

Suche nach präklinischen Biomarkern bei Alport Syndrom im  
Mausmodell

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Mandy Alert**

**geboren am 09.07.90 in Neuhaus am Rennweg**

**Gutachter**

- 1. ....**
- 2. ....**
- 3. ....**

**Tag der öffentlichen Verteidigung: .....**

## Übersicht verwendeter Abkürzungen:

1D	-	1. Dimension
2D	-	2. Dimension
3D	-	3. Dimension
ACE	-	Angiotensin-converting enzyme
AMBP	-	alpha-1-microglobulin/bikunin precursor Protein
Apo(s)	-	Apolipoprotein(e)
APP	-	Akute-Phase-Protein
AS	-	Alport Syndrom
AT1R	-	Angiotensin-Typ-1-Rezeptor
BHSM1	-	Betaine-Homocysteine-S-Methyltransferase 1
CID	-	Kollisions-induzierte Dissoziation
COL $\alpha$ 1	-	Isoform 2 der Kollagen- $\alpha$ 1(I)-Kette
ESI	-	Elektrospray-Ionisation
EZM	-	Extrazelluläre Matrix
FPLC	-	fast protein liquid chromatography
GBM	-	Glomeruläre Basalmembran
GFR	-	Glomeruläre Filtrationsrate
HCH1	-	Schwere Kette H1
HCH2	-	Schwere Kette H2
HDL	-	high density lipoprotein
H-ESI	-	heated electrospray ionization

HPLC	-	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IATI	-	Inter-alpha-Trypsin-Inhibitor
KKS	-	Kallikrein-Kinin-System
KS	-	Komplementsystem
LCAT	-	LCAT-Phosphatidylcholin-Sterol-Acyltransferase
LRHEV	-	Leucin-reiches-HEV-Glykoprotein
m/z	-	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
MMP	-	Matrixmetalloproteinase
MS/MS	-	Tandem-Massenspektrometrie
P	-	Versuchstiergruppe: Placebo
PCR	-	Polymerase-Kettenreaktion
pp	-	post partum
QSOX1	-	Isoform 3 der Sulfhydryl-Oxidase 1
RAAS	-	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
Ram	-	Versuchstiergruppe: Behandelt mit Ramipril
$\beta$ 2GP1	-	$\beta$ 2-Glykoprotein 1
TGF $\beta$	-	transforming growth factor $\beta$
Tris	-	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UHPLC	-	Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Vom	-	Vomeronasal 2 Rezeptor 67
WT	-	Versuchstiergruppe: Wildtyp

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
2.1	<b>Alport Syndrom</b>	<b>3</b>
2.2	<b>Therapieansätze</b>	<b>4</b>
2.3	<b>Notwendigkeit einer Früherkennungsmethode</b>	<b>6</b>
2.4	<b>Tiermodel COL4A3<sup>-/-</sup>-Knockout-Maus</b>	<b>7</b>
2.5	<b>Biomarker</b>	<b>7</b>
2.5.1	Biomarkersuche	8
2.5.2	Untersuchung präklinischer Krankheitsmarker	8
2.5.3	Validierung von Biomarkern	9
2.5.4	Biomarker im Proteom	10
2.6	<b>Möglichkeit des Findens unbekannter Biomarker</b>	<b>10</b>
2.6.1	Massenspektrometrie	10
2.6.2	Fraktionierung	11
<b>3</b>	<b>Aufgabenstellung</b>	<b>13</b>
<b>4</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>14</b>
4.1	<b>Technische Ausrüstung</b>	<b>14</b>
4.2	<b>Reagenzien</b>	<b>15</b>
4.3	<b>Proben</b>	<b>17</b>
4.4	<b>Fraktionierung</b>	<b>18</b>

<b>4.5</b>	<b>Materialien und Methoden der 1. Dimension, Größenausschlusschromatographie</b>	<b>19</b>
<b>4.6</b>	<b>Materialien und Methoden der 2. Dimension, Anionenaustauschchromatographie</b>	<b>20</b>
4.6.1	2D-Fraktionierungsprotokoll	20
4.6.2	Durchführung	21
<b>4.7</b>	<b>Readout</b>	<b>21</b>
<b>4.8</b>	<b>Trypsin-Verdau</b>	<b>22</b>
<b>4.9</b>	<b>Massenspektrometrie</b>	<b>22</b>
<b>4.10</b>	<b>Massenspektrometrische Datenanalyse</b>	<b>23</b>
4.10.1	SIEVE™	23
4.10.2	Excel™	24
<b>5</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>30</b>
<b>5.1</b>	<b>Trennung der 1. Dimension</b>	<b>30</b>
5.1.1	Kalibrierung	30
5.1.2	Ergebnis der Größenausschlusschromatographie	30
<b>5.2</b>	<b>Trennung der 2. Dimension</b>	<b>34</b>
<b>5.3</b>	<b>Gefundene Proteine</b>	<b>37</b>
<b>5.4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>41</b>
5.4.1	Akute-Phase-Proteine	41
5.4.2	Apolipoproteine	48
5.4.3	Zellbestandteile	51

5.4.4	EZM Komponenten	52
5.5	<b>Biomarkerkandidaten</b>	<b>55</b>
6	<b>Schlussfolgerung</b>	<b>57</b>
7	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>58</b>
8	<b>Anhang</b>	<b>67</b>

## 1 Zusammenfassung

Das Alport Syndrom (AS) ist eine genetisch bedingte Nierenerkrankung, die durch Mutationen in den Genen COL4A3, 4 oder 5 hervorgerufen wird. Diese kodieren für die Ketten  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$  bzw.  $\alpha_5$  von Kollagen IV, und sind damit wesentlich am Aufbau der adulten glomerulären Basalmembran der Niere beteiligt. Im Verlauf der Erkrankung kommt es oft schon im Kindesalter zu einer voranschreitenden Beeinträchtigung der Nierenfunktion bis zum terminalen Nierenversagen.

Inzwischen ist es möglich, den Fortgang der Krankheit durch den Einsatz von ACE-Hemmern (ACE – Angiotensin-converting enzyme), wie zum Beispiel Ramipril, zu verlangsamen und die Zeit bis zur Dialyse- oder Transplantationspflichtigkeit entscheidend zu verzögern. Diese Therapie ist umso effizienter, je eher damit begonnen wird. Doch aufgrund des symptomlosen Beginns wird die Erkrankung bisher meist zu spät oder gar nicht diagnostiziert. Daher werden präklinische Krankheitsmarker zum frühzeitigen Nachweis dringend benötigt, um einen schnelleren Therapiebeginn und damit eine Verbesserung des zu erwartenden Therapieerfolges zu erzielen. Zudem sind noch immer viele Abläufe der Pathogenesekette des AS ungeklärt.

Im Rahmen dieser Dissertation sollten wenig-invasive präklinische Biomarker für das AS gesucht werden. Dies erfolgte mittels massenspektrometrischer Analyse von Serum-Proben von COL(IV)A3<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren. Außerdem sollte untersucht werden, ob diese Biomarker durch die Ramipril-Behandlung beeinflusst werden.

Untersucht und verglichen wurden Proben von gesunden Kontroll-, unbehandelten-, und mit Ramipril behandelten COL(IV)A3<sup>-/-</sup>-Mäusen, jeweils in den drei juvenilen Altersgruppen von 4,5, 6 und 7,5 Wochen. Dazu erfolgte zunächst eine zweidimensionale Fraktionierung der Serum-Proben mittels Größenausschluss- und Anionenaustauschchromatographie. Anschließend wurde die massenspektrometrische Analyse der Fraktionen und die softwaregestützte Auswertung der Daten vorgenommen.

Es wurden beim unbehandelten AS 115 Proteinketten mit ansteigender, 41 mit abfallender Konzentration und 18 mit sowohl ansteigenden als auch abfallenden Proteoformen gefunden. Zahlreiche dieser Veränderungen sind unter Ramipriltherapie reversibel. Daraus wurden 25 Biomarkerkandidaten abgeleitet, die sich durch eindeutige Unterschiede zu

Vergleichsproben bereits in der präklinischen Krankheitsphase auszeichnen. Diese sind das Retinol-bindende Protein 4, Serum-Amyloid P, HMW Kininogen II, Transferrin, LCAT-Phosphatidylcholin-Sterol-Acyltransferase (LCAT), Clusterin (Apolipoprotein J), Betaine-Homocysteine-S-Methyltransferase 1 (BHSM1), Isoform 2 der Kollagen- $\alpha$ 1(I)-Kette (COL $\alpha$ 1), Hämapexin, Haptoglobin, Angiotensinogen, Apolipoprotein (Apo) AI, Apo A IV, Apo CIII, Beta-2-Glykoprotein 1 ( $\beta$ 2GP1), Komplementfaktor H, Fibronectin, Isoform 3 der Sulphydryl-Oxidase 1 (QSOX1), Leucin-reiches-HEV-Glykoprotein (LRHEV), der Inter-alpha-Trypsin-Inhibitor-(IATI)-Komplex aus dem alpha-1-microglobulin/bikunin precursor Protein (AMBP), die schweren Ketten H1 (HCH1) und H2 (HCH2), Vomeronasal 2 Rezeptor 67 (Vom), Zinkfingerprotein 758 und die Superoxid-Dismutase.

Es ist weiterführend in humanen Proben zu prüfen, ob diese Markerkandidaten eine ausreichende diagnostische Sensitivität und Spezifität haben und ob sie zum Therapiemonitoring und bei der Entwicklung neuer Therapieansätze Verwendung finden können.

## 2 Einleitung

### 2.1 Alport Syndrom

Die Ursache des AS sind Mutationen in den Genen COL4A3, COL4A4 oder COL4A5. In 85% der Fälle liegt ein X-chromosomaler Defekt im COL4A5-Gen vor (Storey et al. 2013; Gubler 2007; Lemmink et al. 1997). Eine autosomal-rezessive Mutation der Gene COL4A3 und COL4A4 zeigen 10-15% der Patienten (Gubler 2007; Lemmink et al. 1997; Lemmink et al. 1994). Für verschiedene Mutationen in COL4A3 und COL4A4 wurde ebenfalls ein autosomal-dominanter Erbgang gefunden, der aber nur mit einer Häufigkeit von 5 % vorkommt (Hudson et al. 2003; Longo et al. 2002).

Jedes Typ-IV Kollagen-Molekül besteht aus drei  $\alpha$ -Ketten, die eine Tripelhelix bilden. Die beim AS betroffenen Gene kodieren für die  $\alpha 3$ -,  $\alpha 4$ - und  $\alpha 5$ -Ketten, welche Hauptbestandteil von besonders mechanisch belasteten Basalmembranen, wie auch der adulten glomerulären Basalmembran (GBM) der Nieren sind (Kruegel 2012). Die Kollagen-Helices bilden zusammen mit anderen Molekülen der extrazellulären Matrix (EZM) das hoch-spezialisierte Netzwerk der GBM, welche durch Disulfidbrücken stabilisiert wird und essentiell für die Stabilität und Funktion des gesamten glomerulären Filterapparates ist (Veidal et al. 2011). Mutationen in nur einem der Gene COL4A3-COL4A5 bedingen einen veränderten Aufbau des gesamten kollagenen Netzwerkes der GBM der reifen Niere (Netzer et al. 1997). Bei Patienten mit AS behält die GBM eine fetale Verteilung von  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Ketten mit weniger Disulfidbrücken und geringerer mechanischer Stabilität bei, da der entwicklungsbedingte Wechsel ihres  $\alpha$ -Ketteneinbaus fehlschlägt. Diese anomale Persistenz fetaler Typ IV Kollagene in der GBM führt zu einer verstärkten Proteolyse durch Kollagenasen und Cathepsine (Gubler 2007). Obgleich diese Erkenntnisse einen Einblick gewähren, sind zum heutigen Zeitpunkt noch viele Einzelheiten der Pathogenesekette beim AS ungeklärt.

Klinisch ist das AS eine progrediente Nierenerkrankung, die ein heterogenes Erscheinungsbild aufweist. Sie wurde erstmals 1927 von A. Cecil Alport beschrieben (Alport 1927). Charakteristisch sind irreguläre Verdünnung, Verdickung und Spaltung der GBM die zu einer Niereninsuffizienz und nachfolgend zum terminalen Nierenversagen führen (Arrondel et al. 2004). In vielen Fällen ist das AS außerdem mit Schädigungen des Auges und des Innenohrs vergesellschaftet (Lenticonus, Hörverlust), da dort normalerweise die gleichen

Kollagenketten exprimiert werden (Nielsen 1977; Alport 1927). Betroffene haben darüber hinaus ein erhöhtes Risiko unter Wachstumsverzögerungen und Infektionen zu leiden und zeigen ein 1000-fach höheres Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen (Kruegel 2012). Die früher beschriebene Einschränkung der Lebenserwartung (männliche Patienten verstarben meist vor dem 30. Lebensjahr) sowie die frühe Hämodialyse- oder Nierentransplantationspflichtigkeit (im Median im Alter von 22 Jahren) können heute durch eine frühzeitige Blockade des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) herausgezögert werden (Gross 2012).

Die National Kidney Foundation veröffentlichte 2003 eine Stadieneinteilung für chronische Nierenerkrankungen, die auf dem Grad der Verringerung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) basiert (Levey et al. 2003). Tabelle 1 zeigt die Stadien zusammen mit den jeweiligen klinischen Anzeichen der Erkrankung, die im Jahr 2013 um eine Unterteilung des Stadiums 3 erweitert wurde (Stevens und Adeera 2013).

**Tab. 1: Stadien chronischer Nierenerkrankungen**

Stadium	GFR	Bezeichnung	Klinische Manifestation
G1	≥ 90	Normal oder erhöht	Marker von Nierenerkrankungen (nephrotisches Syndrom, Harnwegs-Symptome, asymptomatische Anomalien in der Urinalyse, asymptomatische radiologische Anomalien, Hypertonie durch Nierenerkrankung)
G2	60-89	Leicht verringert*	
G3a	45-59	Leicht bis moderat verringert	Geringe bis schwere Komplikationen o Anämie o Mineral- und Knochenstörungen o Kardiovaskuläre Erkrankung (Hypertonie, Lipidanomalien) o Niedriges Serum-Albumin
G3b	30-44	Leicht bis stark verringert	
G4	15-29	Stark verringert	
G5	< 15	Nierenversagen	o Schließt alle oben aufgeführten ein o Urämie

GFR = ml/min/1,73 m<sup>2</sup>

\* in Bezug auf junge Erwachsene

Aus Stevens und Adeera 2013

## 2.2 Therapieansätze

Untersuchungen an Tiermodellen führten zur Entwicklung unterschiedlicher Therapieansätze für das AS. Eine Möglichkeit stellt der Einsatz verschiedener Pharmaka dar. So kann durch die Inhibition des RAAS mittels Gabe des ACE-Hemmer Ramipril, die Proteinurie, der

intraglomeruläre Druck und die Entwicklung einer Nierenfibrose vermindert werden und ein früher Therapiebeginn konnte die Lebensdauer von Alportmäusen bis zum Nierenversagen verdoppeln (Kashtan et al. 2013; Gross et al. 2003). Da Ramipril einen vielversprechenden Therapieansatz darstellt, brachten Gross et al. 2012 mit EARLY PRO-TECT Alport, eine randomisierte, Placebo-kontrollierte, Doppel-blind-Studie auf den Weg, um stichhaltige Daten als Grundlage für eine Behandlungsempfehlung und anschließende Zulassung für die Ramiprilbehandlung von Kindern mit AS zu liefern (Gross et al. 2012). Einen weiteren Ansatz bietet die Blockade des Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyps-1 durch das Medikament Candesartan, welches ebenfalls eine Reduktion der renalen Fibrose erzielt (Gross et al. 2004). Auch eine Kombination beider Medikamente wurde erprobt (Abbate und Remuzzi 2003). Des Weiteren konnte beispielsweise für den Vasopeptidase-Inhibitor AVE7688 als auch für Inhibitoren von Matrixmetalloproteinasen (MMP) ein starker nephroprotektiver Effekt nachgewiesen werden (Gross et al. 2005; Zeisberg et al. 2006).

Neben der reinen Pharmakotherapie wurde auch die Möglichkeit einer Stammzellentherapie im Tiermodell erprobt. So führte eine Knochenmarktransplantation bei Mäusen nach Bestrahlung zu einem verbesserten glomerulären Aufbau, reduzierter Proteinurie, sowie zur partiellen Wiederherstellung der Expression der Typ IV-Kollagen  $\alpha 3$ -Kette (Sugimoto et al. 2006). Im Vergleich dazu ließen sich mit der Injektion von multipotenten mesenchymalen Stammzellen keine vergleichbaren Erfolge, im Sinne einer Verzögerung des Nierenversagens, erzielen (Ninichuk et al. 2006). Daher sollte die Stammzelltherapie kritisch bewertet werden, denn viele Fragen, bspw. zu möglichen Komplikationen, bleiben noch ungeklärt (Gross et al. 2009). Auch die alleinige Wirkung von Bestrahlung auf den Krankheitsverlauf wurde mit Knockout-Mäusen untersucht, die im Alter von 3 Wochen einer Knochenmarktransplantation nach Bestrahlung unterzogen wurden. Allein die Bestrahlung erbrachte unerwartet eine längere Lebensdauer (Katayama et al. 2008). Allen pharmakologischen Therapieoptionen gemeinsam ist die Beobachtung, dass sich ein möglichst früher Beginn positiv auf den Therapieerfolg auswirkt. Für die MMP-Inhibitoren gilt sogar, dass eine Gabe des Medikamentes nach Einsetzen der Proteinurie zu einer Verschlechterung des Krankheitsverlaufes führt (Zeisberg et al. 2006). Um frühzeitig mit der Therapie beginnen zu können, braucht es Biomarker die bereits in der präklinischen Krankheitsphase eine sichere Diagnosestellung zulassen.

