe dar.

Als niedermolekulare Fraktion wurden die Proteine mit einer geringeren Größe als 60 kDa definiert. Hier wurde bei der Eculizumab-Gruppe die geringste Proteinausscheidung aller Versuchsgruppen im Urin nachgewiesen, mit Ausnahme der 4,5 Wochen Gruppe (Ratio Eculizumab 4,5 Wochen: 0,46 \pm , ACEi + Eculizumab: 0,27 \pm 4,5 Wochen). Die Werte lagen in der Eculizumab-Gruppe, bis auf die beschriebene Ausnahme, sowohl niedriger als die der ACEi- und der ACEi+Eculizumab-Gruppe sowie der Placebo-Gruppe. Im Vergleich der beiden ACEi-Gruppen wies die ACEi+Eculizumab-Gruppe in jedem Alter geringere Proteinuriewerte auf. Diese Unterschiede erwiesen sich statistisch jedoch als nicht signifikant (p=0,24 bis p=0,99).





Abb. 24: Die y-Achse stellt die relative Proteinurie hoch molekularerer Proteinebezogen auf eine gepoolte Urinprobe verschiedener 7,5 Wochen alter Versuchstiere der Placebo-Gruppe dar. Es zeigen sich niedrige Proteinuriewerte bei der Eculizumab Monotherapie-Gruppe als bei den beiden ACEI therapierten Gruppen mit Ausnahme der 4,5 Wochen alten Versuchstiere.



Pla Ecu Ecu Gruppe Μ WT Pla A+E A + EА A 9,5 7,5 Wochen 7,5 9,5 7,5 9,5 7,5 7,5 9,5 M=Marker, A=ACEi, E=Eculizumab

Abb. 25: Uringel (ACEI + Eculizumab Probe mit 7,5 Wochen in diesem Fall verunreinigt)

3.4 Western Blotting

Jeweils im Alter von 7,5 und 9,5 Wochen wurden von drei Tieren je Behandlungsgruppe eine halbe Niere zur Untersuchung der Expression der profibrotischen Proteine TGF β und CTGF verwendet. Für die Untersuchung wurde ein Western Blot durchgeführt und die Ergebnisse densitometrisch quantifiziert. Als Vergleich wurden zwei Wildtypnieren verwendet. Die densitometrisch bestimmten Werte für TGF β und CTGF wurden normalisiert, indem sie jeweils in Relation zu den entsprechenden Werten des ubiquitär im Zytoskelett vorkommenden β Actin gesetzt wurden. Das molekulare Gewicht von β Actin liegt bei 42 kDa. Die TGF β Bande lag entsprechend dem molekularen Gewicht des TGF β bei 25 kDa; die des CTGFs disseminiert in zwei Banden bei 38 kDa und bei 44 kDa.

3.4.1 TGFβ

Die Analyse der Expression des TGF β ergab bei jeder Versuchsgruppe eine Zunahme der Werte für die 9,5 Wochen alten Versuchstiere im Vergleich mit den 7,5 Wochen alten Tieren. Im Alter von 7,5 Wochen wies die Placebo-Gruppe signifikant niedrigere Werte auf als die Wildtypen (p=0,002) und die Tiere der ACEi+Eculizumab-Gruppe (p=0,0004) und nicht signifikant höhere Werte als die reine ACEi- und die reine Eculizumab-Gruppe (p=0,32, bzw. p=0,98). Mit 9,5 Wochen zeigten sich die höchsten Werte für die Versuchstiere der ACEi-Gruppe und die der ACEI+Eculizumab-Gruppe. Die Unterschiede in diesem Alter waren zwischen keinen Versuchsgruppen signifikant.



Abb. 26: Die y-Achse zeigt die auf Actin bezogene relative Expression von TGF β .



Abb. 27: Die y-Achse zeigt die auf Actin bezogene relative Expression von TGF β .

3.4.2 CTGF

Für die Expression von CTGF im Alter von 7,5 Wochen wiesen die Placebo-, die Eculizumab- und die ACEi-Gruppe ähnliche Werte im Bereich der 44 kDa-Form auf. Es war kein signifikanter Unterschied zu erkennen. Jedoch in der ACEi+Eculizumab-Gruppe wurde eine nur etwa halb so hohe Expression von CTGF wie in der ACEi-Gruppe beobachtet. (Ratio:0,73 zu 1,58 für die ACEi oder Placebo-Gruppe).

Für die 38 kDa-Form zeigten sich bei allen Gruppen ähnliche Werte. Die ACEI+Eculizumab-Gruppe wies niedrigere Werte auf als die ACEI- und die reine Eculizumab-Gruppe, jedoch höhere als die Placebo-Gruppe. Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.



Abb. 28: Die y-Achse zeigt die auf Actin bezogene relative Expression der 44 kDa-Bande des CTGF.



Abb. 29: Die y-Achse zeigt die auf Actin bezogene relative Expression der 38 kDa-Bande des CTGF.

Mit 9,5 Wochen wies die 44-kDa-Form in der Eculizumab-Gruppe die geringsten Werte auf im Vergleich mit den drei anderen Gruppen. Im Vergleich mit der ACEI+Eculizumab-Gruppe war der Unterschied hoch signifikant (Ratio 0,77 zu 2,95) (p=0,006). Auch die Placebo-Gruppe exprimierte signifikant weniger CTGF als die ACEI+Eculizumab-Gruppe (Ratio 1,07 zu 2,95) (p=0,006).