### **2.3 Notwendigkeit einer Früherkennungsmethode**

Bis heute wird die Diagnostik üblicherweise anhand der Familiengeschichte, dem Urinstatus (Erythrozyten und Protein), und einer Visus- und Hörprüfung eingeleitet (Yao et al. 2012; Pirson 1999). Die definitive Diagnose wird nach elektronenoptischer und immunhistochemischer Untersuchung von Nieren- und Hautgewebe gestellt und durch eine genetische Mutationsanalyse bestätigt. Material zur Analyse wird dabei perkutan mittels Nadelstichbiopsie bzw. durch Hautbiopsie gewonnen (Yao et al. 2012; Yoshioka et al. 1994). Dabei ist die Nierenbiopsie, vor allem bei Kindern, mit einem hohen Komplikationsrisiko behaftet (Yao et al. 2012; Bachmann 1979). Deshalb ist die genetische Untersuchung von Kindern mit auffälliger Symptomatik in den letzten Jahren in den Vordergrund gerückt (Artuso et al. 2012; Hertz 2009). Diese stellt gegenwärtig den Goldstandard dar, obwohl dabei manche Punktmutationen der Diagnostik auch entgehen können (Hertz 2009). Die Problematik wird deutlich, wenn man die Zahl der verschiedenen Mutationen betrachtet, die mit dem AS assoziiert sind. Die Arbeitsgruppe um Nagel et al. 2005 konnte zu den fünf bereits bekannten, weitere 34 Mutationen des COL4A5 Gens nachweisen (Nagel et al. 2005; Stenson et al. 2003). Nahezu 300 pathogene Mutationen wurden für die Gene COL4A3 und COL4A4 beschrieben, wobei viele von diesen auch bei Patienten mit Syndrom der dünnen Basalmembran gefunden wurden (Storey et al. 2013). Die diagnostische Abgrenzung dieser Erkrankung zum AS wird daher heute kontrovers diskutiert.

Die Diagnostik des AS erfolgt meist erst nach der klinischen Manifestation mit Proteinurie, Visuseinschränkung oder Schwerhörigkeit, wenn keine erkrankten Angehörigen bekannt sind (Kruegel 2012). Außerdem bleiben, trotz der aktuell vorhandenen Palette an Möglichkeiten, viele Alport-Patienten undiagnostiziert (Kruegel 2012). Bei präklinischem Beginn der Therapie kann das Fortschreiten der Nierenschädigung erheblich verzögert werden (Temme et al. 2012; Gross et al. 2012). Deshalb wird eine präklinische Diagnosestellung dringend gebraucht. Würde eine Möglichkeit gefunden, die Krankheit bei Kindern durch einen Suchtest bereits vor der Schädigung des Nierengewebes sicher zu diagnostizieren, wäre man wie bei genotypisierten Mäusen in der Lage, durch frühzeitige Pharmakotherapie, den Krankheitsverlauf für alle Betroffenen maximal zu verlangsamen und die Zeit bis zur Dialysepflichtigkeit bzw. Transplantation um viele wertvolle Jahre bzw. Jahrzehnte in der für Kinder wichtigsten Lebensphase zu verlängern.

## **2.4 Tiermodell COL4A3<sup>-/-</sup>-Knockout-Maus**

Die Entwicklung eines Mausmodells für das humane AS war essentiell, um nach einer Therapie für die progrediente Nierenfibrose suchen zu können (Cosgrove et al. 1996). Die geringe Anzahl betroffener Familien und die Heterogenität der Krankheitsverläufe und Mutationen machten es notwendig, ein passendes Tiermodell zu evaluieren, um damit zum Beispiel die Anwendung von Ramipril zur Therapie zu testen (Gross et al. 2003). Zudem sind große Probandenzahlen möglich und man ist bei Kleinnagern nicht gezwungen 20 bis 30 Jahre zu warten, um eine therapeutische Intervention bewerten zu können (Gross et al. 2003).

Der Krankheitsverlauf der Tiere ist sehr ähnlich zu dem, der in humanen Studien beschrieben wird; so zeigt die GBM charakteristische Verdünnungen und das Endothel Fenestrations- und Veränderungen, die im Alter von 4 Wochen in den peripheren Kapillarschlingen der Glomeruli beginnen und sich bis zum Alter von 8 Wochen bis in die GBM der zentralen Gefäße der Glomeruli ausbreiten (Cosgrove et al. 1996). Dieses Modell bildet somit den Phänotyp des humanen AS vollständig im Zeitraffer von 10 Wochen ab: Hämaturie ab Woche 4, Proteinurie ab Woche 6, Podozytenablösung und nachfolgend progredientes Nierenversagen ab Woche 8, deutliche Veränderungen der GBM sowie periglomeruläre und tubulointerstitielle Fibrose bis Woche 10 (Gross et al. 2003).

Bei den von uns untersuchten Altersgruppen entspricht der Krankheitszustand der Versuchstiere im Alter von 4,5 Wochen dem präklinischen Stadium, im Alter von 6 Wochen dem Stadium 1, im Alter von 7,5 Wochen dem Stadium 1-2 und im Alter von 9 Wochen dem Stadium 3-4 beim Menschen (siehe Kapitel 2.1, Tabelle 1).

## **2.5 Biomarker**

Biomarker sind als Parameter definiert, die als Indikator für einen physiologischen bzw. pathologischen Prozess oder für eine pharmakologische Wirkung dienen und können bspw. Proteine, Peptide, Metabolite oder Nukleinsäuren sein (Schultz et al. 2006). Ein validierter Biomarker bietet einen großen Nutzen als prognostischer oder diagnostischer Indikator für Krankheitsmanifestationen oder deren Verlauf (Ptolemy und Rifai 2010).

Um Verwendung zu finden, muss ein Biomarker sensitiv und spezifisch sein. Das bedeutet, er muss die Identifikation dieses Zustandes sicher zulassen (Sensitivität) und darf nicht auch relevant sein für einen anderen Zustand (Spezifität). Jedoch erfüllen bisher nur wenige der neu gefundenen Marker Kandidaten beide Kriterien (Delobel et al. 2010).

### 2.5.1 Biomarkersuche

Ist der Pathomechanismus einer Krankheit bekannt, so bietet sich an, im Blut oder Urin nach einem bestimmten Protein, RNA oder Metaboliten zu suchen, dem eine Schlüsselrolle im Krankheitsverlauf zugeschrieben wird. Dieses Vorgehen, z.B. "targeted-proteomics", bietet den Vorteil, dass der gesamte Versuchsaufbau auf den gesuchten Marker und dessen spezielle Eigenschaften ausgerichtet werden kann. Bei einer Krankheit, über deren genaue Pathogenesekette nur wenige Details bekannt sind, so wie beim AS, ist ein Hypothesenbasiertes Vorgehen nicht möglich. Hierfür werden die Probenbestandteile erkrankter und gesunder Individuen unvoreingenommen verglichen. Finden sich z. B. im Serum-Proteom der Erkrankten abweichende Konzentrationen, so kann man diese als potentielle Biomarker Kandidaten betrachten. Der tatsächliche diagnostische Wert dieser Kandidaten muss nachfolgend in weiteren Validierungsschritten mit einer großen Probenzahl nachgewiesen werden. Erst wenn dieser Prozess abgeschlossen ist, gilt ein Biomarker als validiert.

### 2.5.2 Untersuchung präklinischer Krankheitsmarker

Um den Pathomechanismus einer Krankheit zu verstehen bzw. diese so früh wie möglich zu diagnostizieren, ist es notwendig, Krankheitsmarker bereits für die präklinische Phase verfügbar zu haben. Sie können Aufschluss über den zugrunde liegenden Entstehungsweg bieten und zugleich Ansatz für Früherkennungsmethoden oder Therapieformen sein. Die Suche nach solchen Markern ist jedoch aus ethischen und praktischen Gründen am Menschen, im Fall des AS an Kleinkindern, nicht oder nur sehr schwer möglich. Hier müssen Tiermodelle eingesetzt werden. Für das AS gibt es sehr aussagekräftige Tiermodelle, da die am Prozess beteiligten Proteine homolog zu den entsprechenden Proteinen des Menschen

sind. Der Phenotyp von allen bekannten Alport-Mäusen (COL(IV)A3<sup>-/-</sup>, A4<sup>-/-</sup>, A5<sup>-/-</sup>) gleicht dem von Alport-Patienten, einschließlich der charakteristischen Verdickung und Teilung der GBM (Katayama et al. 2014). COL4A3<sup>-/-</sup> Mäuse sind neben Hunden das geläufigste Tiermodell zum AS in experimentellen Studien (Lees et al. 1997). Mit COL(IV)A3<sup>-/-</sup> Mäusen wurde erstmals gezeigt, dass der ACE-Hemmer Ramipril sehr effektiv ist (Gross et al. 2003). Daraus konnte die effektivste gegenwärtig verfügbare Behandlung für Menschen mit AS abgeleitet werden (Gross et al. 2012). Es folgten Studien zur Wirksamkeit und zur Medikamentensicherheit bei Kindern (Gross et al. 2012). Deshalb sollten sich diese Mäuse auch für die Suche nach präklinischen Markern eignen.

### 2.5.3 Validierung von Biomarkern

Um einen Markerkandidaten zu validieren, müssen Immunteste oder andere quantitative spezifische Teste durchgeführt werden, um seine Eignung als präklinischen Marker zu prüfen. Deshalb ist die proteomische Biomarkersuche ein vielschrittiger Vorgang, der in Abbildung 1 schematisch dargestellt ist.



**Abb. 1: Ablauf des Entwicklungsprozesses von Biomarkern**

Aus Weinhäusel und Giese 2014

Der erste Schritt auf dem Weg zur Identifizierung von präklinischen Krankheitsmarkern für das AS erfolgt durch die massenspektrometrische Suche nach potenziellen Markerkandidaten im Rahmen dieser Dissertation. Danach ist ein geeignetes Assay-System zu entwickeln, um die Marker mit einer spezifischen Methode unabhängig bestätigen und

messen zu können. Darauf folgt die retrospektive Validierung mit ausreichend großen retrospektiven Probenbiobanken. Abschließend erfolgt die prospektive Validierung. Die in Schritt 3 und 4 dargestellte klinische Validierung selektiver Biomarker in größeren Studien kann sich über mehrere Jahre hinweg erstrecken und kann daher nicht im Rahmen dieser Arbeit abgebildet werden. Allerdings lässt sich meist erst im letzten Schritt abschließend beurteilen, welche Sensitivität bzw. Spezifität die untersuchten Biomarker aufweisen (vgl. Weinhäusel und Giese 2014).

#### 2.5.4 Biomarker im Proteom

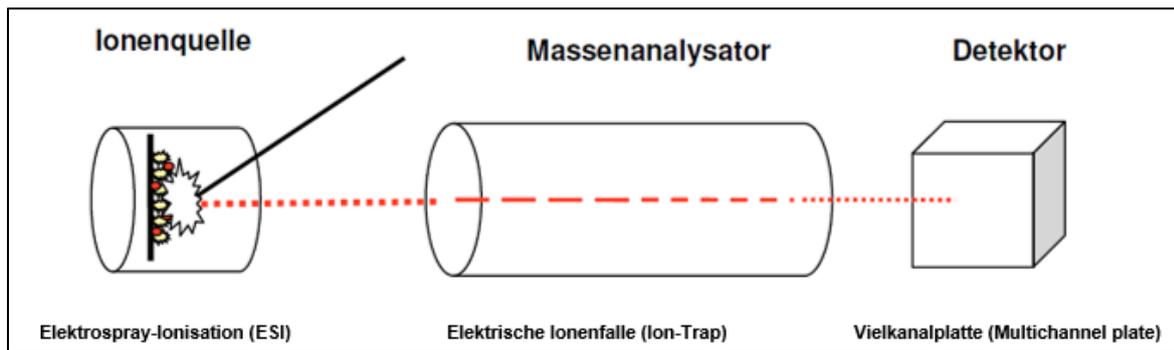
Der Begriff des Proteoms beschreibt die Gesamtheit aller Proteine in einem biologischen System (Lebewesen, Gewebe, Körperflüssigkeit, Zelle oder Zellkompartiment) unter definierten Bedingungen und zu einem bestimmten Zeitpunkt (Flaig und Krieg 2005). Seine Kenntnis bietet das Potenzial, die Funktionsweise eines biologischen Systems besser zu verstehen sowie die Pathogenese einer Erkrankung zu erkennen.

Um das Proteom eines biologischen Systems mittels Massenspektrometrie untersuchen zu können, ist es notwendig, dieses so in seine Bestandteile aufzutrennen, dass nur wenige Proteine in den jeweils analysierten Fraktionen enthalten sind. Dafür wurden verschiedene Methoden entwickelt, wie die 2-dimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese und die chromatographische Auftrennung der Probenbestandteile.

## 2.6 Möglichkeit des Findens unbekannter Biomarker

### 2.6.1 Massenspektrometrie

Unter dem Begriff der Massenspektrometrie versteht man ein Verfahren zur Bestimmung der Massen ionisierter Moleküle unter Nutzung des Masse-zu-Ladung-Verhältnisses ( $m/z$ ) als Merkmal zur Identifikation von Molekülen (Berg et al. 2013; Niessen 2006). Die Grundkomponenten eines Massenspektrometers sind eine Ionenquelle, ein Massenanalysator und ein Detektor (siehe Abbildung 2).



**Abb. 2: Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers**

In der Ionenquelle wird die Probe ionisiert. Von dort gelangen die Ionen in den Massenanalysator, in dem sie nach ihrem  $m/z$ -Verhältnis getrennt und anschließend im Detektor erfasst werden.

Modifiziert nach Lottspeich und Zorbas 1998

Für die massenspektrometrische Untersuchung von Proteinen und Peptiden eignet sich besonders die Elektrospray-Ionisation (ESI) (Angel et al. 2012). Hierbei werden in einem Elektrospray Ionen der Probenmoleküle gebildet, indem das Aerosol einer flüssigen Probe einer hohen Spannung ausgesetzt wird (Pozniak und Cole 2007). Sie wurde zuerst 1984 von Masamichi Yamashita und John Fenn beschrieben (Yamashita und Fenn 1984). ESI eignet sich vor allem, Ionen von Makromolekülen herzustellen und ist die Methode der Wahl, um Proteine und Peptide mit der Massenspektrometrie zu analysieren. Nach der Ionisierung erfolgt die Bestimmung der Teilchenmassen im Massenanalysator, hier eine Ionenfalle sowie eine Orbitrap. Letztere besteht aus einer äußeren walzenförmigen und einer coaxialen inneren spindelförmigen Elektrode. In der Orbitrap werden Ionen, ausgeglichen durch zentrifugale Kräfte, aufgrund ihrer elektrostatischen Anziehung zur inneren Elektrode, eingefangen, der entstehende Ionenstrom detektiert und durch die Fourier-Transformation des Frequenz-Signals in ein Massenspektrum konvertiert (Hu et al. 2005; Makarov 2000).

### 2.6.2 Fraktionierung

Die Untersuchung mit dem Massenspektrometer setzt voraus, dass die analysierte Teil-Probe (Fraktion) nur eine begrenzte Anzahl von Analyten enthält (s.o.). Dies wird durch die Vorbehandlung erreicht. Dabei können entweder wesentliche Bestandteile angereichert werden (insofern sie bekannt sind) oder die Komplexität jeder Fraktion mit unspezifischen

Fraktionierungsmethoden vermindert werden. Die gegenwärtig verwendeten Fraktionierungsmethoden folgen zwei gegensätzlichen Ansätzen. Bei der Bottom-Up-Strategie, auch als Shotgun-Methode bezeichnet, erfolgt der Verdau der Proteine mit Proteasen zum Beginn der Untersuchung. Die erhaltenen Peptidgemische werden anschließend mittels einer mehrdimensionalen Flüssigkeitschromatographie getrennt. Daran schließt die massenspektrometrische Analyse an. Diese Methode ermöglicht es, viele Proteine mit hoher Genauigkeit zu identifizieren. Nachteilig ist der Verlust der Informationen zu deren Charakteristika. Dadurch ist die Zugehörigkeit der sog. proteotypischen Peptide zu speziellen Isoformen oder modifizierten Proteinen (z.B. alternative Spleißformen, phosphorylierte Proteine) nicht mehr detektierbar.

Alternativ dazu ist die Top-Down-Strategie. Hierbei werden im ersten Schritt die intakten Proteine getrennt, bspw. durch eine zweidimensionale Gelelektrophorese oder Chromatographie. Anschließend werden die erhaltenen Fraktionen einzeln verdaut und massenspektrometrisch untersucht. Dieses Vorgehen erhält Informationen über die ursprünglich getrennten Peptide bzw. Proteine zur Klärung biologischer Zusammenhänge (z.B. Degradationsprodukte, Komplexe) (Tran et al. 2011). Die Fraktionierung intakter Proteine vor der massenspektrometrischen Untersuchung ist sehr zeitaufwändig und birgt die Gefahr des Verlustes vieler Proteine durch den eingeschränkten dynamischen Bereich des Trennvorgangs.

Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit eine umfassende Top-Down-Fraktionierung zur Suche eines präklinischen Markers für das AS favorisiert. Die Methode, die das gesamte Proteom abbildet, wurde im Institut für Biochemie I entwickelt (Wendler et al. 2013).

### **3 Aufgabenstellung**

Im Rahmen dieser Arbeit sollen mit Hilfe einer zweidimensionalen nativen chromatographischen Auftrennung und der anschließenden massenspektrometrischen Analyse von Serum-Proben juveniler Mäuse präklinische Biomarker für das AS gesucht werden. Dazu sollen die Serum-Proteome anhand der massenspektrometrischen Daten von gesunden Kontrolltieren (Wildtyp, WT), COL(IV)A3<sup>-/-</sup> Mäusen ohne (Placebo, P) und mit Ramipril-Therapie (Ram) für drei verschiedene Lebensalter (4,5, 6,0 und 7,5 Wochen pp) verglichen werden, um typische Veränderungen zu finden, die als wenig invasive Biomarker für die Diagnose und die Therapie-Kontrolle geeignet sein könnten. Dazu soll eine Fraktionierungsmethode, die für wesentlich größere humane Probenvolumina entwickelt wurde, angepasst und erprobt werden.

## 4 Materialien und Methoden

### 4.1 Technische Ausrüstung

- FPLC-Anlage Äkta purifier (GE Healthcare, München, Deutschland)  
Fraktionssammler: Frac 950
- 1D-Trennsäule 10/300 GL Superdex™ 200 (GE Healthcare, München, Deutschland)
- 2D-Säulen Eigenherstellung durch die AG mit DEAE Toyopearls 650M (Tosoh Bioscience GmbH, Stuttgart, Deutschland)
- Reader SpectraMax plus 384 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, US)
- HPLC vor Massen-  
spektrometrie Accela™ Autosampler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US)  
Hypersil Gold UHPLC Säule (50 x 10 mm, 1,9 µm, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US)  
Accela 1250 UHPLC System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US)
- Massenspektro-  
meter LTQ Orbitrap Discovery (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US)
- Thermocycler TB1 Thermoblock (Biometra GmbH, Göttingen, Germany)
- Dialysesystem Xpress Micro Dialyzer MD100, 3.5 kDa (Scienova GmbH, Jena, Deutschland)
- Pipettierung CyBi™-Well (CyBio AG, Jena, Deutschland)
- Zentrifugen Eppendorf 5403 und 5417 R (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Ultraschallbad Sonorex (Bandelin electronic GmbH & Co.KG, Berlin, Deutschland)
- pH-Meter pH-Meter 765 Calimatic (Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co.KG, Berlin, Deutschland)  
Elektrode: pH-Elektrode SenTix 81 (WTW GmbH, Weilheim, Deutschland)

- Schüttler Vortex Genie 2 (Scientific Industries, Inc., New York, USA)  
Titramax 101 (Heidolph Instruments GmbH & Co.KG,  
Schwabach, Deutschland)
- Rührer RSM-10HP (Phoenix Instrument GmbH, Garbsen, Deutschland)
- Waage Laboratory LC 620 P (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland)  
Analytic AC 210 S (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland)
- Mikroplatten UV Star® Microplates 96 und 384 (Greiner-Bio-One GmbH,  
Frickenhausen, Deutschland, Art.-Nr.: 655801 bzw. 781801)  
Deepwell Platten 0,5 ml (Brand GmbH + Co.KG, Wertheim,  
Deutschland, Art.-Nr.: 701346)  
Deepwell Platten 2 ml (Brand GmbH + Co.KG, Wertheim,  
Deutschland, Art.-Nr.: 701354)  
96-fach Dialyseplatte (Eigenherstellung durch die AG)  
96-Well twin.tec PCR Platten (Eppendorf AG, Hamburg,  
Deutschland, Art.-Nr.: 0030129.512)
- Software Microsoft® Office  
SoftMax Pro® 4.0  
Unicorn™ 3.10  
Sieve 2.0  
Sieve 2.1  
Proteome discoverer 1.3

## 4.2 Reagenzien

- Puffer, Salze, Lösungsmittel
  - Tris(hydroxymethyl)- (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland,  
aminomethan (Tris) Art.-Nr.: 108382.2500)
  - NaCl (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland,  
Art.-Nr.: 3957.1)
  - n-Propanol (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland,  
Art.-Nr.: 9169.2)

- Acetonitril (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland, Art.-Nr.: 8825.2)
- Methanol (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland, Art.-Nr.: 7342.1)
- Eichproteine
  - Thyreoglobulin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland, Art.-Nr.: T1126)
  - Ferritin (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland, Art.-Nr.: 21319)
  - Katalase (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland, Art.-Nr.: 26910.02)
  - BSA (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland, Art.-Nr.: 11932.01)
  - Chymotrypsin (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland, Art.-Nr.: 17160)
  - RNase (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland, Art.-Nr.: 34390)
- Guanidin-HCl (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland, Art.-Nr.: 50940)
- Dithiothreitol (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland, Art.-Nr.: 20710)
- Iodacetamid (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland, Art.-Nr.: 26710.02)
- Trypsin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland, Art.-Nr.: T1426)
- Ameisensäure (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland, Art.-Nr.: 4724.3)

### 4.3 Proben

Die Proben wurden von der AG Prof. Gross in Göttingen zur Verfügung gestellt. Die Alportmäuse (COL(IV)A3<sup>-/-</sup>) wurden durch Kreuzung von heterozygoten COL(IV)A3<sup>+/-</sup> Mäusen mit einem 129X1/SvJ genetischen Hintergrund nach Cosgrove et al. 1996 (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) in einer Pathogen-freien Umgebung generiert. Die PCR-basierte (PCR – Polymerase-Kettenreaktion) Genotypisierung folgte Gross et al. 2003. Die Nahrung der Tiere (V153x; Ssniff, Soest, Germany) enthielt 19% Protein, 3,3% Fett und 4,9% Faser. Alle Tierversuche unterlagen dem Deutschen Tierschutzgesetz, wurden vorab genehmigt und von Veterinären überwacht. Die ACE-Therapie mit Ramipril begann im Alter von 4 Wochen mit der maximal tolerierten Dosis von 10 mg/kg/Tag in Trinkwasser. Die Entnahme der Blutproben erfolgte dann mittels intrakardialer Punktur unmittelbar nach der Tötung, im Alter von 4,5, 6, 7,5 bzw. 9 Wochen (Tabelle 2). Die Zentrifugation erfolgte mit 5000 g für 10 min. Das überstehende Serum wurde abpipettiert und nach Tieffrieren (-80°C), Transport auf Trockeneis und Lagerung in flüssigem Stickstoff, verwendet.

Es wurden 3 (WT) bzw. 4 (P, Ram) individuelle Mausproben zu gleichen Volumenanteilen für jede der untersuchten Gruppen gepoolt.

**Tab. 2: Verwendete Maus-Serum Pools**

Name	Alter in Wochen	Geschlecht	Behandelt mit
Wildtyp Pool A	4,5	1 x ♀ , 2 x ♂	Placebo
Wildtyp Pool B	6,0	2 x ♀ , 1 x ♂	Placebo
Wildtyp Pool C	7,5	2 x ♀ , 1 x ♂	Placebo
Wildtyp Pool D	9,0	2 x ♀ , 1 x ♂	Placebo
Alport/Ramipril Pool A	4,5	1 x ♀ , 3 x ♂	Ramipril
Alport/Ramipril Pool B	6,0	3 x ♀ , 1 x ♂	Ramipril
Alport/Ramipril Pool C	7,5	3 x ♀ , 1 x ♂	Ramipril
Alport/Ramipril Pool D	9,0	3 x ♀ , 1 x ♂	Ramipril
Alport/Placebo Pool A	4,5	2 x ♀ , 2 x ♂	Placebo
Alport/Placebo Pool B	6,0	2 x ♀ , 2 x ♂	Placebo
Alport/Placebo Pool C	7,5	3 x ♀ , 1 x ♂	Placebo
Alport/Placebo Pool D	9,0	4 x ♂	Placebo

„Pool“ bezeichnet jeweils die zu gleichen Teilen vereinigten Proben der entsprechenden Gruppe der Versuchstiere.

#### 4.4 Fraktionierung

Für die Fraktionierung des Serums wurden in der Arbeitsgruppe nacheinander eine Größenausschlusschromatographie (mittels fast protein liquid chromatography (FPLC)) und eine parallelisierte und automatisierte Anionenaustauschchromatographie eingesetzt (Wendler et al. 2013).

#### 4.5 Materialien und Methoden der 1. Dimension, Größenausschlusschromatographie

Für gepoolte Mausproben sind die folgenden Bedingungen erprobt worden:

1D-Größenausschlusschromatografie

- Säule: 10/300 GL Superdex™ 200
- Säulenvolumen: 24 ml
- 100 µl Probenloop
- 250 µl Fraktionen
- 350 µl/min Flussrate
- 48 Fraktionen pro Probe
- FPLC-Anlage Äkta purifier™ der Firma GE Healthcare

Die Kalibrierung der Trennsäule wurde mit Eichproteinen (Tabelle 3) vorgenommen.

**Tab. 3: Eichproteine**

Eichmix	Protein	Molekulargewicht
1	Ferritin	440 kDa
	Katalase	232 kDa
	RNAse	13.7 kDa
2	Thyreoglobulin	669 kDa
	BSA	67 kDa
	Chymotrypsin	25 kDa

Zunächst wurden je 5 mg der Eichproteine in 700 µl Puffer (10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4, EDTA) gelöst und bei 10.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Die Überstände wurden zu gleichen Teilen gemischt und nochmals für 10 min zentrifugiert. Der resultierende Überstand ist die Eich-Probe. Das Probenvolumen betrug pro Auftrag stets 100 µl (2 FPLC-Läufe mit Eichmix 1 bzw. 2, siehe Tab. 3). Die Kalibrierung der 10/300 GL Superdex 200 Trennsäule

erfolgte bei einer Laufzeit von 86 min und einer Flussrate von 350 µl/min. Ab Minute 17, nach einem Leervolumen von 6 ml, erfolgte die Sammlung der 48 Fraktionen in einer gekühlten 96er 0,5 ml Deepwell-Platte. Gemessen wurden die Elutionsvolumina der Eichproteine mittels Absorbanzmessung bei 205, 215 und 280 nm.

Durch Auftrag der bekannten logarithmierten Molekulargewichte der Eichproteine gegen ihr jeweiliges Elutionsvolumen in ml ließ sich eine Eichgerade ermitteln (siehe Kapitel 5.1.1).

Nach abgeschlossener Kalibrierung der Trennsäule, erfolgte die Trennung von je 100 µl aller in Tab. 2 genannten gepoolten Proben, 7-14 mg Gesamtprotein, in 10 mM Tris-HCl mit 150 mM NaCl (pH 7,4) bei 20°C. Die Proteinbestimmung wurde mittels Absorbanzmessung bei 205, 215 und 280 nm durchgeführt (Kreusch et al. 2008). Die gewonnenen Fraktionen wurden nach Tiefrieren (-80°C) weiterverwendet.

#### **4.6 Materialien und Methoden der 2. Dimension, Anionenaustauschchromatographie**

Die 2D-Fraktionierung erfolgte unter Verwendung in der AG selbst hergestellter Mikrosäulen, die im Mikroplattenformat zusammengefasst wurden. Dazu fanden Säulchenarrays mit 96 parallelen Säulchen (Wendler et al. 2013) mit je 100 µl DEAE Toyopearl 650M Verwendung, sodass die synchrone Bearbeitung der 48 1D-Fraktionen von jeweils zwei Proben möglich war.

Die Trennung konnte parallel mit bis zu drei Arrays (1D-Fraktionen von 6 zusammengehörigen Proben) ablaufen.

##### **4.6.1 2D-Fraktionierungsprotokoll**

###### **2D-Anionenaustauschchromatographie**

- 2 x 95 µl Probenauftrag
- 10 unterschiedliche Lösungen mit je 4 x 95 µl Auftrag, Ionenstärke- und pH-Gradient (Wendler et al. 2013, s. Tabelle 4)
- 100 µl DEAE Toyopearl 650M

In Tabelle 4 sind alle verwendeten Pufferlösungen dieser Trennungsschritte verzeichnet.

**Tab. 4: Elutionsprotokoll der 2. Dimension**

Elutionsschritt	Nr. der Mikroplatte	Probe	NaCl (mM)	Tris (mM)	pH-Wert	n-Propanol (% v/v)
0-1	1	dialysierte 1D-Fraktion	25	10	7,4	-
2-5	2	Puffer 1				
6-9	3	Puffer 2	40			
10-13	4	Puffer 3	50			
14-17	5	Puffer 4	75			
18-21	6	Puffer 5	100			
22-25	7	Puffer 6	125		7,2	
26-29	8	Puffer 7	125			
30-33	9	Puffer 8	175			
34-37	10	Puffer 9	225			
38-41	11	Puffer 10	500			

#### 4.6.2 Durchführung

Die 1D-Fraktionen wurden über Nacht auf Eis aufgetaut und zwei Stunden gegen je 2 l Puffer 1 (siehe Kapitel 4.6.1, Tabelle 4) unter Rühren dialysiert (eine 96-fach-Dialyseplatte mit 250 µl aller 1D-Fraktionen). Ein Pufferwechsel erfolgte nach einer Stunde.

Danach wurden in jedem Schritt 95 µl der dialysierten 1D-Fraktionen auf die Mikrosäulen gebracht. Das Eluat aus jeweils zwei (2D-Fraktionen 0-1) bzw. vier (2D-Fraktionen 3-42) Schritten wurde jeweils in den Wells einer 384-Well UV-Star Mikroplatte aufgefangen (insgesamt 11 Platten). In den Wells befanden sich je 10 µl vom jeweiligen Elutionspuffer, um den Durchfluss zu erleichtern (vgl. Wendler et al. 2013). Die Nummer des Schrittes korrespondiert mit der Nummer der eluierten 2D-Fraktion.

#### 4.7 Readout

Anschließend wurden die 2D-Fraktionen einer Absorbanzmessung unterzogen, bei 205, 215 und 280 nm um Proteinkonzentrationen bei verschiedenen Empfindlichkeitsstufen zu quantifizieren (Kreusch et al. 2008), sowie bei 700 nm für die Erfassung von Blindwerten von

jedem Mikroplatten-Well. Die Absorbanzen von 1D-Fractionen (150 µl) und der gesamten 2D-Fractionen wurden in UV-Star Mikroplatten mittels SpectraMax Plus<sup>384</sup> gemessen.

#### **4.8 Trypsin-Verdau**

Nach abgeschlossener Absorbanzmessung, folgte der Verdau von 75 µl der 2D-Fractionen mit ausreichendem Proteingehalt (>0,03 mg/ml) in 96-Well twin.tec PCR Platten (Wendler et al. 2013). Aufgrund der zu erwartenden riesigen Fraktionszahlen, wurde aus dem infragekommenden Fraktionsbereich jede zweite Fraktion nach einem Schachbrettmuster ausgewählt. Dies ist zulässig, da jedes der Proteine durch ihre chromatographische Verteilung in wenigstens 3 Subfraktionen zu erwarten ist. Die Denaturierung erfolgte mit Guanidin-HCl (finale Konzentration 2 M) für 20 min bei 90°C unter Verwendung eines Thermocyclers. Nach Abkühlung auf Eis wurden die Proteine mit Dithiothreitol (finale Konzentration 10 mM) bei 37°C für 1 h reduziert und in Dunkelheit bei Raumtemperatur für 30 min mit Iodacetamid (finale Konzentration 50 mM) S-carboxyamino-methyliert. Durch 1 h Dialyse gegen 2 l 20 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> unter Verwendung von MD100 erfolgte die Entfernung von Salzen und Reagenzien. Anschließend wurden die Proteine durch frisch gelöstes Trypsin (ca. 1/40 vom Proteingehalt) verdaut und die Proben dazu für 16-18 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktionen wurden mit Ameisensäure (finale Konzentration 10 mM) gestoppt und die Proben bis zur Analyse durch das Massenspektrometer in Mikroplatten bei -80°C gelagert.

#### **4.9 Massenspektrometrie**

Die massenspektrometrische Untersuchung erfolgte wie in Wendler et al. 2013 und Muckova et al. 2015 beschrieben. Zusammengefasst, wurden die verdauten 2D-Fractionen zunächst in einen Accela<sup>TM</sup> Autosampler gegeben und jeweils 20 µl anschließend unter Verwendung einer Hypersil Gold UHPLC Säule (50 x 10 mm, 1.9 µm) mittels UHPLC (Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) chromatographisch getrennt. Jede Fraktion wurde zweimal untersucht. Die Analysen wurden mittels LTQ Orbitrap Discovery durch H-ESI (heated electrospray ionization) durchgeführt. Das Tandem-Massenspektrometrie System

(MS/MS) arbeitete mit einem Mikroscan im datenabhängigen TOP10 Modus und die zehnten Ionen mit dem größten Wert, durchliefen eine Kollisions-induzierte Dissoziation (CID). Das benutzte grafische Interface stammt von der Xcalibur Software.