Bezogen auf die 38 kDa-Form wies die Placebo-Gruppe die niedrigsten Werte auf, gefolgt von der Eculizumab-Gruppe und der ACEI-Gruppe. Die ACEi+Eculizumab wies die höchsten Werte auf.



Abb. 30: Die y-Achse zeigt die auf Actin bezogene relative Expression der 44 kDa-Bande des CTGF.



Abb. 31: Die y-Achse zeigt die auf Actin bezogene relative Expression der 44 kDa-Bande des CTGF.

3.5 Harnstoffkonzentration im Serum

Harnstoff gehört zu den harnpflichtigen Substanzen. Die Serumkonzentration von Harnstoff ist ein häufig benutztes Maß für die Nierenfunktion.

Placebo behandelte Tiere zeigten mit 88,6/dl mit 7,5 Wochen und mit 544,1mg/dl nach 9,5 Wochen deutlich erhöhte Harnstoffserumwerte im Vergleich zu den Wildtypen (jeweils 27mg/dl).

In 7,5 Wochen alten Versuchstieren der Eculizumab-Gruppe waren die Harnstoffmengen im Serum um ungefähr die Hälfte geringer als bei der Placebo-Gruppe (Mittelwert: 41,0 mg/dl Eculizumab vs. 88,6 mg/dl Placebo). Mit 9,5 Wochen stieg die Harnstoffkonzentration in den unbehandelten Alport-Mäusen stark an. Dieser Anstieg fiel in der Eculizumab-Gruppe wesentlich geringer aus (Mittelwert: 313,6 mg/dl Eculizumab vs. 544,1 mg/dl Placebo).

Die beiden ACEi-Gruppen zeigten einen geringeren Anstieg des Serumharnstoffs zwischen 7,5 Wochen und 9,5 Wochen. Der Wert der 9,5 Wochen alten Mäuse, die mit ACEi behandelt wurden, war hoch signifikant geringer als der der Placebo-Gruppe (p=0,0003 für ACEi und p=0,0003 für ACEi+Eculizumab). Nach 7,5 Wochen wiesen beide mit ACEi behandelten Gruppen ähnlich niedrige Harnstoffwerte auf wie die Mäuse der Eculizumab-Gruppe (Mittelwert: 41,0 mg/dl Eculizumab vs. 40,7 mg/dl ACEI+Eculizumab und 39,8 mg/dlACEi). Mit 9,5 Wochen wurden dann im Vergleich mit der Eculizumab-Gruppe signifikant geringere Werte bei der ACEi- (p=0,01) und hoch signifikant geringere Werte bei der ACEi+Eculizumab-Gruppe (p=0,001) gemessen. (Mittelwert: 313,6 mg/dl Eculizumab vs. 45,6mg/dl ACEi und 39,8mg/dl ACEI+Eculizumab).

Dieser zusätzliche Effekt von Eculizumab zu der ACEi-Therapie erwies sich allerdings nicht als signifikant (p=0,99).



Abb. 32: Die y-Achse zeigt die Serumharnstoffwerte in mg/dl. Auffällig ist der Effekt des ACEi auf die 9,5 Wochen alten Versuchstiere. Durch die Zusatzmedikation mit Eculizumab konnte nur ein geringer, nicht signifikanter Unterschied erreicht werden.

4. Diskussion

4.1 Einleitung der Diskussion

Bisher existieren nur wenige Behandlungsmöglichkeiten, die den klinischen Verlauf des Alport-Syndroms verbessern.

Der größte Effekt wird bis heute durch die klinisch etablierte und empfohlene (Gross et al. 2012, Kashtan 2015) und im Mausmodell gut untersuchte (Gross et al. 2003) Blockade des RAAS mittels ACEi, z.B. Ramipril erreicht.

Für eine elementare Beteiligung des Komplementsystems an der Entwicklung der Nierenfibrose im Kontext des Alport-Syndroms gibt es deutliche Hinweise. Die beim Alport-Syndrom auftretende erhöhte Proteinurie führt zu einer vermehrten Filtration von Bestandteilen des Komplementsystems (Abbate et al. 2006). Verschiedene Faktoren sorgen für eine Aktivierung der Komplement-Kaskade im Bereich der PTECs (Ichida et al. 1994, Biancone et al. 1994). Hierbei kommt der C3-Komponente (Tang et al. 2009) sowie dem MAC/C5-C9 eine herausragende Rolle zu (Nangaku et al. 2002). Genau an dieser Stelle, der Spaltung von C5 in C5a und C5b, setzt Eculizumab an.

Daher sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob Eculizumab im Zusammenspiel mit dem etablierten ACEi im Mausmodell des Alport-Syndroms zu einer Verbesserung der Nierenfunktion und der Nierenfibrosierung führt.

Unsere Untersuchungen zeigten eine Verminderung der Akkumulation extrazellulärer Matrix und der Fibrose in den mit Eculizumab behandelten Tieren im Vergleich zu den Tieren der Placebo-Gruppe. Bei den mit Eculizumab als Zusatzmedikation zum ACEi behandelten Mäusen im Vergleich mit der ACEi-Monotherapie konnte ein Zusatzeffekt nachgewiesen werden. In Bezug auf die Überlebensdauer, die Nierenfunktion und die Proteinurie fiel der positive Einfluss der zusätzlichen Eculizumab-Behandlung etwas geringer aus. Im Folgenden wurden jeweils die einzelnen Ergebnisse und die dazugehörigen Methoden diskutiert.