## **4.10 Massenspektrometrische Datenanalyse**

### 4.10.1 SIEVE

Zur Identifizierung und Quantifizierung der Proteine wurden die Massenspektren mit Hilfe der Software Proteome Discoverer 1.3 ausgewertet. Hierfür erfolgte eine Umwandlung der raw-Dateien mittels Proteome Discoverer Daemon 1.3 in msf-Dateien. Des Weiteren wurde mit dem Suchalgorithmus SEQUEST und der Datenbank SwissProt (12.11.13) gearbeitet, und dabei eine false discovery rate von <1 % zugelassen. Dies ist die Voraussetzung für den Probenvergleich.

Zur Suche nach Unterschieden in der Proteinzusammensetzung der korrespondierenden Fraktionen der verschiedenen Probengruppen kamen SIEVE 2.0 sowie SIEVE 2.1 von Thermo Scientific zur Anwendung. Beide Programme lieferten ähnliche, jedoch nicht identische Ergebnisse, was den Einbezug beider Versionen in die Auswertung und eine gemeinsame Betrachtung der Ergebnisse erforderlich machte. Hierfür wurden die Dateien aus der Auswertung mit dem Proteome Discoverer in die Software eingelesen. Es wurden dazu die zwei raw-Dateien und die msf-Dateien pro Probe gemeinsam ausgewertet.

Vor der Analyse mit SIEVE fand ein Alignment Prozess statt, um messtechnische Varianzen zu minimieren. Mit der SIEVE Software wurden die Datensätze der korrespondierenden (homologen) Fraktionen der Probenpools WT, P, Ram in folgenden Paarungen für jedes Alter getrennt mittels Quotientenbildung verglichen:

P/WT, Ram/WT, Ram/P.

In SIEVE 2.0 wurden die Ergebnisse mit der Xcorr-Einstellung ladungsabhängig (Xcorr 1,5, 2,0, 2,25 und 2,5 jeweils für die Ladung 1, 2, 3 bzw. >3) und mit einem p-Wert von 0,05 gefiltert. Mit SIEVE 2.1 wurde die Analyse mit Percolator (0,050) und Frames Table Filter (PRElement =

0, PRSize >1 und goodID >0) durchgeführt, die verwendete Berechnungsart war „Relative variance weighting“.

#### 4.10.2 Excel™

Die resultierenden sdb-Daten aus SIEVE 2.0 und 2.1 wurden zur weiterführenden Auswertung in Microsoft Excel exportiert und die angezeigten Proteinketten zunächst nach Protein ID, dann nach der ermittelten Ratio (in Näherung dem Quotienten der Signalintensitäten) sortiert. Im Folgenden ist die Vorgehensweise am Beispiel von Haptoglobin dargestellt.

In einer ersten Excel Mappe sind die massenspektrometrischen Daten jeder 2D-Fraktion in drei gesonderten Arbeitsblättern mit jeweils einer der drei Vergleichsgruppen, abgebildet (Abb. 3). Hier ist für jede Fraktion ersichtlich, welche Proteine mit welcher Ratio zwischen den beiden zu vergleichenden Proben gefunden werden konnten. Die Ratios wurden, wie in Tabelle 5 dargestellt, in Gruppen gegliedert und mit verschiedenen Pfeilsymbolen markiert, um Ausmaß und Richtung zu visualisieren.

**Tab. 5: Gruppierung der Ratios**

	$\geq 4$
	$\geq 2$ aber $< 4$
	$\geq 0,5$ aber $< 2$
	$\geq 0,25$ aber $< 0,5$
	$< 0,25$

Die Pfeile visualisieren die Ausrichtung der Ratios und verdeutlichen wie stark sie sich zwischen den Gruppen unterscheiden. So bedeuten bspw. im Vergleich P – WT der Quotient 4 eine vierfache und der Quotient 2 eine zweifache Konzentration des entsprechenden Proteins. Dies gilt für die untersuchte Subfraktion der Placebo-Probe im Vergleich zur korrespondierenden Subfraktion der Kontrollprobe. Analog entspricht der Quotient 0,5 einer Halbierung und der Quotient 0,25 einer Viertelung der Konzentration.

Protein ID	Description	Peptides	Frames	Hits	RatioNTP_p	StDevNTP_p	pValueNTP_p	Fraktion 1D_2D
SP://P07753	SPA3K_MOUSE Serine protease inhibitor A3K OS=Mus musculus GN=Serpina3k PE=1 SV=2	1	1	2	0.029	0,004	5,12E-09	A_20_01
SP://P29621	SPA3C_MOUSE Serine protease inhibitor A3C OS=Mus musculus GN=Serpina3c PE=2 SV=1	1	1	2	0.029	0,004	5,12E-09	A_20_01
SP://P28665	MUG1_MOUSE Murinoglobulin_1 OS=Mus musculus GN=Mug1 PE=1 SV=3	3	4	18	0.059	0,002	1,58E-12	A_20_01
SP://P28666	MUG2_MOUSE Murinoglobulin_2 OS=Mus musculus GN=Mug2 PE=2 SV=2	5	5	15	0.084	0,002	9,90E-20	A_20_01
SP://P01027	CO3_MOUSE Complement C3 OS=Mus musculus GN=C3 PE=1 SV=3	21	22	65	0.09	0,002	9,90E-20	A_20_01
SP://P07724	ALBU_MOUSE Serum albumin OS=Mus musculus GN=Alb PE=1 SV=3	26	30	137	0.091	0,002	9,90E-20	A_20_01
SP://P07309	TTHY_MOUSE Transthyretin OS=Mus musculus GN=Tr PE=1 SV=1	2	2	6	0.527	0,036	1,01E-05	A_20_01
SP://P26262	KLKB1_MOUSE Plasma kallikrein OS=Mus musculus GN=Klkb1 PE=1 SV=2	1	1	3	0.663	0,054	2,92E-03	A_20_01
SP://P06909	CFAH_MOUSE Complement factor H OS=Mus musculus GN=Cfh PE=1 SV=2	5	5	12	1.119	0,023	2,46E-09	A_20_01
SP://P42703	LIFR_MOUSE Isoform 2 of Leukemia inhibitory factor receptor OS=Mus musculus GN=Lifr	2	2	2	1.286	0,012	1,78E-04	A_20_01
SP://Q00623	APOA1_MOUSE Apolipoprotein A_1 OS=Mus musculus GN=Apoa1 PE=1 SV=2	13	15	66	1.303	0,004	9,90E-20	A_20_01
SP://Q4LDF6	Q4LDF6_MOUSE Protein Cflr2 (Precursor) OS=Mus musculus GN=Cflr2 PE=2 SV=1	1	1	4	1.375	0,037	3,42E-05	A_20_01
SP://Q00896	A1AT3_MOUSE Alpha_1 antitrypsin_1_3 OS=Mus musculus GN=Serpina1c PE=1 SV=2	1	1	2	1.387	0,11	1,08E-02	A_20_01
SP://Q6YJU1	Q6YJU1_MOUSE Fetuin_B OS=Mus musculus GN=Fetub PE=2 SV=1	1	1	1	1.448	0,172	2,46E-02	A_20_01
SP://Q08677	KNG1_MOUSE Isoform 3 of Kininogen_1 OS=Mus musculus GN=Kng1	1	1	4	1.605	0,243	1,36E-03	A_20_01
SP://E9Q035	E9Q035_MOUSE Protein Gm20425 OS=Mus musculus GN=Gm20425 PE=4 SV=1	7	9	19	1.636	0,075	5,11E-15	A_20_01
SP://Q8BHM5	RBM45_MOUSE RNA binding protein 45 OS=Mus musculus GN=Rbm45 PE=2 SV=1	1	1	1	1.642	0,261	2,29E-02	A_20_01
SP://Q61638	A2M_MOUSE Alpha_2 macroglobulin OS=Mus musculus GN=A2m PE=1 SV=3	3	3	7	1.643	0,03	8,28E-07	A_20_01
SP://Q921R3	APOM_MOUSE Apolipoprotein M OS=Mus musculus GN=Apom PE=1 SV=1	1	1	1	1.654	0,056	2,22E-03	A_20_01
SP://P06684	CO5_MOUSE Complement C5 OS=Mus musculus GN=C5 PE=1 SV=2	1	1	2	1.731	0,215	1,29E-03	A_20_01
SP://P09813	APOA2_MOUSE Apolipoprotein A_II OS=Mus musculus GN=Apoa2 PE=1 SV=2	1	1	8	1.751	0,036	9,90E-20	A_20_01
SP://P01027	CO3_MOUSE Isoform Short of Complement C3 OS=Mus musculus GN=C3	8	8	21	1.889	0,006	9,90E-20	A_20_01
SP://A8DUK4	A8DUK4_MOUSE Beta_globin OS=Mus musculus GN=Hbb1 PE=4 SV=1	2	2	7	1.893	0,101	3,82E-07	A_20_01
SP://A2A998	A2A998_MOUSE Complement component C8 alpha chain OS=Mus musculus GN=C8a PE=2	1	1	1	2.003	0,194	1,18E-02	A_20_01
SP://Q61646	HPT_MOUSE Haptoglobin OS=Mus musculus GN=Hp PE=1 SV=1	3	3	9	2.251	0,059	6,16E-11	A_20_01
SP://P1531	DMD_MOUSE Dystrophin OS=Mus musculus GN=Dmd PE=1 SV=3	1	1	1	2.373	0,412	3,58E-02	A_20_01
SP://Q91X72	HEMO_MOUSE Hemopexin OS=Mus musculus GN=Hpx PE=1 SV=2	3	3	7	3.774	0,149	4,43E-09	A_20_01
SP://P29477	NOS2_MOUSE Nitric oxide synthase inducible OS=Mus musculus GN=Nos2 PE=1 SV=1	1	1	1	5.099	0,631	3,93E-02	A_20_01
SP://P02088	HBB1_MOUSE Hemoglobin subunit beta_1 OS=Mus musculus GN=Hbb_b1 PE=1 SV=2	1	1	3	5.487	0,157	1,09E-04	A_20_01
SP://P02089	HBB2_MOUSE Hemoglobin subunit beta_2 OS=Mus musculus GN=Hbb_b2 PE=1 SV=2	4	5	20	6.567	0,116	1,49E-14	A_20_01
SP://E9Q223	E9Q223_MOUSE Hemoglobin subunit beta_1 (Fragment) OS=Mus musculus GN=Hbb_b1 PE=	3	3	10	8.834	0,163	9,90E-20	A_20_01
SP://Q91V88	Q91V88_MOUSE Alpha globin_1 OS=Mus musculus GN=Hba_a1 PE=2 SV=1	3	4	17	11.079	0,563	1,11E-16	A_20_01
SP://P29639	FETUA_MOUSE Alpha_2_H3_glycoprotein OS=Mus musculus GN=Ahsg PE=1 SV=1	4	4	7	13.876	0,659	1,50E-06	A_20_01

Abb. 3: Ergebnisse aus SIEVE 2.0 – Datenausschnitt zur Fraktion A\_20\_01 p\_wt

Beschriftung der Reiter – Beispiel „A\_20\_01 p\_wt“:

- A - Pool A, also Versuchstiere im Alter von 4,5 Wochen
- 20 - 1D-Fraktionsnummer
- 01 - 2D-Fraktionsnummer
- p\_wt - Quotient P/WT

Spaltenüberschriften:

- Protein ID - Swiss-Prot Identifikationsnummer
- Description - Proteinname
- Peptides - Anzahl gefundener Proteine / Proteinketten
- Frames - definierter rechteckiger Bereich in der m/z-Retentionszeit-Ebene
- Hits - Peptide die einer Gruppe oder Untergruppe von Massewerten entsprechen, werden zu einem Hit zusammengefasst
- RatioNTP\_p - Quotient mit SIEVE errechneter Konzentration des Proteins in Probe zu Vergleichsprobe
- StDevNTP\_p - Standardabweichung der Signalintensitäten der Peptide
- pValueNTP\_p - P-Wert
- Fraktion 1D\_2D - Nummer der 1D- und 2D-Fraktionen

Alle Ergebnisse eines Alters und Vergleichs wurden in je einer Excel-Mappe sowohl für SIEVE 2.0 als auch für SIEVE 2.1 zusammengefasst. Hier erfolgte zunächst die Sortierung aller gefundenen Proteine nach ihrer Protein ID und die einheitliche Färbung entsprechender Zeilen mit Proteinen gleicher ID, um eine spätere Zuordnung zu erleichtern. Hierbei fanden ausschließlich Proteine Berücksichtigung, die mindestens in zwei Fraktionen nachgewiesen werden konnten, Einzelhits wurden vernachlässigt.

Danach wurden die Proteine nach ihren Ratios sortiert und die Einträge, die keinen signifikanten Unterschied darstellen, d.h. mit  $\geq 0,5$ , aber  $< 2$ , eliminiert, wenn sie isoliert und nicht in Nachbarschaft chromatographischer Fraktionen mit größeren Ratios vorkamen. Die verbleibenden Einträge wurden nun wieder nach Protein ID sortiert und nach ihrem chromatographischen Vorkommen in Cluster eingeteilt. Ein Cluster beschreibt dabei die räumliche Nähe der Fraktionen in der 2D-Chromatographie-Matrix, die das entsprechende Protein enthalten, wie in Abbildung 5 dargestellt. Ratios mit gleicher Ausrichtung (positiv oder negativ) sollten dabei für ihre 1D-Fraktionen einen Abstand von maximal 3 und für ihre 2D-Fraktionen einen Abstand von maximal 6 Fraktionen zueinander nicht überschreiten (siehe Abbildung 4).

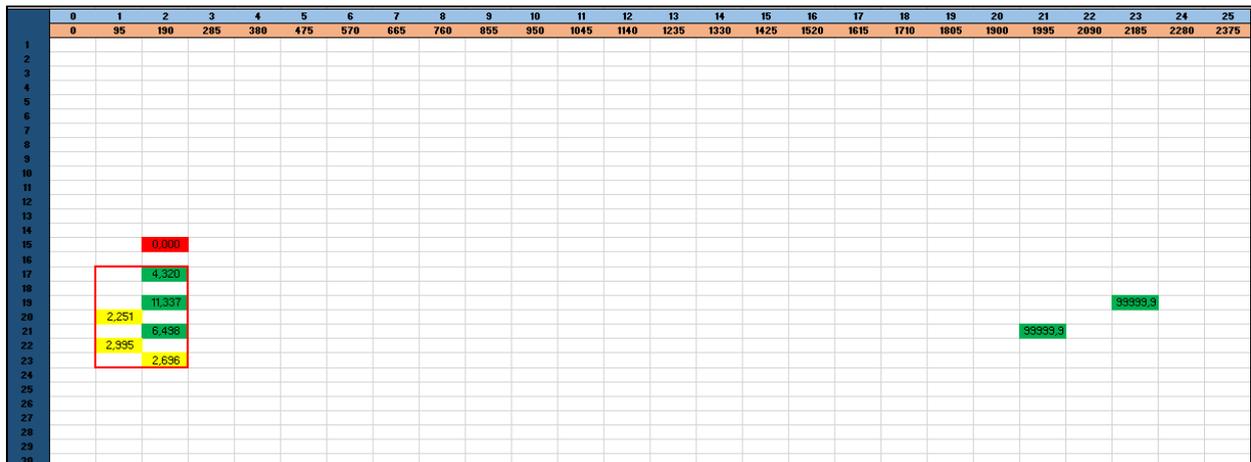
Protein ID	Description	Peptide	Frames	Hits	RatioNTP_p	StDevNTP_p	pValueNTP_p	Fraktion 1D_2D
SP://Q61129	CFAI_MOUSE Complement factor I OS=Mus musculus GN=Cfi PE=1 SV=3	3	3	5	2,475	0,204	3,92E-10	A_21_23
SP://Q61129	CFAI_MOUSE Complement factor I OS=Mus musculus GN=Cfi PE=1 SV=3	1	1	1	5,451	0,975	1,42E-03	A_25_25
SP://Q61129	CFAI_MOUSE Complement factor I OS=Mus musculus GN=Cfi PE=1 SV=3	1	1	2	4,837	1,431	8,07E-03	A_27_23
SP://Q61129	CFAI_MOUSE Complement factor I OS=Mus musculus GN=Cfi PE=1 SV=3	1	1	2	99999,9	99999,9	2,40E-09	A_30_18
SP://Q61129	CFAI_MOUSE Complement factor I OS=Mus musculus GN=Cfi PE=1 SV=3	1	1	2	99999,9	99999,9	2,40E-09	A_32_16
SP://Q61129	CFAI_MOUSE Complement factor I OS=Mus musculus GN=Cfi PE=1 SV=3	4	4	8	0,208	0,019	5,20E-11	A_33_02
SP://Q61129	CFAI_MOUSE Complement factor I OS=Mus musculus GN=Cfi PE=1 SV=3	1	1	1	2,441	0,641	3,78E-02	A_33_15
SP://Q61646	HPT_MOUSE Haptoglobin OS=Mus musculus GN=Hp PE=1 SV=1	1	1	2	0	0	0,00E+00	A_15_02
SP://Q61646	HPT_MOUSE Haptoglobin OS=Mus musculus GN=Hp PE=1 SV=1	1	1	2	4,32	0,54	2,58E-04	A_17_02
SP://Q61646	HPT_MOUSE Haptoglobin OS=Mus musculus GN=Hp PE=1 SV=1	2	2	4	11,337	0,681	4,64E-04	A_19_02
SP://Q61646	HPT_MOUSE Haptoglobin OS=Mus musculus GN=Hp PE=1 SV=1	1	1	2	99999,9	99999,9	2,40E-09	A_19_23
SP://Q61646	HPT_MOUSE Haptoglobin OS=Mus musculus GN=Hp PE=1 SV=1	3	3	9	2,251	0,059	6,16E-11	A_20_01
SP://Q61646	HPT_MOUSE Haptoglobin OS=Mus musculus GN=Hp PE=1 SV=1	1	1	1	6,498	0,998	3,11E-02	A_21_02
SP://Q61646	HPT_MOUSE Haptoglobin OS=Mus musculus GN=Hp PE=1 SV=1	1	1	2	99999,9	99999,9	2,40E-09	A_21_21
SP://Q61646	HPT_MOUSE Haptoglobin OS=Mus musculus GN=Hp PE=1 SV=1	1	1	3	2,995	0,148	1,38E-04	A_22_01
SP://Q61646	HPT_MOUSE Haptoglobin OS=Mus musculus GN=Hp PE=1 SV=1	1	1	3	2,696	0,77	3,73E-04	A_23_02
SP://Q61702	ITIH1_MOUSE Inter_alpha_trypsin inhibitor heavy chain H1 OS=Mus musculus GN=Itih1 PE=1 SV=2	5	6	15	2,115	0,061	3,80E-13	A_19_31
SP://Q61702	ITIH1_MOUSE Inter_alpha_trypsin inhibitor heavy chain H1 OS=Mus musculus GN=Itih1 PE=1 SV=2	2	2	4	1575,217	2231,991	3,11E-05	A_21_31
SP://Q61702	ITIH1_MOUSE Inter_alpha_trypsin inhibitor heavy chain H1 OS=Mus musculus GN=Itih1 PE=1 SV=2	1	1	2	2,098	0,072	6,06E-03	A_22_32
SP://Q61730-2	IL1AP_MOUSE Isoform 2 of Interleukin 1 receptor accessory protein OS=Mus musculus GN=Il1rap	1	1	1	0,464	0,039	6,68E-03	A_24_01

Abb. 4: Auszug P/WT bei 4,5 Wochen mit SIEVE 2.0 – Markierung eines positiven Clusters

Spaltenüberschriften:

Protein ID	-	Swiss-Prot Identifikationsnummer
Description	-	Proteinname
Peptides	-	Anzahl gefundener Proteine / Proteinketten
Frames	-	definierter rechteckiger Bereich in der m/z-Retentionszeit Ebene
Hits	-	Proteine die einer Gruppe oder Untergruppe von Massewerten entsprechen, werden zu einem Hit zusammengefasst
RatioNTP_p	-	Quotient mit SIEVE errechneter Konzentration des Proteins in Probe zu Vergleichsprobe
StDevNTP_p	-	Standardabweichung der Signalintensitäten der Peptide
pValueNTP_p	-	P-Wert
Fraktion 1D_2D	-	Nummer der 1D- und 2D-Fraktionen
Roter Rand	-	Cluster

(99999.9 wird zugeordnet, wenn in der Vergleichsprobe kein Peptid dieses Proteins gefunden wurde, Division durch 0)



**Abb. 5: Darstellung der Haptoglobin-Quotienten mit SIEVE 2.0 in der 2D-Trenn-Matrix für P/WT bei 4,5 Wochen**

- - 1D Fraktion, ■ - 2D Fraktion, ■ - Elutionsvolumen in µl,
- - Quotient < 0,25, ■ - Quotient ≥ 0,25 aber < 4, ■ - Quotient ≥ 4

Mit rotem Rahmen sind die Cluster markiert, in denen Haptoglobin bei P gegenüber WT ansteigt.

Gleiche Daten wie in Abb. 4.

Für jede Altersgruppe wurden die Daten nach Vergleichsgruppe und Ausrichtung der Cluster (nur/überwiegend positiv, nur/überwiegend negativ, Proteine mit mehreren Clustern mit beiden Änderungsrichtungen) in einer Excel Datei zusammengeführt, und jeweils ein Arbeitsblatt pro verwendeter SIEVE Version erstellt.

Anschließend erfolgte die Sichtung und Gegenüberstellung der nachgewiesenen Proteine. Findet sich ein Protein im Vergleich P zu WT in mehreren Fraktionen einheitlich und ausschließlich ansteigend (Quotient >2), so kann man davon ausgehen, dass es im (unfraktionierten) Blut von P erhöht ist. Ist es dann im Vergleich Ram zu P mit einem Quotienten <0,5 zu finden, so wird es mit hoher Wahrscheinlichkeit beim erkrankten Individuum durch Ramipril gegenreguliert. Die so beurteilten Mittelwerte der Proteine konnten in zwei Ergebnistabellen zusammengetragen werden, jeweils für in P gegen Ram ansteigende bzw. abfallende Proteine (siehe Tabelle 6). Hier ist nun ersichtlich, in welchen Altersgruppen, mit welcher Veränderung gegenüber der Vergleichsprobe und in wie vielen Fraktionen ein Protein gefunden wurde. Außerdem enthalten sie Informationen über die verwendete SIEVE Version und eine eventuelle Gegenregulation durch Ramipril.

**Tab. 6: Auszug Ergebnistabelle P gegen WT und Ram am Beispiel von Haptoglobin**

Protein ID	Proteinkette	Sieve Version	Alter in Wochen	Anzahl der Cluster/Fraktionen	Mittlere Ratio P/WT	Mittlere Ratio P/Ram <sup>1</sup>
Q61646	Haptoglobin	2.0	4.5	2/8	5.0	52.6
		2.0	6.0	2/27	74.2	13.5
		2.1		1/4	2.1	14.4
		2.0	7.5	2/26	146.5	9.4
		2.1		1/6	150.2	8.9

Legende zu den Tabellen 6, 8-10:

Anzahl der Cluster/Fraktionen

„Cluster“ beschreibt die erkennbare Häufung (benachbarte Fraktionen in der 2D-Matrix, in denen das gleiche Protein in gleicher Änderungsrichtung identifiziert wurde, mit max. Abstand von 3 1D-Fraktionen und 6 2D-Fraktionen)

„Fraktionen“ beschreibt die Gesamtanzahl der 2D-Fraktionen, die das betreffende Protein in den analysierten Clustern enthalten

Mittlere Ratio P/WT

Mittelwert der Ratio P/WT in allen gleichsinnigen Clustern enthaltenen Fraktionen;

Entspricht dem Faktor der Erhöhung (Ratio >1) bzw. der Verminderung (<1) in AS-Mäusen gegenüber WT

Mittlere Ratio P/Ram

Die Ratio Ram/P beschreibt den Effekt von Ramipril im Vergleich zu unbehandelten AS-Mäusen. Hier wurde jedoch der Kehrwert des Mittelwertes der Ratio Ram/P in Fraktionen mit gleichsinnigen Clustern zur Verdeutlichung des Faktors der Änderung unter Ramipriltherapie gebildet;

cave: Bei Reduzierung der Serumkonzentration eines Proteins in AS-Mäusen unter Ramipriltherapie gegenüber untherapierten Mäusen wird deshalb hier eine Ratio >1, bei Erhöhung eine Ratio <1 angezeigt.

Der Kehrwert wurde gebildet, um den numerischen Wert der gegenläufigen Änderung unter Ramipriltherapie direkt mit der Änderung in P gegenüber WT vergleichen zu können.

Die massenspektrometrische Untersuchung vermag keine exakten Konzentrationen bzw. Konzentrationsverhältnisse (Quotienten) zu liefern. Vielmehr dienen die resultierenden Ratios als semiquantitative Richtwerte. In Tabelle 6 beschreibt die Spalte „Mittlerer Quotient P/WT“ den Mittelwert der ermittelten Ratios für alle Fraktionen eines Proteins die sich in gleichsinnigen Clustern befinden. Mit einer Ratio >1 wird ein Anstieg der Konzentration des Proteins in der Gruppe P im Vergleich zur Gruppe WT, und damit Veränderungen im Proteom durch den Einfluss des AS, dargestellt. Um das Sinken der Konzentration in der Gruppe Ram gegenüber der Gruppe P, also den Einfluss der Behandlung mit Ramipril auf das

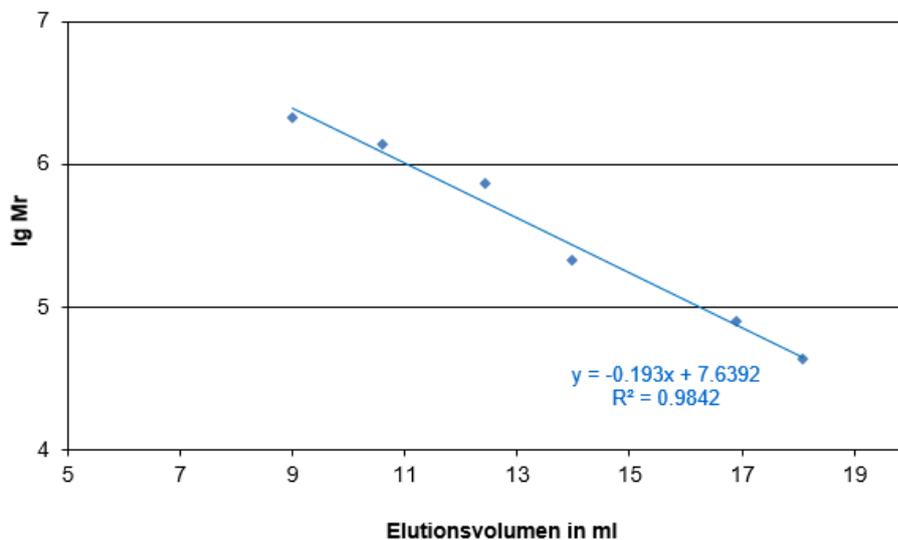
Proteom erkrankter Individuen zu illustrieren, wurde für die Spalte „Mittlere Ratio P/Ram“ der Kehrwert des Mittelwertes der Quotienten (Ram/P) für alle Fraktionen die sich in Clustern befinden, gebildet. Damit beschreiben die Werte dieser Spalte den Faktor, um welchen die Konzentration des jeweiligen Proteins nach Gabe des Medikamentes im Vergleich zu erkrankten Individuen sinkt, numerisch gut vergleichbar mit dem Anstieg bei AS ohne Behandlung.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Trennung der 1. Dimension

#### 5.1.1 Kalibrierung

Die Kalibrierung der 10/300 GL Superdex Säule wurde wie vorangehend erläutert durchgeführt (Vgl. Kapitel 4.5.1). Die resultierende Gerade ist in Abbildung 6 dargestellt. Mit ihrer Hilfe lässt sich das mittlere Molekulargewicht der darin enthaltenen nativen Proteine jeder einzelnen Fraktion anhand des Elutionsvolumens berechnen (siehe Kapitel 5.1.2, Abb. 7-10).



**Abb. 6: Eichgerade der 1. Dimension**

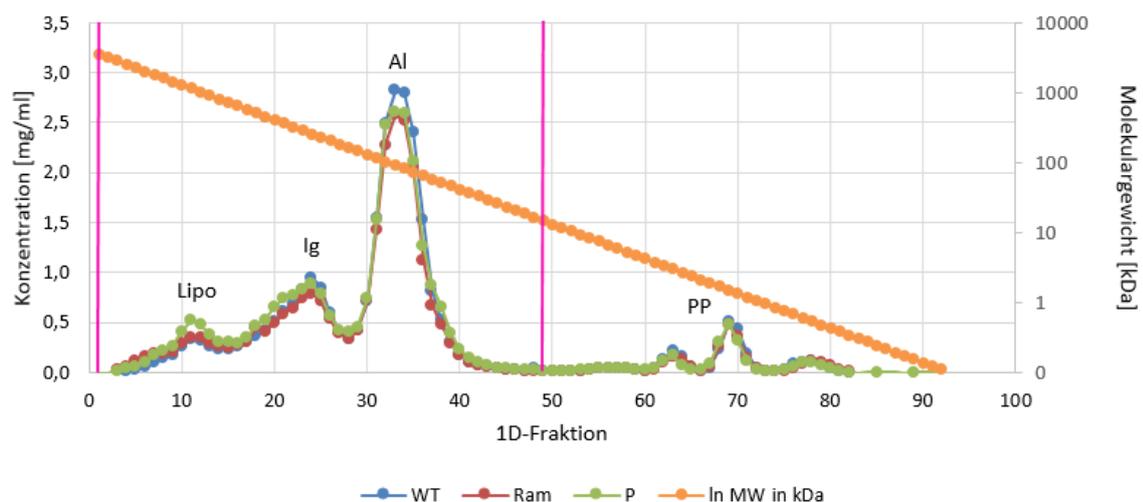
#### 5.1.2 Ergebnis der Größenausschlusschromatographie

Bereits nach dieser Trennung erkennt man charakteristische Änderungen. Die Chromatogramme der Serum-Pools der Versuchstiergruppen in jeder Altersgruppe sind in den Abbildungen 7 bis 9 dargestellt. Bei Fraktion 11 befinden sich hochmolekulare Proteine, vorrangig Lipoproteine. Mit zunehmendem Alter bzw. Nierenschädigung steigt die Konzentration bzw. der relative Anteil dieser Proteine der Gruppe P deutlich gegenüber den Konzentrationen bei WT sowie Ram an.

Beim Gipfel um Fraktion 24 stellen sich die Immunglobuline dar. Hier erkennt man vor allem bei 7,5 Wochen für die Tiere der Gruppe Ram eine geringere Konzentration, verglichen mit den anderen beiden Gruppen.

Der höchste Peak im Chromatogramm entspricht vorrangig Albumin (Gipfel um Fraktion 34). Bereits im Alter von 4,5 Wochen zeigen sich für P und Ram kleinere Konzentrationen im Vergleich zu WT. Im Alter von 7,5 Wochen sind die Albumin-Konzentrationen von WT und Ram etwa vergleichbar, während die der Gruppe P deutlich geringer ist.

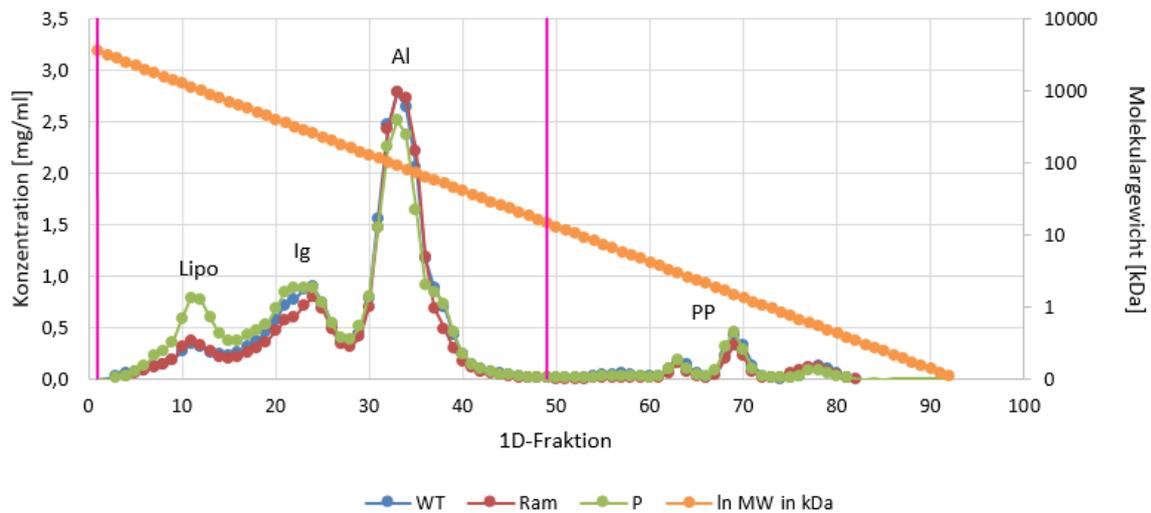
Für die Konzentrationen der niedermolekularen Peptide, dargestellt zwischen den Fraktionen 62 und 80, sind in den Wochen 4,5 und 6 keinen nennenswerten Unterschiede erkennbar. In Woche 7,5 allerdings, sind die Konzentrationen der Gruppen P und Ram geringer im Vergleich zur Gruppe WT.