4.2 Überlebensdaten

Der deutlichste Effekt bezüglich der Überlebensdauer wurde nach der Behandlung der Alport-Mäuse mit den ACEi beobachtet, sowohl alleine angewandt als auch in Kombination mit Eculizumab. Mit Eculizumab alleine wurde nur eine geringe Verlängerung der Lebensdauer im Vergleich zu der Placebo-Gruppe erreicht. In Kombination mit dem ACEi erhöhte Ecu das Überleben nur geringfügig im Vergleich mit der ACEi+Placebo-Gruppe. Hier besteht eine deutliche Diskrepanz zwischen dem erkennbaren Effekt der Eculizumab-Therapie auf die Ergebnisse der Immunhistologie und der geringeren Verbesserung der anhand des Serumharnstoffes ermittelten Nierenfunktion unter Eculizumab-Therapie.

Ein Grund hierfür könnte eine zumindest lokal vermittelte Hemmung des Komplementsystems im Bereich der Punktionsstellen mit Folge eines erleichterten Eintrittes von Bakterien sein. So ist bekannt, dass unter einer Eculizumab-Therapie die Gefahr einer Infektion besonders mit bekapselten Bakterien erhöht ist (Dmytrijuk et al. 2008).

Dies könnte über eine dauerhafte Aktivierung des Immunsystems zu erhöhtem Stress der Versuchstiere geführt haben, auch wenn lokale Inflammationen und generelle Erkrankungszeichen nicht erkennbar waren.

Des Weiteren ist bekannt, dass eine Verringerung der Nierenfibrose im Mausmodell nicht mit einer Verbesserung der Überlebenszeit einhergehen muss (Ninichuk et al. 2006).

4.3 Diskussion Histologie

Erwartungsgemäß wiesen die ACEi-behandelten Versuchstiere signifikant weniger EZM-Akkumulation und weniger Narbengewebe auf als die nicht behandelten Placebo-Versuchstiere (Gross et al. 2003).

Die Eculizumab-Therapie zeigte sich sowohl als Monotherapie gegenüber den Placebo behandelten Tieren als auch als On-top-Medikation mit dem ACEi gegenüber den nur mit dem ACEi therapierten Versuchstieren als erfolgreich, teilweise in deutlichem Ausmaß.

Der immunhistochemischen Färbung auf Fibronectin als Marker für Narbengewebe ist der Nachteil immanent, dass Narbengewebe an sich inhomogen und schwer gleichmäßig darstellbar ist. Diese Unregelmäßigkeit wird jedoch durch die Anzahl der untersuchten Schnitte ausgeglichen und so ein Vergleich der Behandlungsgruppen möglich.

Die Folgen der Proteinurie übertragen sich über verschiedene Mechanismen auf das Tubulointersitium. Die Effekte des ACEi auf die EZM-Akkumulation und die Narbenbildung beruhen zum Teil auf der verminderten Proteinurie.

Das Eculizumab wirkt synergistisch zu der ACEi-Behandlung, indem es die Formation der Endstrecke des Komplementsystems aus den filtrierten Komponenten in den Tubuli hemmt. Hierfür sprechen zum einen die Ergebnisse der Histologie, besonders der Vergleich der Laminin-Färbung zwischen ACEi Monotherapie und der kombinierten ACEi- und Eculizumab-Therapie, zum anderen die Urinanalysen, welche eine Abnahme der Ausscheidung niedrig molekularer Proteine erkennen lassen und damit auf funktionsfähigere Tubulus-Zellen unter Eculizumab-Therapie hinweisen. Die C5 Färbungen bestätigen dies und zeigen eine geringere Komplementanfärbung im Bereich der Tubuli bei den mit Eculizumab behandelten Versuchstieren.

Die Färbung im Bereich der Glomeruli ist am ehesten auf ein rückwärts gerichtetes Übergreifen der in den Tubuli aktivierten Komplementsystem Kaskade zu begreifen. Außerdem führt die Abnahme der Anzahl funktionierender Glomeruli zu einer stärkeren Belastung durch Proteine für die noch intakten Glomeruli. Dies hat zur Folge, dass eine vermehrte Initiierung des alternativen Aktivierungswegs des Komplementsystems schon im Bereich der Glomeruli stattfindet (Abbate et al. 2008). Dies erklärt auch die Verringerung der C3 Ablagerungen bei den mit Eculizumab behandelten Tieren, obwohl Eculizumab erst später in die Komplement Kaskade eingreift.

4.4 Proteinurie

Von besonderem Interesse war in dieser Arbeit der therapeutische Effekt von Eculizumab in Kombination mit Ramipril im Vergleich zu einer Ramipril-Monotherapie auf die relative Proteinurie.

Hier konnte Eculizumab als Ergänzung zu der ACEi-Medikation nur einen geringen Effekt bewirken. Dieser beschränkte sich hauptsächlich auf die niedermolekulare Proteinfraktion, was als Folge eines verminderten Tubulointerstitiellen Schadens interpretiert werden kann (Guder und Hofmann 2008). Insgesamt stehen die Ergebnisse der Proteinurie-Untersuchungen in einem gewissen Gegensatz zu den deutlich positiven Effekten des Eculizumab alleine oder in Kombination mit dem ACEi im Hinblick auf die Ergebnisse, die bei der Histologie der Nieren der behandelten Tiere beobachtet wurden. Es wäre durchaus denkbar, dass die Komplementsysteminhibition geeignet ist, die Folgen der Proteinurie, also die Übertragung des Glomerulären Schadens auf das Tubulointerstitium, zu verhindern, nicht jedoch die Proteinurie selbst. Die bereits in der Einleitung zitierte Studie von Nangaku et al. (2002) und anderer (Tang et al. 2009) untermauert diese Hypothese.