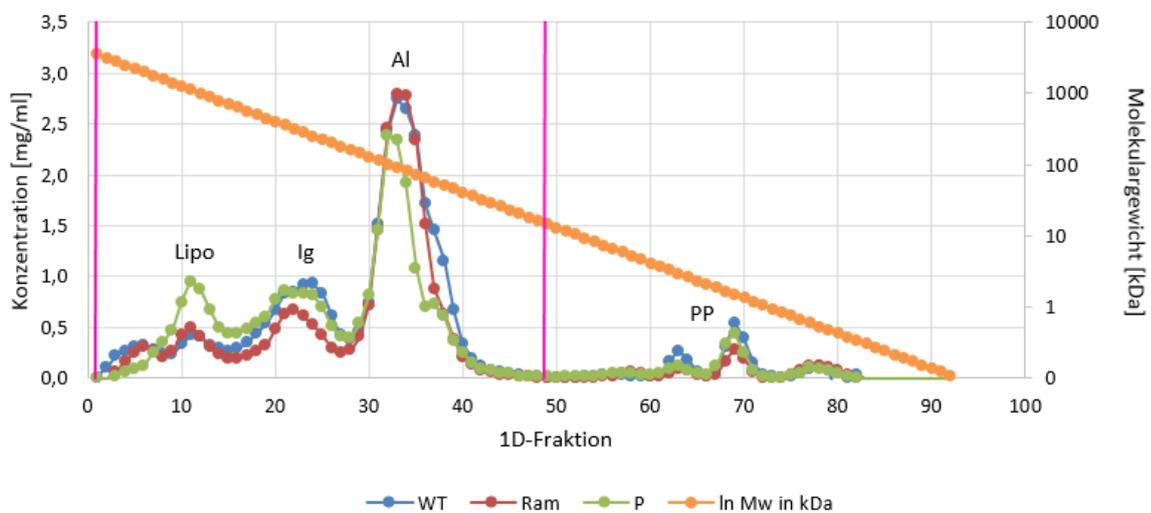
**Abb. 7: Chromatogramme der nativen Serumproteine nach Größenausschlusschromatographie (1D) im Alter von 4,5 Wochen**

Legende zu Abb. 7-10:

- Lipo - Lipoproteine
- Ig - Immunglobuline
- Al - Albumin
- PP - Proteolytische Peptide
- | - Bereich der 1D-Fractionen, die 2D-chromatographisch untersucht wurden.

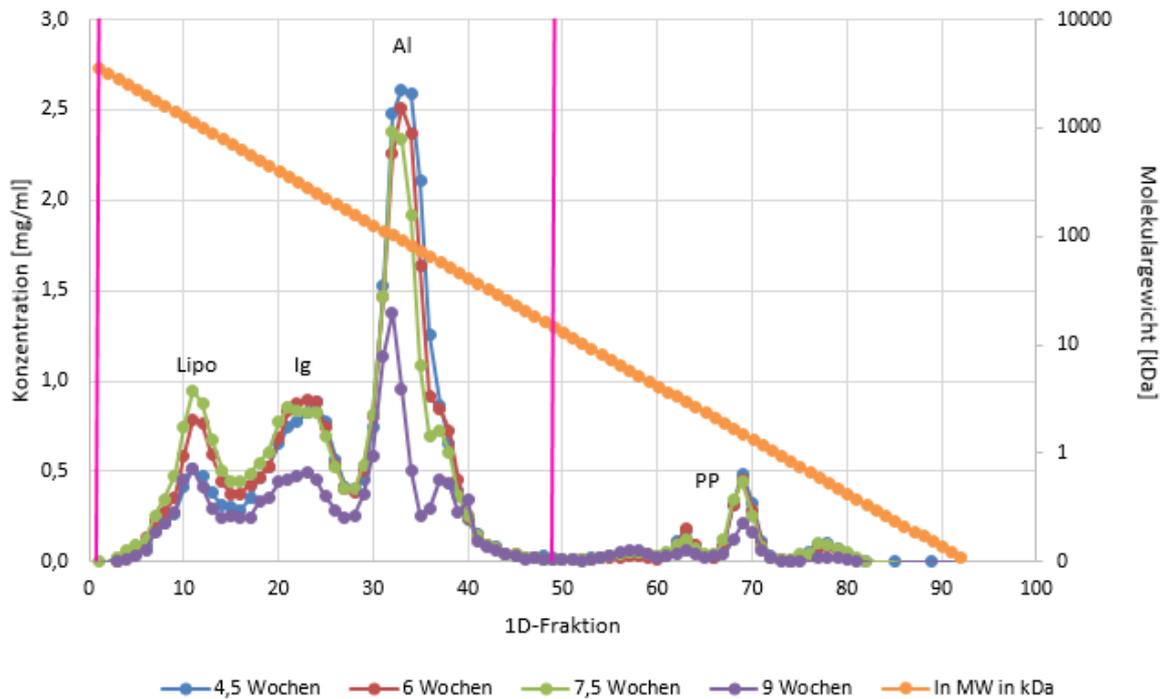


**Abb. 8: Chromatogramme der nativen Serumproteine nach Größenausschlusschromatographie (1D) im Alter von 6 Wochen**



**Abb. 9: Chromatogramme der nativen Serumproteine nach Größenausschlusschromatographie (1D) im Alter von 7,5 Wochen**

Vergleicht man die Chromatogramme der P-Mäuse zu unterschiedlichen Lebensaltern, wie in Abbildung 10 dargestellt, so fällt auf, dass mit zunehmendem Alter die Konzentrationen im Bereich der Immunglobuline und insbesondere des Albumins sinken. Dies kann mit dem Verlust der glomerulären Barrierefunktion erklärt werden. Lediglich die hochmolekularen Lipoproteine zeigen einen relativen Konzentrationsanstieg. Wegen der groben Unterschiede wurden die Proben aus Woche 9 nicht massenspektrometrisch analysiert.



**Abb. 10: Vergleich der nativen Serumproteinverteilung der Gruppe P im Alter von 4,5 bis 9 Wochen**

Tabelle 7 zeigt die Proteinkonzentrationen der untersuchten Serumpools für das jeweilige Alter der Versuchstiere.

**Tab. 7: Serumproteinkonzentrationen in mg/ml**

	4,5 Wochen	6 Wochen	7,5 Wochen
<b>WT</b>	28.87	28.40	31.84
<b>Ram</b>	26.31	25.61	26.52
<b>P</b>	26.72	27.24	26.58

Zur Ermittlung der Proteinkonzentrationen wurden die Absorbanzen von Verdünnungen der Proben A280 – A700 mit denen von einer Rinderserumalbumin-Kalibrierreihe verglichen.

## 5.2 Trennung der 2. Dimension

Auch nach der 2D-Anionenaustauschchromatographie zeigen sich charakteristische Unterschiede für verschiedene Fraktionen bei den verschiedenen Alters- und Versuchstiergruppen. Diese sind in diesem Kapitel mit Hilfe von Mittelwerten aus der Proteinkonzentration im Bereich der 2D-Fraktionen dargestellt, die im 1D-Diagramm die jeweiligen Peaks für die genannten Haupt-Proteine darstellen (siehe Abb. 7). Hierfür wurde ein Mittelwert aus den Konzentrationen von jeweils neun 2D-Fraktionen ermittelt (Abb. 11). Die Positionen der neun Fraktionen mit den höchsten Proteinkonzentrationen wurden für jede Altersgruppe im 2D-Diagramm der Gruppe WT ermittelt und mit den Fraktionen der Gruppen P und Ram verglichen.

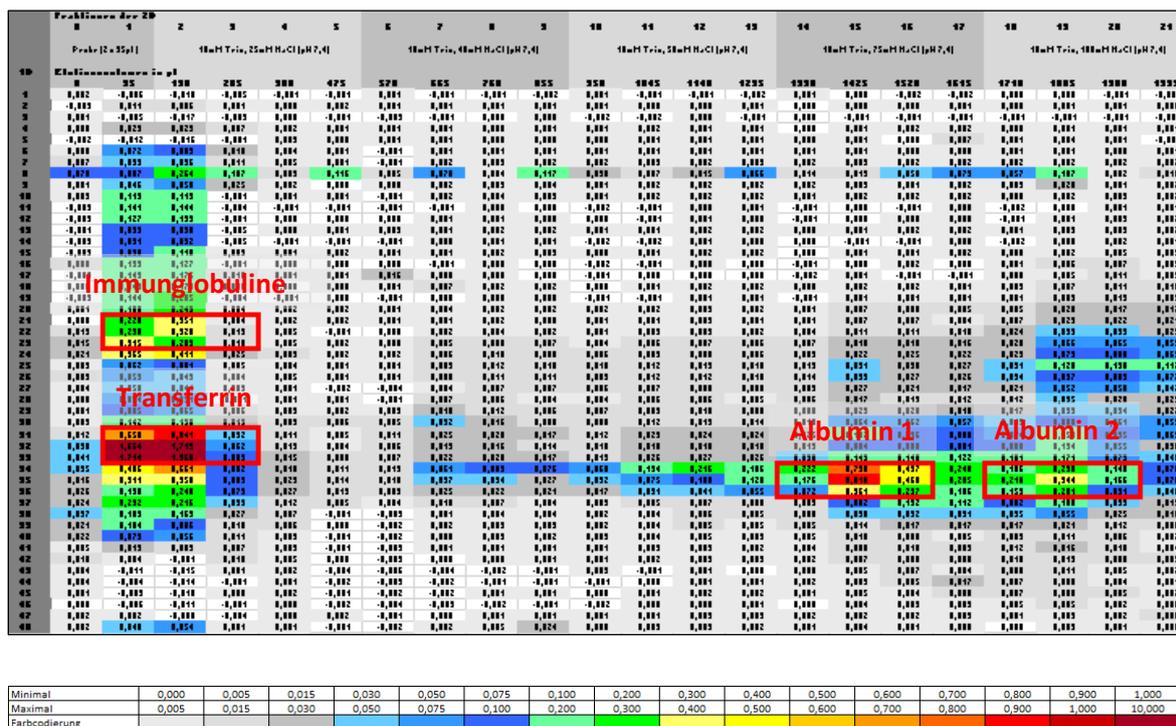
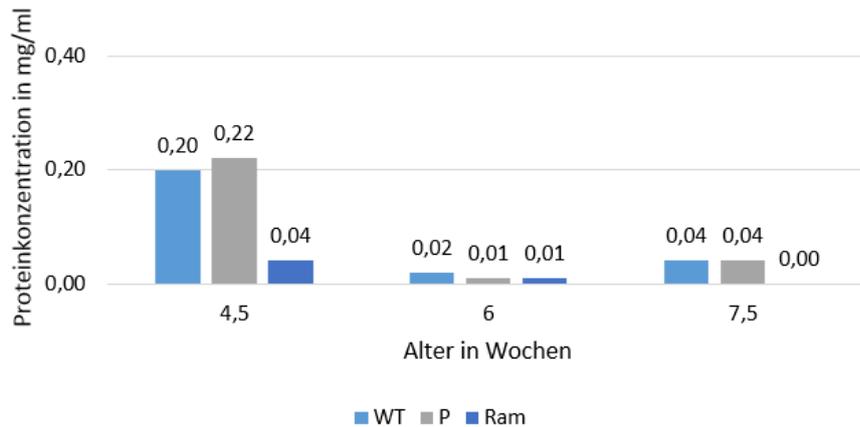


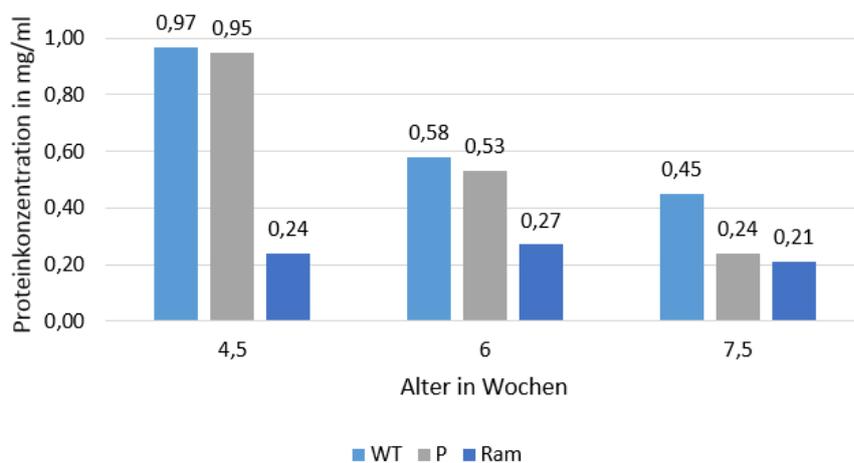
Abb. 11: Ausschnitt des 2D-Diagrammes der Gruppe WT bei 4,5 Wochen

Dargestellt sind die Proteinkonzentrationen der 2D-Fraktionen in mg/ml. Die roten Rahmen markieren die neun Fraktionen, die anhand der Massenspektrometrie hauptsächlich die bezeichneten Proteine enthalten und die hier zur Mittelwertbildung verwendet wurden.



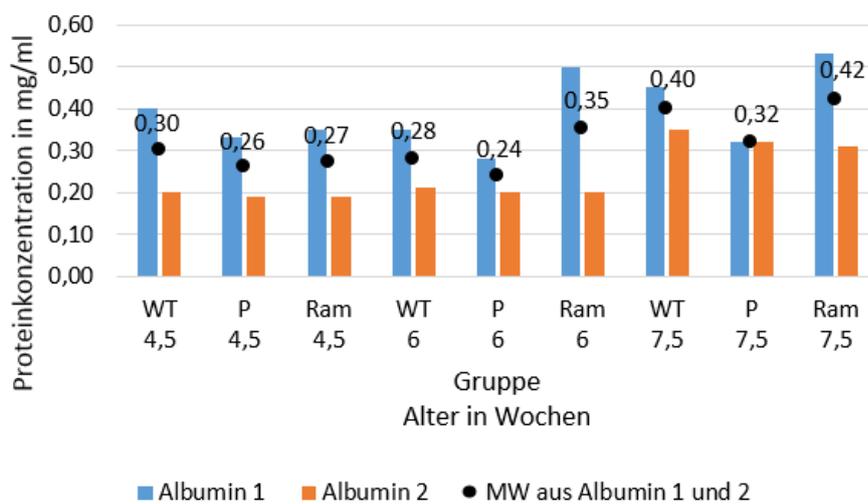
**Abb. 12: Mittelwerte der Proteinkonzentrationen aus neun 2D-Fraktionen (s. Abb. 11) mit Immunglobulinen als dominante Proteine**

In Woche 4,5 ist die Proteinkonzentration der Fraktionen, die Immunglobuline als dominante Proteine enthalten, für die behandelten AS-Tiere (Ram) mit 0,04 mg/ml deutlich niedriger als in den anderen beiden Gruppen. Im Alter von 6 Wochen sind die Immunglobulinkonzentrationen in diesen Fraktionen aller Versuchstiergruppen mit 0,02 bzw. 0,01 mg/ml sehr gering. Bei 7,5 Wochen steigen die Konzentrationen der Gruppen WT und P gering an, während für die Gruppe Ram in diesem Fraktionsbereich keine Immunglobuline nachweisbar sind.



**Abb. 13: Mittelwerte der Proteinkonzentration aus neun 2D-Fraktionen (s. Abb.11) mit Transferrin als dominantes Protein**

Bis zum Alter von 7,5 Wochen sinken die Konzentrationen der Haupt-Fraktionen (Abb. 11) aller Transferrin-enthaltenden Fraktionen in allen Gruppen kontinuierlich. Die Konzentrationen sind in der Gesamtheit der untersuchten Altersgruppen für Ram am niedrigsten. Die Gruppe P weist in Woche 4,5 und 6 noch mit WT vergleichbare Konzentrationen auf. In Woche 7,5 jedoch, erreicht Transferrin in diesen Fraktionen in der Gruppe P mit 0,24 mg/ml lediglich eine vergleichbar hohe Konzentration wie die Gruppe Ram.



**Abb. 14: Mittelwerte der Proteinkonzentration aus je neun 2D-Fraktionen der Cluster Albumin 1 und 2 (s. Abb. 11) mit Albumin als dominantes Protein**

Abbildung 14 stellt die Mittelwerte aus den ermittelten Proteinkonzentrationen der beiden definierten Albuminpeaks dar (siehe Abb. 11). In Woche 6 sinken die Konzentrationen der Gruppen WT und P zunächst geringfügig ab, bevor sie in Woche 7,5 ihr Maximum erreichen. Auch für die Gruppe Ram lässt sich in Woche 7,5 ein Anstieg der Proteinkonzentration auf mittelwertig 0,42 mg/ml, von vorher 0,35 mg/ml beobachten.

Da alle 1D-Fraktionen noch hoch-komplexe Mischungen darstellen, sind die hier geschilderten Konzentrationsverhältnisse nur näherungsweise den Plasmaprotein-Hauptkomponenten zuzurechnen. Detailliertere Aussagen sind nur aus den nachfolgend massenspektrometrisch analysierten einzelnen Proteinen ableitbar.

### 5.3 Gefundene Proteine

Die Auswertung, wie in Kapitel 4.10 erläutert, ergab 115 bei AS-Mäusen der Gruppe P eindeutig höher konzentrierte Proteine, 41 eindeutig niedriger konzentrierte als bei WT-Kontrolltieren und 18 mit mehreren unterschiedlichen Proteoformen in beiden Richtungen. Die Tabellen 8 bis 10 stellen die Ergebnisse nach Ausrichtung geordnet dar.

Die massenspektrometrischen Daten für Immunglobuline und Albumin wurden hier nicht einbezogen, weil Änderungen dieser Proteine als zu unspezifisch für die Fragestellung eingeschätzt werden.

**Tab. 8: Bei AS-Mäusen höher konzentrierte Serumproteine und ihre Beeinflussung durch Ramipril**

Protein ID	Proteinkette	Sieve Version	Alter in Wochen	Anzahl der Cluster/Fraktionen	Mittlere Ratio P/WT	Mittlere Ratio P/Ram <sup>1</sup>
Plasmaproteine						
Q6GQT1	Alpha-2-Makroglobulin P	2.0	6	1/4	34,1	36,0
D3YW52	Alpha-2-Makroglobulin	2.0	6	1/18	4,9	3,6
		2.1		1/11	7,3	5,0
		2.0	7,5	2/18	6,4	7,8
		2.1		2/15	7,3	2,9
Q61838	Alpha-2-Makroglobulin	2.0	6	2/32	4,1	7,0
		2.1		1/14	6,7	4,6
		2.0	7,5	2/39	2,9	7,5
		2.1		2/15	7,3	2,9
D3YUI3	Alpha-2-Makroglobulin	2.1	7,5	1/2	4,4	3,5
Q91X72	Hämopexin	2.1	4,5	1/5	10,2	19,2
		2.1	6	1/4	456,7	6,0
		2.0	7,5	2/29	3,5	6,2
Q61646	Haptoglobin	2.0	4,5	2/8	5,0	52,6
		2.0	6	2/27	74,2	13,5
		2.1		1/4	2,1	14,4
		2.0	7,5	2/26	146,5	9,4
		2.1		1/6	150,2	8,9
H7BWY6	Retinol-bindendes Protein 4	2.0	4,5	1/3	4,2	38,0
P12246	Serum-Amyloid P	2.0	4,5	1/4	3,1	9,8
P20918	Plasminogen	2.0	4,5	1/9	2,8	15,1
		2.0	6	1/6	3,2	1,3
		2.1		1/3	4,0	2,4
		2.0	7,5	3/9	5,8	1,9

		2.1		2/4	8,3	3,5
Q3UTR7	Angiotensinogen	2.0	4,5	2/7	5,9	3,4
		2.0	6	2/10	5,9	3,3
		2.0	7,5	2/15	7,1	7,4
D3YTY9	Kininogen 1	2.1	7,5	1/4	7,6	5,4
O08677	Kininogen 1	2.1	7,5	1/4	7,6	5,4
O08677-2	Isoform LMW von Kininogen 1	2.1	7,5	1/4	7,6	5,4
O08677-3	Isoform 3 von Kininogen 1	2.0	4,5	3/18	5,9	1,7
		2.0	6	2/27	14,5	2,6
		2.0	7,5	3/51	3,5	2,1
		2.1		1/4	7,6	5,4
Q659I3	HMW Kininogen II	2.0	4,5	1/4	16,1	93,7
P1630I1	LCAT-Phosphatidylcholin-Sterol-Acyltransferase (LCAT)	2.0	4,5	1/2	3,6	-
Apolipoproteine						
Q00623	Apo AI	2.0	4,5	4/36	6,1	0,7
		2.0	6	2/43	5,4	3,9
		2.1	7,5	3/12	5,6	1,4
P06728	Apo AIV	2.0	4,5	1/20	7,6	2,4
		2.0	6	1/8	10,3	0,5
		2.0	7,5	2/19	5,5	5,1
E9Q414	Apo B100	2.0	7,5	1/4	4,8	10,6
		2.1		1/2	1821,7	5,3
E9QP56	Apo CIII	2.0	4,5	2/5	3,3	95,2
		2.0	6	1/11	8,1	4,8
P08226	Apo E	2.0	4,5	1/4	4,4	13,2
		2.0	6	1/9	17,1	3,1
		2.1		1/2	10,9	-
G3UWN5	Apo E	2.0	4,5	2/5	5,4	50,0
		2.0	7,5	2/10	6,6	3,6
I7HJR3	Beta-2-Glykoprotein 1 (Apo H, $\beta$ 2GP1)	2.0	4,5	2/10	32,7	11,3
		2.0	7,5	1/4	3,7	7,3
		2.1		1/2	11,3	-
I7HPW5	Beta-2-Glykoprotein 1 (Apo H, $\beta$ 2GP1)	2.0	4,5	2/10	32,7	11,3
		2.0	7,5	1/4	16,3	5,0
Q01339	Beta-2-Glykoprotein 1 (Apo H, $\beta$ 2GP1)	2.1	4,5	2/5	83,7	7,2
		2.1	6	1/4	2,9	3,7
		2.1	7,5	1/2	11,3	-
E9Q9B8	Clusterin (Apo J)	2.0	4,5	1/2	3,4	-
Komplementfaktoren						
D6RGQ0, E9Q8H9, E9Q8I0, P06909	Faktor H	2.1	4,5	1/5	2,1	3,9
		2.1	6	1/4	69,3	59,7
		2.1	7,5	1/6	18,8	15,3

<b>P06909</b>		2.0		2/9	3,4	166,7
Zellbestandteile						
<b>O35490</b>	<b>Betaine-Homocystein-S-Methyltransferase 1 (BHSM1)</b>	2.0	4,5	1/7	2,4	26,5
EZM-Komponenten						
<b>P11276</b>	<b>Fibronektin</b>	2.0	4,5	1/6	2,6	7,0
		2.0	6	1/14	5,8	3,2
		2.1		1/6	46,6	5,5
		2.0	7,5	2/19	5,1	4,9
		2.1		1/6	3,9	6,5
<b>P11087-2</b>	<b>Isoform 2 der Kollagen-<math>\alpha</math>1(I)-Kette (COL<math>\alpha</math>1)</b>	2.0	4,5	1/2	2,3	35,7
<b>Q8BND5-3</b>	<b>Isoform 3 der Sulphydryl-Oxidase 1 (QSOX1)</b>	2.0	4,5	1/3	2,4	13,7
		2.0	7,5	1/5	5,8	3,5
<b>Q91XL1</b>	<b>Leucin-reiches-HEV-Glykoprotein (LRHEV)</b>	2.0	4,5	2/4	7,0	12,4
		2.0	6	2/16	10,0	6,8
		2.0	7,5	1/21	19,5	5,8
Inter-Alpha-Trypsin Inhibitoren						
<b>Q07456</b>	<b>Alpha-1-microglobulin/bikunin precursor Protein (AMBP)</b>	2.0	4,5	1/3	3,0	5,9
		2.0	6	1/9	3,5	3,1
		2.1		1/2	3,2	-
		2.0	7,5	1/7	2,3	4,0
		2.1		1/5	2,5	3,0
<b>Q61702</b>	<b>Schwere Kette H1 (HCH1)</b>	2.0	4,5	1/3	2,1	5,6
		2.1	6	1/7	4,0	3,4
		2.0	7,5	1/15	4,7	4,0
		2.1		1/5	29,0	3,5
<b>Q3UEG7</b>	<b>Schwere Kette H2 (HCH2)</b>	2.0	4,5	1/4	2,6	16,1
		2.0	7,5	1/8	3,4	3,6

Siehe Erläuterungen zu Tabelle 6.

**Tab. 9: Bei AS-Mäusen niedriger konzentrierte Serumproteine und ihre Beeinflussung durch Ramipril**

Protein ID	Proteinkette	Sieve Version	Alter in Wochen	Anzahl der Cluster/Fraktionen	Mittlere Ratio WT/P <sup>1</sup>	Mittlere Ratio Ram/P
Plasmaproteine						
<b>Q06770</b>	<b>Corticosteroid-bindendes Globulin</b>	2.0	4,5	1/6	0,9	4,4
		2.0	6	1/5	2,9	3,0
		2.0	7,5	1/11	1,8	5,3
Zellbestandteile						
<b>Q9WVT6</b>	<b>Carboanhydrase 14</b>	2.0	4,5	1/8	3,1	5,2
		2.0	6	1/7	5,9	3,5
		2.0	7,5	1/6	3,7	5,2

Siehe Erläuterungen zu Tabelle 6.

**Tab. 10: Serumproteine mit mehreren gegenläufigen Clustern in AS-Mäusen und ihre Beeinflussung durch Ramipril**

Protein ID	Proteinkette	Sieve Version	Alter in Wochen	Anzahl der Cluster/Fraktionen	Mittlere Ratio Abweichung in AS	Mittlere Ratio Abweichung unter Ramipril
Plasmaproteine						
P32261	Antithrombin III	2.0	6	1/9	10,2	0,8
		2.0	7,5	1/16	2,5	23,4
E9Q939	Serotransferrin	2.0	4,5	2/5	12,4	2,3
Q92111	Serotransferrin	2.0	4,5	1/2	40,7	4,5
		2.0	7,5	1/2	7,9	-
E9Q2Q7	Serotransferrin (Fragment)	2.0	4,5	2/13	19,7	13,3
		2.0	7,5	4/20	1,2	8,8
F7BAE9	Serotransferrin (Fragment)	2.0	6	3/15	2,5	20,9
		2.0	7,5	3/18	1,9	1,9
		2.1	7,5	2/8	2,1	4,0
F7CJN9	Serotransferrin (Fragment)	2.0	7,5	3/38	1,4	2,0
		2.1	7,5	3/10	1,8	2,6
D3YYR8	Serotransferrin (Fragment)	2.1	7,5	3/12	3,0	4,5
Zellbestandteile						
E9QAA1	Zinkfingerprotein 758	2.0	4,5	2/8	2,2	17,1
		2.0	6	1/3	8,1	3,3
K7N6T2	Vomer nasal 2, Rezeptor 67	2.0	4,5	2/4	4,7	-
		2.1	4,5	1/3	102,9	181,8
		2.0	6	2/4	124,2	-
P08228	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	2.0	4,5	1/2	4,0	4,9
		2.0	7,5	1/2	2,7	-
Q8CDI6	Coiled-Coil Domäne enthaltend Protein 158	2.0	4,5	1/5	31,3	10,7
		2.0	6	1/2	8,3	-
		2.1	6	1/7	5,6	4,4
		2.0	7,5	1/4	3,5	11,7

Die Quotienten wurden hier so angegeben, dass in jedem Fall ein vergleichbarer und positiver Faktor entsteht. Die Richtung der Abweichung ist nun farbcodiert.

	hoch in AS (P/WT) oder unter Ramipriltherapie (Ram/P)
	hoch in AS (WT/P <sup>l</sup> ) oder unter Ramipriltherapie (P/Ram <sup>l</sup> )

Siehe Erläuterungen zu Tabelle 6.

Weitere Proteine mit mehreren gegenläufigen Clustern sind in Tabelle 11 im Anhang dargestellt.

## 5.4 Diskussion

### 5.4.1 Akute-Phase-Proteine

Die erhöht gefundenen, positiven Akute-Phase-Proteine (APP) deuten auf ein Entzündungsgeschehen bereits ab dem präklinischen Stadium hin. Diese Proteine können jedoch auch fokale Prozesse widerspiegeln, da viele von ihnen auch extrahepatisch, u.a. in der Niere exprimiert werden können.

**Alpha-2-Makroglobulin** zeigt mehrheitlich erst ab Woche 6 ansteigende Ratios, und eine ausgeprägte gegenläufige Beeinflussung durch Ramipril. Erhöhte Konzentrationen des Entzündungsmarkers Alpha-2-Makroglobulin sprechen jedoch für die Zuverlässigkeit der Suchmethode, da es bereits in humanen Proben als charakteristische Veränderung beim manifesten AS identifiziert wurde und auch die das AS begleitende Entzündung gut dokumentiert ist (Kruegel et al. 2012; Baum et al. 2008). Da es noch nicht in Woche 4,5 ansteigt, ist es kein Kandidat für einen frühen Biomarker.

**Hämopexin** ist bei den AS-Tieren (P) in jedem Alter höher als bei WT-Kontrollen, mit einem Maximum in Woche 6. Hämopexin ist als Häm-Transporter gut bekannt. Es hat darüber hinaus auch eine Serin-Protease-Aktivität, die fokal in Verbindung mit Veränderungen der Aktinstrukturen innerhalb der Podozyten und die damit einhergehende Veränderung der glomerulären Barrierefunktion stehen könnte (Lennon et al. 2008; Bakker et al. 2005). Dieses APP wird zudem nicht ausschließlich in der Leber, sondern auch extrahepatisch, u.a. von Mesangiumzellen in den Glomeruli produziert (Kapojos et al. 2003). So waren humane Mesangiumzellen in vitro in der Lage Hämopexin nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  freizusetzen (Kapojos et al. 2003). Es könnte damit auch an der Pathogenese beteiligt sein. Wird es in einen aktivierten Zustand überführt, kann es dramatische Veränderungen an der glomerulären Filtrationsbarriere, im Sinne der Reduktion der Glykokalix, bewirken (Bakker et al. 2005). Der Hinweis auf eine mögliche Schlüsselrolle von Hämopexin bei glomerulären Erkrankungen ergab sich aus der Beobachtung, dass sich bei Ratten durch eine direkte Infusion von humanem Hämopexin in die Arteria suprarenalis in vivo eine reversible Proteinurie induzieren ließ, assoziiert mit Symptomen der Minimal-change-Glomerulonephritis (häufigste Ursache für nephrotisches Syndrom im Kindesalter) (Cheung et al. 2000). Nach Inkubation von humanen Podozyten mit Hämopexin, kommt es zu einem

Umbau der Aktinfasern, wobei das zytoplasmatische Aktin Aggregate bildet und das periphere zu Knoten konglomeriert (Lennon et al. 2008). Dieser Effekt konnte nicht in Nephrin-defizienten Podozyten nachgewiesen werden, außer sie wurden mit Nephrin-exprimierenden Plasmiden transfiziert. (Lennon et al. 2008). Die Effekte von Hämopexin auf humane Podozyten *in vitro* waren innerhalb von 4 Stunden reversibel und wurden durch eine Vorinkubation mit humanem Plasma gehemmt. Zusammenfassend bedingt also aktiviertes Hämopexin einen Nephrin-abhängigen Umbau von Podozyten und beeinflusst die Permeabilität der glomerulären Filtrationsbarriere durch eine Verringerung der Glykokalyx (Lennon et al. 2008; Bakker et al. 2005). Diese Beobachtungen zugrunde legend und unter Beachtung, dass es bereits in der präklinischen Phase des AS in den Proben der Gruppe P mit höheren Konzentrationen im Vergleich zu den Proben der Gruppe WT auftritt, sprechen für Hämopexin als potentiellen Biomarkerkandidat.

Auch **Haptoglobin** ist in P zu jedem Zeitpunkt höher als in WT. Dies bestätigt die Ergebnisse von Yang und Zhang 2015, die fanden, dass die Haptoglobinkonzentration bei Individuen mit nephrotischem Syndrom deutlich erhöht ist. Die medikamentöse Beeinflussung durch Ramipril ist bei den Tieren im Alter von 4,5 Wochen am stärksten ausgeprägt. Obwohl die Leber als Hauptbildungsort für Haptoglobin gilt, kann es auch von Lunge und Haut exprimiert werden. Untersuchungen zur Akute-Phase-Reaktion an Mäusen zeigten, dass dieses Protein neben der Leber auch in anderen Geweben, einschließlich der Niere, induzierbar ist (D'Armiento et al. 1997). Da erhöhte Konzentrationen beim nephrotischem Syndrom gefunden wurden, bedeutete das auf AS-Mäuse übertragen, dass der Anstieg von Haptoglobin zumindest in der Woche 7,5 zu erwarten ist. Es steigt jedoch hier bereits früher sehr deutlich an. Damit ist es als Biomarkerkandidat in Betracht zu ziehen.

Das **Serum Amyloid P (SAP)** wies ausschließlich in Woche 4,5 geänderte Konzentrationen im Vergleich P/WT auf. SAP ist ein Aktivator des Komplementsystems (KS) (Holers et al. 2014). Das KS ist Teil des unspezifischen humoralen Immunsystems welches u.a. zur Eliminierung apoptotischer Zellen beiträgt (Holers et al. 2014). Der Nachweis dieses Proteins während der präklinischen Krankheitsphase spricht für eine hohe, u.U. pathognomonische Aktivität des KS während dieser Zeit. Außerdem hemmt SAP u.a. die Differenzierung von Fibrozyten und komplexiert externalisiertes Chromatin apoptotischer Zellen (Mathur und Herzog 2012).

Damit käme ihm eine frühzeitige regulatorische Rolle bei der Fibrosierung zu. Es eignet sich daher als Biomarkerkandidat.

**Plasminogen** konnte in allen untersuchten Krankheitsstadien mit positiven Ratios nachgewiesen werden. Dabei zeigt es in Woche 4,5 eine deutliche Beeinflussung durch den angewendeten ACE-Hemmer, sowie in Woche 7,5 die höchste Ratio P/WT. Im fortgeschrittenen Stadium des AS ist dieser Anstieg im Rahmen der Akute-Phase-Reaktion zu erwarten.