Statt einer Betrachtung der Gesamtproteinurie scheint es sinnvoll, die Proteinurie an Hand bestimmter Markerproteine in ihrer Schädlichkeit einzustufen. Entsprechend wäre es denkbar, mittels der Proteomic-Technik Markerproteine für ein schlechtes Outcome einer Proteinurie zu finden (Pohl et al. 2013, Dihazi und Müller 2007), um ggf. eine Komplementsystem inhibierende Therapie zu beginnen.

Eine Verminderung der Proteinurie durch die Therapie mit dem ACEi war nachweisbar und ebenfalls zu erwarten (Gross et al. 2003). Die Ergebnisse der Western-Blot-Untersuchungen auf TGFβ-1 waren in dieser Arbeit nicht eindeutig und ließen kein logisch nachvollziehbares Muster erkennen. Als eine mögliche Ursache kann die Verwendung der kompletten Nieren inklusive Bindegewebe, Kapsel und Gefäßen gesehen werden.

Die geringere Expression des TGF β -1 bei den 7,5 Wochen alten Placebo behandelten Versuchstieren im Vergleich zu den gesunden Wildtypen war nicht zu erwarten, da TGF β -1 als profibrotischer Faktor bei gesunden Versuchstieren nur in geringen Mengen vorkommen sollte (Sayers et al. 1999).

Außerdem war die höhere Expression von TGF β bei den mit ACEi behandelten Tieren, sowohl in Kombination mit dem Placebo als auch mit Eculizumab, im Vergleich zu der reinen Placebo Gruppe widersprüchlich zu vorangegangenen Versuchen (Gross et al. 2003, Gross et al. 2004). Dieses Phänomen wäre allerdings bei den 9,5 Wochen alten Tieren durch eine geringere Anzahl noch zur TGF β -1-Produktion fähiger Zellen wie distale Tubulus-Zellen, Podozyten und Zellen des parietalen Blattes der Bowmanschen Kapsel zu erklären (Sayers et al. 1999), welche auf Grund der parallel ablaufenden konsekutiven Entwicklung der Nierenfibrose abnehmen.

Ein synergistischer Effekt des Eculizumab als on-top Medikation mit dem ACEi blieb aus. Eine mögliche Erklärung wäre u. a. ein TGF β -1 vermittelter profibrotischer Effekt der C3a Komponente, deren Aktivierung nicht durch Eculizumab inhibiert wird (Tang et al. 2009).

Die Produktion und Funktion des CTGF ist eng verknüpft mit TGF β -1 (Mori et al. 1999). Analog zu den TGF β -1 Ergebnissen wurden auch hier relativ hohe Mengen an CTGF in den Wildtypen und den ACEi behandelten Tieren nachgewiesen. Der positive Effekt des Eculizumabs in Kombination mit dem ACEi auf die 38 kDa-Form des CTGF bei den 7,5 Wochen alten Mäusen konnte bei den 9,5 Wochen alten Tieren nicht bestätigt werden.

4.6 Serumharnstoff

Harnstoff ist das Endprodukt des Katabolismus von Proteinen und Aminosäuren. Der im intra- und extrazellulären Raum vorkommende Harnstoff wird in den Glomeruli filtriert und teilweise in den Tubuli zusammen mit Wasser wieder resorbiert. (Gowda et al. 2010).

Im Mausmodell ist Harnstoff ein zuverlässiger Biomarker zur Einschätzung der Nierenfunktion, da unter den kontrollierten Bedingungen der Tierhaltung Faktoren wie Herzerkrankungen, Über- oder Unterernährung, keinen Einfluss auf die Harnstoffserumkonzentration haben.

In unserem Mausmodell zeigte sich beim Vergleich der Placebo- und der reinen Eculizumab-Gruppe ein nephroprotektiver Effekt des Eculizumab. Als On-top-Medikation zum ACEi ist ebenfalls eine, wenn auch geringere, positive Wirkung festzustellen. Beides ist kohärent mit den histologischen Ergebnissen in dieser Arbeit. In einer Studie mit Mäusen, deren C5a-Rezeptor mittels siRNA inaktiviert wurde, konnte eine Abnahme des Serumharnstoffspiegels ebenfalls nachgewiesen werden. In diesem Fall wurden die Auswirkungen des C5a-Rezeptormangels nach einem durch Ischämie-Reperfusion induzierten Nierenschaden untersucht (Zheng et al. 2008).

Eine exaktere Bestimmung der Nierenfunktion wäre allerdings über eine Einbeziehung der Körperoberfläche und die Einbeziehung der Kreatininclearance möglich (Rodrigues et al. 2014).

4.7 Ausblick

Die Ergebnisse der Eculizumab-Therapie sind bei der kurzen Therapiedauer besonders eindrücklich. Auch die mit dem ACEi therapierten Versuchstiere wiesen mit 6 Wochen eine Proteinurie auf, und es ist davon auszugehen, dass mit Einsetzen der Proteinurie die Aktivierung der Komplementsystem Kaskade beginnt. Als deutliches Anzeichen hierfür ist die geringere Proteinurie im Bereich der niedrig molekularen Proteine der ACEi+Eculizumab- und sogar der reinen Eculizumab-Gruppe im Vergleich mit der ACEi-Gruppe jeweils mit 6 Wochen zu werten. Dieser Befund spiegelt ein intakteres Tubulointerstitium in den Eculizumab-behandelten Versuchstieren in einem relativ frühen Stadium der Proteinurie wider. Bereits geringe sublytische Konzentrationen des MAC/C5-9 führen über unterschiedliche Mechanismen zu einer Zellschädigung und Aktivierung proinflamatorischer und profibrotischer Faktoren. (David et al. 1997, Abe et al. 2004, Triantafilou et al. 2013).

Allerdings bleibt es fraglich, ob ein früherer Therapiebeginn auf Grund der immensen Kosten und der potentiellen Nebenwirkungen einer Eculizumab-Therapie klinisch realistisch ist. Patienten unter Eculizumab-Therapie sind einem erhöhten Risiko einer Infektion durch Neisseria Meningitidis ausgesetzt und müssen deshalb prophylaktisch geimpft und regelmäßig untersucht werden (Dmytrijuk et al. 2008 und Bouts et al. 2011). Hinzu kommt die Beteiligung und Wechselwirkung des Komplementsystems im Rahmen der Gerinnungskaskade, Wundheilung (Ricklin et al. 2010) und Thrombozytenfunktion (Speth et al. 2015).

Ein Lösungsansatz wäre hier eine gezielte, lokal im Bereich der Tubuli wirkende Komplementsystem-Blockade zu finden, mit dem Ziel, die systemische Funktion der Komplementsystem-Endstrecke zu konservieren.

In einem Mausversuch gelang es z.B. eine lokale C3 Inhibition durchzuführen. Hierfür wurde ein Fragment des Komplementrezeptors 2 (C2R), der an die Spaltprodukte iC3b, C3dg, und C3d der C3-Komponente bindet, an ein murines Analogon des menschlichen löslichen C3-Inhibitors CR1 gekoppelt. Diese Spaltprodukte kommen zellgebunden nur am Ort der Komplementaktivierung vor und deshalb konnte der C3-Inhibitor zielgerichtet nur am Ort der Aktivierung wirken. Dabei wurde eine Reduktion von Komplement-Ablagerungen und inflammatorischen Zellen beobachtet. Eine erhöhte Rate an Infektionen war nicht nachweisbar, und die Rolle des Komplementsystems bei einer induzierten Sepsis wurde nicht eingeschränkt, ganz im Gegensatz zu einer mit einem systemisch wirkenden C3-Inhibitoren therapierten Kontrollgruppe (Atkinson et al. 2005). Allerdings wurde die Studie mittels eines Ischämie-Reperfusionsinduzierten Schadens des Darms durchgeführt, bei dem eine schnelle Therapie entscheidend ist. Es ist also unklar, ob sich dieser Therapieansatz im Rahmen der über einen längeren Zeitraum ablaufenden Nierenfibrose beim Alport-Syndrom als sinnvoll erweisen würde. In einer weiteren Untersuchung gelang es, einen C5-Antikörper an ein rekombinantes Protein, das spezifisch an inflammatorisches Synovia Gewebe bindet, zu koppeln und dieses im Rahmen einer induzierten Arthritis im Versuchstier und an humanen Resektionspräparaten gezielt an den Ort der synovialen Entzündung zu bringen (Macor et al. 2012). Fraglich ist, ob es im Falle der Proteinurie mit anschließender Komplement-Aktivierung gelingt, zum einen die Komplement-Aktivierung und zum anderen gezielt die Tubuli der Niere anzusteuern.

Wünschenswert wäre es, einen Versuch analog dem der Arbeitsgruppe um Macor aus dem Jahr 2012 durchzuführen. Hierfür müsste der Eculizumab-Antikörper mit Nierentubuli spezifischen Protein gekoppelt werden. So könnten eventuelle systemische Auswirkungen minimiert werden.

Darüber hinaus wäre eine unserem Versuch ähnliche Untersuchung mit einer größeren Versuchstierzahl und mehreren Versuchsgruppen sinnvoll. So könnte man zu unterschiedlichen Krankheitsstadien die Eculizumab-Therapie initiieren mit dem Ziel, den optimalen Zeitpunkt für den Beginn der Eculizumab-Therapie zu ermitteln. Umfangreiche Studien wie die "Early Pro-Tect"-Alport-Studie könnten zudem hilfreich sein, um geeignete Biomarker zu finden, anhand derer die Sinnhaftigkeit einer Eculizumab-Therapie abgeschätzt werden kann.
5. Zusammenfassung

Das Alport-Syndrom ist eine hereditäre progressive Nierenerkrankung, basierend auf einem Defekt eines oder mehrerer für die Typ IV-Kollagene kodierenden Gene. Dieser Defekt führt zu einer fehlerhaften Struktur der glomerulären Basalmembran, einer konsekutiven Fehlfunktion der Podozyten und letztendlich einer mehr oder weniger stark ausgeprägten Proteinurie.

Typisch für das Alport-Syndrom ist eine progressive, im terminalen Nierenversagen endende Verschlechterung der Nierenfunktion, eine sensoneuronale Schwerhörigkeit und Veränderungen der Augenlinse.

Verschiedene Studien konnten eine Beteiligung des Komplementsystems am Pathomechanismus der Übertragung der durch die Proteinurie vermittelten Schäden auf das Tubulointerstitium nachweisen. Unter anderem wurde dies für die Endstrecke des Komplemensystems, der Formation des Membranangriffskomplexes (MAC/C5-9b), beschrieben. Diese Datenlage führte zur Aufstellung der Hypothese, dass eine Inhibition des Komplementsystems eine zusätzliche Therapieoption für die Nierenschädigung beim Alport-Syndrom darstellen könnte.

Unsere Studie wurde so konzipiert, dass ein alleiniger Effekt des Komplement-Inhibitors, Eculizumab, sowie ein synergistischer Effekt in Kombination mit dem ACE-Inhibitor, Ramipril, untersucht werden konnte.

Als Versuchsgrundlage dienten Typ IV Kollagen (Col4A3) Knockout Mäuse, die als Modell für die Untersuchung des Alport-Syndroms gut etabliert sind und die in vier Versuchsgruppen eingeteilt wurden. Neben einer Gruppe, die den Komplement-Inhibitor erhielt, wurde eine mit der Kombination aus Komplement-Inhibitor und ACE-Inhibitor behandelt und eine lediglich mit dem ACE-Inhibitor. Als Kontrollgruppe diente eine Placebo-behandelte Versuchsgruppe.

Die augenscheinlichsten Effekte der Monotherapie, sowie der Kombinationstherapie waren in den immunhistochemischen Untersuchungen mit dem Marker für eine Akkumulation der extrazellulären Matrix, Laminin, sowie dem Narbengewebemarker, Fibronectin, zu beobachten. Hier zeigte sich eine Abnahme der EZM Akkumulation sowohl bei der Monotherapie mit Eculizumab als auch in stärkerem Ausmaße in der Kombination mit dem ACE-Inhibitor. Die qualitative Auswertung der Färbung der Komplementkomponenten C3 und C5 zeigten einen deutlichen Effekt des Eculizumabs alleine und in Kombination mit dem ACE-Inhibitor. Diese Ergebnisse wurden sowohl von der Urinanalyse als funktioneller Marker der Nierenfunktion, hier besonders im Bereich der niedrig molekularen Proteine, sowie der Harnstoffserumanalyse als Langzeitmarker der Nierenfunktion unterstützt. Der härteste Analyseendpunkt dagegen, das durchschnittliche Überleben der Versuchstiere, ergab nur einen minimalen additiven nephroprotektiven Effekt des Eculizumabs in Kombination mit dem ACE-Inhibitor.

Unsere Ergebnisse bestärken uns in der Annahme der Sinnhaftigkeit einer Komplement-Inhibition beim Alport-Syndrom. Eine gezielte Therapie mit einer speziellen Ausrichtung auf das Epithel der Nierentubuli anhand spezifischer Membranstrukturen könnte Nebenwirkungen reduzieren, indem es nicht zu einer systemischen Komplementinhibition käme. Weitere Studien sind notwendig, um eine Übertragbarkeit unserer im Mausmodell erhobenen Daten auf den Menschen zu evaluieren. Des Weiteren wäre es, auch auf Grund der enormen Kosten einer Eculizumab-Therapie, in einem weiteren Schritt notwendig, Parameter zu finden, anhand derer eine Abschätzung möglich wird, welche Patienten von einer solchen Therapie profitieren könnten und welche nicht.

6. Literaturverzeichnis

- Abbate M, Zoja C, Remuzzi G (2006): How does proteinuria cause progressive renal damage? J Am Soc Nephrol <u>17</u>, 2974–2984
- Abbate M, Zoja C, Corna D, Rottoli D, Zanchi C, Azzollini N, Tomasoni S, Berlingeri S, Noris M, Morigi M, (2008): Complement-mediated dysfunction of glomerular filtration barrier accelerates progressive renal injury. J Am Soc Nephrol <u>19</u>, 1158–1167
- Abe K, Li K, Sacks SH, Sheerin NS (2004): The membrane attack complex, C5b-9, up regulates collagen gene expression in renal tubular epithelial cells. Clin Exp Immunol <u>136</u>, 60–66
- Atkinson C, Song H, Lu B, Qiao F, Burns TA, Holers VM, Tsokos GC, Tomlinson S (2005): Targeted complement inhibition by C3d recognition ameliorates tissue injury without apparent increase in susceptibility to infection. J Clin Invest <u>115</u>, 2444–2453
- Barnett ANR, Asgari E, Chowdhury P, Sacks SH, Dorling A, Mamode N (2013): The use of eculizumab in renal transplantation. Clin Transplant <u>27</u>, E216-229
- Biancone L, David S, Della Pietra V, Montrucchio G, Cambi V, Camussi G (1994): Alternative pathway activation of complement by cultured human proximal tubular epithelial cells. Kidney Int <u>45</u>, 451–460
- Boor P, Konieczny A, Villa L, Schult A-L, Bücher E, Rong S, Kunter U, van Roeyen CRC, Polakowski T, Hawlisch H (2007): Complement C5 mediates experimental tubulointerstitial fibrosis. J Am Soc Nephrol <u>18</u>, 1508–1515
- Bouts A, Monnens L, Davin J-C, Struijk G, Spanjaard L (2011): Insufficient protection by Neisseria meningitidis vaccination alone during eculizumab therapy. Pediatr Nephrol <u>26</u>, 1919–1920
- Cosgrove D, Meehan DT, Grunkemeyer JA, Kornak JM, Sayers R, Hunter WJ, Samuelson GC (1996): Collagen COL4A3 knockout: a mouse model for autosomal Alport syndrome. Genes Dev <u>10</u>, 2981–2992
- Curat CA, Vogel WF (2002): Discoidin domain receptor 1 controls growth and adhesion of mesangial cells. J Am Soc Nephrol <u>13</u>, 2648–2656
- David S, Biancone L, Caserta C, Bussolati B, Cambi V, Camussi G (1997): Alternative pathway complement activation induces proinflammatory activity in human proximal tubular epithelial cells. Nephrol Dial Transplant <u>12</u>, 51–56
- De Vries B, Matthijsen RA, Wolfs TGAM, Van Bijnen AAJHM, Heeringa P, Buurman WA (2003): Inhibition of complement factor C5 protects against renal ischemia-reperfusion injury: inhibition of late apoptosis and inflammation. Transplantation <u>75</u>, 375–382
- Dihazi H, Müller GA (2007): Urinary proteomics: a tool to discover biomarkers of kidney diseases. Expert Rev Proteomics <u>4</u>, 39–50

- Dmytrijuk A, Robie-Suh K, Cohen MH, Rieves D, Weiss K, Pazdur R (2008): FDA report: eculizumab (Soliris) for the treatment of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Oncologist <u>13</u>, 993–1000
- Gowda S, Desai PB, Kulkarni SS, Hull VV, Math AAK, Vernekar SN (2010): Markers of renal function tests. N Am J Med Sci <u>2</u>, 170–173
- Gross O, Beirowski B, Koepke M-L, Kuck J, Reiner M, Addicks K, Smyth N, Schulze-Lohoff E, Weber M (2003): Preemptive ramipril therapy delays renal failure and reduces renal fibrosis in COL4A3-knockout mice with Alport syndrome. Kidney Int <u>63</u>, 438–446
- Gross O, Schulze-Lohoff E, Koepke M-L, Beirowski B, Addicks K, Bloch W, Smyth N, Weber M (2004): Antifibrotic, nephroprotective potential of ACE inhibitor vs AT1 antagonist in a murine model of renal fibrosis. Nephrol Dial Transplant <u>19</u>, 1716–1723
- Gross O, Girgert R, Beirowski B, Kretzler M, Kang HG, Kruegel J, Miosge N, Busse A-C, Segerer S, Vogel WF (2010): Loss of collagen-receptor DDR1 delays renal fibrosis in hereditary type IV collagen disease. Matrix Biol <u>29</u>, 346–356
- Gross O, Licht C, Anders HJ, Hoppe B, Beck B, Tönshoff B, Höcker B, Wygoda S, Ehrich JHH, Pape L (2012): Early angiotensin-converting enzyme inhibition in Alport syndrome delays renal failure and improves life expectancy. Kidney Int <u>81</u>, 494–501
- Guder WG, Hofmann W (2008): Clinical role of urinary low molecular weight proteins: their diagnostic and prognostic implications. Scand J Clin Lab Invest Suppl <u>241</u>, 95–98
- Harboe M, Mollnes TE (2008): The alternative complement pathway revisited. J Cell Mol Med <u>12</u>, 1074–1084
- He C, Imai M, Song H, Quigg RJ, Tomlinson S (2005): Complement inhibitors targeted to the proximal tubule prevent injury in experimental nephrotic syndrome and demonstrate a key role for C5b-9. J Immunol <u>174</u>, 5750–5757
- Hebert LA, Cosio FG, Birmingham DJ (1992): The role of the complement system in renal injury. Semin Nephrol <u>12</u>, 408–427
- Hudson BG, Tryggvason K, Sundaramoorthy M, Neilson EG (2003): Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. N Engl J Med <u>348</u>, 2543–2556
- Huugen D, van Esch A, Xiao H, Peutz-Kootstra CJ, Buurman WA, Tervaert JWC, Jennette JC, Heeringa P (2007): Inhibition of complement factor C5 protects against anti-myeloperoxidase antibody-mediated glomerulonephritis in mice. Kidney Int <u>71</u>, 646–654
- Ichida S, Yuzawa Y, Okada H, Yoshioka K, Matsuo S (1994): Localization of the complement regulatory proteins in the normal human kidney. Kidney Int <u>46</u>, 89–96
- 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 <u>99</u>, 2470–2478

- Kashtan CE: Alport Syndrome and Thin Basement Membrane Nephropathy. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Stephens K, Amemiya A (Hrsg): GeneReviews®[Internet]; University of Washington, Seattle, Seattle (WA) 1993-2018; [2001 Aug 28; letztes Update 2015 Nov 25]
- Lee HS (2012): Mechanisms and consequences of TGF-ß overexpression by podocytes in progressive podocyte disease. Cell Tissue Res <u>347</u>, 129–140
- Macor P, Durigutto P, De Maso L, Garrovo C, Biffi S, Cortini A, Fischetti F, Sblattero D, Pitzalis C, Marzari R, Tedesco F (2012): Treatment of experimental arthritis by targeting synovial endothelium with a neutralizing recombinant antibody to C5. Arthritis Rheum <u>64</u>, 2559–2567
- Mezzano SA, Ruiz-Ortega M, Egido J (2001): Angiotensin II and renal fibrosis. Hypertension <u>38</u>, 635–638
- 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 <u>127</u>, 879–891
- Mori T, Kawara S, Shinozaki M, Hayashi N, Kakinuma T, Igarashi A, Takigawa M, Nakanishi T, Takehara K (1999): Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis: A mouse fibrosis model. J Cell Physiol <u>181</u>, 153–159
- Morita Y, Ikeguchi H, Nakamura J, Hotta N, Yuzawa Y, Matsuo S (2000): Complement activation products in the urine from proteinuric patients. J Am Soc Nephrol <u>11</u>, 700–707
- Murphy AM, Wong AL, Bezuhly M (2015): Modulation of angiotensin II signaling in the prevention of fibrosis. Fibrogenesis Tissue Repair <u>8</u>, 7
- Nangaku M, Pippin J, Couser WG (2002): C6 mediates chronic progression of tubulointerstitial damage in rats with remnant kidneys. J Am Soc Nephrol <u>13</u>, 928–936
- Ninichuk V, Gross O, Segerer S, Hoffmann R, Radomska E, Buchstaller A, Huss R, Akis N, Schlöndorff D, Anders H-J (2006): Multipotent mesenchymal stem cells reduce interstitial fibrosis but do not delay progression of chronic kidney disease in collagen4A3-deficient mice. Kidney Int <u>70</u>, 121–129
- Peng Q, Li K, Smyth LA, Xing G, Wang N, Meader L, Lu B, Sacks SH, Zhou W (2012): C3a and C5a promote renal ischemia-reperfusion injury. J Am Soc Nephrol <u>23</u>, 1474–1485
- Pohl M, Danz K, Gross O, John U, Urban J, Patzer L, Habbig S, Feldkötter M, Witzke O, Walther M (2013): Diagnosis of Alport syndrome--search for proteomic biomarkers in body fluids. Pediatr Nephrol <u>28</u>, 2117–2123
- Ricklin D, Lambris JD (2013): Complement in immune and inflammatory disorders: pathophysiological mechanisms. J Immunol <u>190</u>, 3831–3838
- Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD (2010): Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. Nat Immunol <u>11</u>, 785–797

- Rodrigues WF, Miguel CB, Napimoga MH, Oliveira CJF, Lazo-Chica JE (2014): Establishing standards for studying renal function in mice through measurements of body size-adjusted creatinine and urea levels. Biomed Res Int 2014, 872827
- Rother RP, Rollins SA, Mojcik CF, Brodsky RA, Bell L (2007): Discovery and development of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Nat Biotechnol <u>25</u>, 1256–1264
- Ryu M, Kulkarni OP, Radomska E, Miosge N, Gross O, Anders H-J (2011): Bacterial CpG-DNA accelerates Alport glomerulosclerosis by inducing an M1 macrophage phenotype and tumor necrosis factor-α-mediated podocyte loss. Kidney Int <u>79</u>, 189–198
- Sarma JV, Ward PA (2011): The complement system. Cell Tissue Res 343, 227-235
- Sato A, Hayashi K, Saruta T (2005): Antiproteinuric effects of mineralocorticoid receptor blockade in patients with chronic renal disease. Am J Hypertens <u>18</u>, 44–49
- Savige J, Gregory M, Gross O, Kashtan C, Ding J, Flinter F (2013): Expert guidelines for the management of Alport syndrome and thin basement membrane nephropathy. J Am Soc Nephrol <u>24</u>, 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 <u>56</u>, 1662–1673
- Schießl IM, Kattler V, Castrop H (2015): In vivo visualization of the antialbuminuric effects of the angiotensin-converting enzyme inhibitor enalapril. J Pharmacol Exp Ther <u>353</u>, 299–306
- Speth C, Rambach G, Würzner R, Lass-Flörl C, Kozarcanin H, Hamad OA, Nilsson B, Ekdahl KN (2015): Complement and platelets: Mutual interference in the immune network. Mol Immunol <u>67</u>, 108–118
- Tang Z, Lu B, Hatch E, Sacks SH, Sheerin NS (2009): C3a mediates epithelial-to-mesenchymal transition in proteinuric nephropathy. J Am Soc Nephrol 20, 593–603
- Tilson L, Barry M (2010): Recent developments in pharmacoeconomic evaluation in Ireland. Expert Review of Pharmacoeconomics & Outcomes Research <u>10</u>, 221–224
- Timpl R (1989): Structure and biological activity of basement membrane proteins. Eur J Biochem 180, 487–502
- Triantafilou K, Hughes TR, Triantafilou M, Morgan BP (2013): The complement membrane attack complex triggers intracellular Ca2+ fluxes leading to NLRP3 inflammasome activation. J Cell Sci <u>126</u>, 2903–2913
- Turnberg D, Lewis M, Moss J, Xu Y, Botto M, Cook HT (2006): Complement Activation Contributes to Both Glomerular and Tubulointerstitial Damage in Adriamycin Nephropathy in Mice. The Journal of Immunology <u>177</u>, 4094–4102
- Vogel W, Gish GD, Alves F, Pawson T (1997): The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. Mol Cell <u>1</u>, 13–23

- Wang Y, Rollins SA, Madri JA, Matis LA (1995): Anti-C5 monoclonal antibody therapy prevents collagen-induced arthritis and ameliorates established disease. Proc Natl Acad Sci USA <u>92</u>, 8955–8959
- Zhang Y, Wang F, Ding J, Zhang H, Liu X, Wang S, Xiao H, Yao Y, Liu J, Zhong X, et al. (2016): Long-term treatment by ACE inhibitors and angiotensin receptor blockers in children with Alport syndrome. Pediatr Nephrol <u>31</u>, 67–72
- Zheng X, Zhang X, Feng B, Sun H, Suzuki M, Ichim T, Kubo N, Wong A, Min LR, Budohn ME (2008): Gene silencing of complement C5a receptor using siRNA for preventing ischemia/reperfusion injury. Am J Pathol <u>173</u>, 973–980
- Zhou W, Marsh JE, Sacks SH (2001): Intrarenal synthesis of complement. Kidney Int <u>59</u>, 1227–1235
- Zipfel PF, Skerka C (2009): Complement regulators and inhibitory proteins. Nat Rev Immunol <u>9</u>, 729–740