Neben der Beeinflussung der Fibrinolyse, wirkt Plasminogen/Plasmin ebenfalls auf Komponenten der EZM und der Basalmembran, einschließlich Laminin, sowie auf das KS (Lähteenmäki et al. 2000). Plasmin spaltet effektiv die Komplementfaktoren C3 und C5, wodurch ihm eine komplementaktivierende Wirkung zugesprochen wird (Amara et al. 2010). Des Weiteren spielt es eine modulierende Rolle im KS. Plasminogen bindet an die Faktoren C3 sowie C5, und aktives Plasmin inaktiviert die beiden Hauptkomplementproteine C3b und C5, wodurch die Komplementkaskade inhibiert wird (Barthel et al. 2012).

Der **Komplementfaktor H** ist in AS-Mäusen durchgängig höher als in WT-Tieren. Es zeigt seine größte Ratio für P/WT in Woche 6, welche mit einer deutlichen Gegenregulation durch Ramipril einhergeht.

Der Komplementfaktor H trägt zur Inhibition der Komplementkaskade bei und ist das Hauptregulatorprotein des alternativen Aktivierungsweges des KS (Holers et al. 2014). Seine Bindung an azelluläre Oberflächen, wie z.B. Basalmembranen stellt eine notwendige und wichtige protektive Aufgabe dieses Moleküls dar. Untersuchungen zeigen, dass Individuen mit geringen Konzentrationen von Faktor H zu einem hohen Anteil an Nierenerkrankungen leiden (Pickering 2008). Weiterhin wurden in Patienten mit atypisch hämolytisch urämischem Syndrom (aHUS) inaktivierende Mutationen innerhalb der Oberflächen-bindenden Domäne des Faktor H gefunden, die eine wichtige Rolle für die Kontrolle dieses Moleküls auf die Komplementaktivierung in und um die kleinen Arteriolen der Niere suggerieren (Noris und Remuzzi 2008). Das aHUS beschreibt eine thrombotische Mikroangiopathie, bei der meist durch Bakterientoxine, aber auch aufgrund hereditärer Ursachen, Blutzellen zerstört und die Nierenfunktion geschädigt wird (Noris und Remuzzi 2008, Razzaq 2006). Auch bei Patienten mit membranoproliferativer Glomerulonephritis Typ II (auch Dense Deposit

Disease), einer seltenen Nierenerkrankung einhergehend mit pathologischen Veränderungen der GBM, wurden Mutationen des Faktor H festgestellt (Holers et al. 2014; Appel et al. 2005). Diese Untersuchungen zeigen eine starke Evidenz dafür, dass die Dysregulation des alternativen Aktivierungsweges durch eine veränderte Aktivität oder Konzentration des Faktor H mit der Entstehung einer Glomerulonephritis assoziiert sein kann.

Neben den Zusammenhängen zwischen Dysfunktionen dieses Proteins und pathologischen Veränderungen der Nierengewebe, zeigen sich auch Hinweise auf eine Verbindung des KS mit denen bei einer Gruppe von Alport-Patienten auftretenden Makuladegenerationen. So wurden Polymorphismen und seltene Varianten von Komplement-Genen entdeckt, deren Produkte hauptsächlich die Aktivierung des alternativen Aktivierungsweges des KS unterstützen, und mit einem erhöhtem Risiko für die Entwicklung einer humanen Makuladegeneration assoziiert sind (Gehrs et al. 2006).

Die hier dargestellten Ergebnisse und daraus resultierenden Beobachtungen machen den Komplementfaktor H als Biomarkerkandidat interessant. Seine starke Erhöhung (im Serum) in allen untersuchten Altersgruppen könnte ein Indiz für eine wichtige regulatorische Maßnahme zur Begrenzung der zum Nierenschaden führenden komplement-abhängigen lokalen Vorgänge darstellen, zumal zahlreiche Komplementfaktoren des klassischen Weges ebenfalls erhöht sind (Muckova et al. 2015).

**Angiotensinogen** ist in allen untersuchten Krankheitsstadien mit erhöhten Ratios für P/WT vertreten, mit den höchsten Konzentrationen in Woche 7,5.

Eine der vielfältigen Funktionen der Nieren besteht in der Regulation des Flüssigkeits- und Elektrolythaushaltes des Körpers. Die damit verbundenen Vorgänge werden durch die Hormone und Enzyme des RAAS reguliert. Dabei wird bei Abfall des Blutdrucks das Enzym Renin aus dem juxtaglomerulären Apparat der Nieren freigesetzt, welches vom Protein Angiotensinogen Angiotensin I abspaltet. Dieses wird wiederum von ACE in Angiotensin II gespalten. Angiotensin II sorgt über Rezeptoren für eine Vasokonstriktion der kleinen Blutgefäße, wie zum Beispiel in den Vasa efferentia der Glomeruli. Das zurzeit für die Therapie des AS eingesetzte Medikament Ramipril gehört zur Gruppe der ACE-Hemmer und greift somit auch in diesen Regelkreis ein. Der protektive Effekt von ACE-Hemmern bei AS

wird u.a. auf die Verminderung des effektiven Filtrationsdruckes zurückgeführt, wodurch die noch funktionierenden Zellen und Strukturen der Glomeruli geschützt werden.

Bereits die Arbeitsgruppe um Bae konnte 2015 erhöhte Konzentrationen von Angiotensinogen in Proben von COL(IV)A3<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu denen von Wildtyp-Mäusen nachweisen, allerdings erst ab einem Alter von 7 Wochen (Bae et al. 2015). Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen bereits ab 4,5 Wochen hohe Konzentrationen für Angiotensinogen bei den Tieren der Gruppe P. Es wird außer in der Leber auch im proximalen Tubulus der Nieren exprimiert und ist wichtig für die Kontrolle des arteriellen Drucks und der renalen Natriumexkretion (Bae et al. 2015; Ying et al. 2012). Untersuchungen an genetisch modifizierten Mäusen zeigten ein Ansteigen des systemischen Blutdrucks, eine erhöhte Proteinurie und eine voranschreitende Nierenschädigung, verursacht durch eine renale Überexpression von Angiotensinogen (Sachetelli et al. 2006). Eine medikamentöse Inhibition des RAAS konnte diesen Veränderungen vorbeugen (Sachetelli et al. 2006). Zudem könnte der durch vermehrte Albuminurie bedingte oxidative Stress im proximalen Tubulus eine erhöhte tubuläre Angiotensinogen-Expression verursachen (Reich et al. 2005; Hsieh et al. 2002).

Das aus der Leber stammende Angiotensinogen soll die Hauptquelle von intrarenalem Angiotensin II darstellen, welches bei Mäusen mit beeinträchtigter glomerulärer Permeabilität zur Regulation des Blutdruckes und zur renalen Natrium-Retention beitragen soll (Matusaka et al. 2012). Allerdings ließ sich bei diesen Tieren zusätzlich auch eine erhöhte renale mRNA-Expression feststellen, was eine erhöhte lokale Produktion von Angiotensin II suggeriert (Bae et al. 2015).

Der Nachweis bereits bei 4,5 Wochen, der direkte Zusammenhang zum RAAS und vor allem die potentielle Freisetzung im proximalen Nierentubulus, qualifizieren Angiotensinogen als möglichen Markerkandidaten.

Die **Isoform 3 von Kininogen 1** sowie das **HMW Kininogen II** sind die einzigen Vertreter der Kininogene, die im Alter von 4,5 Wochen bereits mit veränderten Konzentrationen im Vergleich der Tiere der Gruppe P zu WT gefunden wurden. HMW Kininogen II ist sogar ausschließlich in dieser Altersgruppe erhöht, mit einer ausgesprochen hohen medikamentösen Gegenregulation durch Ramipril. Neben der bereits während der

Initialphase gefundenen Isoform 3 des Kininogen 1, finden sich ab Woche 7,5 zusätzlich das **Kininogen 1** bzw. die **Isoform LMW des Kininogen 1** mit positiven mittleren Ratios für P/WT.

Die in der Gruppe P erhöhten Kininogene sind Bestandteile eines weiteren wichtigen physiologischen Regulationssystems, des Kallikrein-Kinin-Systems (KKS). Es besteht aus Kininogenen, Kininogenasen (Kallikrein), Plasmakinen (Bradykinin) und Kininasen, und spielt eine Rolle in der Frühphase von Entzündungen sowie bei der Blutdruckregulation. Dieses System weist Schnittpunkte mit Abläufen des RAAS auf, und steht im Verdacht, ebenfalls durch ACE-Hemmer beeinflusst zu werden, und somit einen großen Anteil an der Wirksamkeit dieser Medikamente bei der Behandlung des AS zu haben (Kakoki und Smithies 2009). Bei der Suche nach einem wirksamen Mittel zur Therapie des AS wurde auch der Einfluss von Angiotensin-Rezeptor-Blockern untersucht, es konnte jedoch kein mit ACE-Hemmern vergleichbarer therapeutischer Effekt nachgewiesen werden. Das führte zu der Annahme, dass die Wirkung von ACE-Hemmern auf das KKS u.U. für den nephroprotektiven Effekt dieser Medikamente bei der Therapie des AS verantwortlich ist (Kakoki und Smithies 2009).

Polymorphismen in verschiedenen KKS-bezogenen Genen beim Menschen, gehen einher mit einem erhöhten Risiko renaler Erkrankungen, wobei diese Gene zudem mit der Progression vom chronischen Nierenversagen zum Nierenversagen im Endstadium assoziiert sind (Kakoki und Smithies 2009).

Deshalb ist HMW Kininogen II, das bereits in der Initialphase des AS als erhöht nachgewiesen wurde und zudem eine starke Beeinflussung durch Ramipril zeigt, als potentieller Biomarker in Betracht zu ziehen.

Die **Betaine-Homocysteine-S-Methyltransferase 1** (BHSM1) konnte ausschließlich in der präklinischen Krankheitsphase mit einer erhöhten Konzentration für die Gruppe P im Vergleich zu WT gefunden werden. Auch der gegenläufige Effekt von Ramipril ließ sich hier deutlich darstellen. Dieses Protein wird vor allem in der Leber, aber auch in der Niere exprimiert (Sunden et al. 1997). Es katalysiert die Remethylierung von Homocystein und ist ein wichtiger Regulator des Homocystein-Gleichgewichtes (Williams und Schalinske 2010). Durch die Regulation des Homocysteinspiegels in der Leber schützt es die Hepatozyten direkt vor Homocystein-induzierten Schäden (Ji et al. 2007). Mäuse, bei denen die BHSM-

Aktivität medikamentös um ca. 90% reduziert wurde, zeigten einen 7-fachen Anstieg der Plasmakonzentrationen für Homocystein (Collinsova et al. 2006). Störungen des Homocystein-Metabolismus sind wiederum bekannte Risikofaktoren für vaskuläre Erkrankungen, was möglicherweise eine Verbindung zu Komorbiditäten des AS darstellen könnte (Williams und Schalinske 2010). Da die BHSM1 lediglich in der Initialphase des AS mit einem deutlichen Einfluss von Ramipril nachgewiesen werden, ist sie als präklinischer Biomarkerkandidat geeignet.

Im Folgenden werden Proteine der Gruppe aus der negativen APP betrachtet.

Als einziges Protein mit niedriger Konzentration im Vergleich P/WT in Woche 4,5 muss das **Corticosteroid-bindende Globulin**, als bekanntes negatives APP genannt werden. Seine hohe Ratio Ram/P deutet in diesem Alter auf eine starke medikamentöse Gegenregulation hin. In Woche 6 ist die geringste Konzentration dieses Proteins für die Gruppe P im Vergleich zu WT während des untersuchten Krankheitsverlaufs zu finden.

Transferrin zeigt viele verschiedene Cluster, die verschiedenen Proteoformen zuzurechnen sind. Mehrere **Transferrin-Proteoformen** wurden in Woche 4,5 mit deutlich positiven Ratios für P/WT ermittelt, und stets ist eine Gegenregulation durch Ramipril zu beobachten. In Woche 6 konnte überwiegend eine Transferrin-Gruppe, vertreten in drei Clustern, nachgewiesen werden, diesmal allerdings mit niedrigen Konzentrationen in P im Vergleich zu WT. Wie bereits in der vorher untersuchten Altersgruppe, findet auch hier eine deutliche medikamentöse Gegenregulation durch Ramipril statt. In Woche 7,5 konnten die meisten abgrenzbaren Transferrin-Cluster in beiden Richtungen nachgewiesen werden, hauptsächlich mit kleineren Konzentrationen in P im Vergleich zu WT.

Das in der Leber gebildete Transferrin gilt in den meisten untersuchten Tier-Spezies als negatives APP (Gabay und Kushner 1999). Aber auch in verschiedenen extrahepatischen Geweben, einschließlich der Niere bei Mäusen, ließ sich die Expression von Transferrin-mRNA nachweisen (Kalmovarin et al. 1991). Der Fakt, dass dieses, eigentlich negative APP, in einigen Fraktionen der präklinischen Krankheitsphase eine bis zu 40fach erhöhte Konzentration bei P im Vergleich zu WT aufweist, deutet auf einen anderen Synthesort, vermutlich die Niere, und eine besondere Rolle dieser Protein-Gruppe im Kontext des AS hin (Schrödl et al. 2016). Im weiteren Krankheitsverlauf zeigen sich überwiegend geringere

Transferrin-Konzentrationen in den Proben der Gruppe P in Übereinstimmung mit der Akute-Phase-Reaktion. Dies zusammengenommen, müssen die ansteigenden Transferrin-Proteoformen als potentielle Biomarkerkandidaten näher charakterisiert werden.

Das **Retinol-bindende-Protein 4** konnte ausschließlich im präklinischen Krankheitsstadium, wie Transferrin, mit einer positiven Ratio für die Gruppe P nachgewiesen werden. Hier zeigt sich eine besonders starke medikamentöse Beeinflussung. Deshalb ist auch dieses Protein als Biomarkerkandidat in Betracht zu ziehen. Das Retinol-bindende-Protein 4 ist ein Transportprotein für Retinol (Vitamin A), das in der Leber sowie in reifen, Lipid-beladenen Adipozyten produziert wird (Vergés et al. 2012). Es wurde bereits bei diabetischer Nephropathie/Glomerulopathie als Biomarker vorgeschlagen (Khalil et al. 2015; Cabré et al. 2007).

**Antithrombin III** ist im Alter von 7,5 Wochen erniedrigt, nachdem es noch in Woche 6 mit einer positiven Ratio P/WT vertreten war.

#### 5.4.2 Apolipoproteine

In der präklinischen Phase des AS wurden die **Apo AI, AIV, CIII, E** sowie das **β2-Glykoprotein 1** (β2GP1) anhand der durchgängig positiven mittleren Ratios für P/WT als in AS-Tieren erhöht nachgewiesen. Für jedes der genannten Apos zeigte sich auch eine gegenläufige Beeinflussung durch Ramipril. Das β2GP1 ist eines der Proteine, das in der Altersgruppe von 4,5 Wochen mit Ratios von 32,7 bis 83,7 für P/WT den höchsten Anstieg aufweist. Auch in Woche 6 konnten die Apo AI, AIV, E sowie das β2GP1 in Woche 7,5 erneut mit jeweils positiven Ratios P/WT nachgewiesen werden, die allerdings für das β2GP1 nicht in allen untersuchten Fraktionen durch Ramipril gegenreguliert werden. Ausschließlich in dieser Altersgruppe wurde das **Apo B100**, ebenfalls mit positiver Ratio für die Gruppe P, gefunden.

Alle in den hier dargelegten Untersuchungen mit veränderten Konzentrationen gefundenen Apos zeigen positive Ratios P/WT. Mehrere Arbeitsgruppen weltweit beschäftigen sich mit charakteristischen Störungen des Lipoproteinstoffwechsels bei Nierenerkrankungen. So konnten für Patienten mit IgA-Nephropathie (als beispielhafte Patientenkohorte für glomeruläre Nierenerkrankungen) Apo AI und B als Risikofaktoren identifiziert werden.

Hatten die Patienten dieser Gruppe einen Anstieg der Konzentration für Apo AI bzw. B, so hatten sie auch ein signifikant höheres Risiko das Endstadium der Nierenerkrankung zu entwickeln, verglichen mit Patienten mit einer geringeren Konzentration (Lundberg et al. 2012). Des Weiteren sind Lipoproteine, die einen hohen Anteil an Apo B und CIII enthalten, bei reduzierter renaler Funktion erhöht (Attmann et al. 2011).

Das Apo AIV ist ein anti-arterogenes und antioxidatives Glykoprotein (Stangl et al. 2015). Der Plasma-Spiegel dieses Proteins ist erhöht bei Patienten mit primär chronischen Nierenerkrankungen oder Nierenversagen. Dieser Zusammenhang konnte von der Arbeitsgruppe um Stangl 2015 für zwei repräsentative Probandengruppen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zeigen jedoch nicht, ob die hohen Plasmakonzentrationen dieses Proteins ursächlich für oder die Folge solcher Erkrankungen sind.

Das Protein **Clusterin** (Apo J) findet sich ausschließlich bei den Mäusen im Alter von 4,5 Wochen mit positiven Ratios P/WT, wird jedoch nicht durch Ramipril gegenreguliert. Durch eine seiner bekannten Funktionen, die Hemmung des Angiotensin-Typ-1-Rezeptors (AT1R), hat es einen protektiven Effekt gegenüber renaler Fibrose. Eine Überexpression von Clusterin in Epithelzellen des proximalen Tubulus senkt den Spiegel der Angiotensin-II-stimulierten fibrotischen Marker (Jung et al. 2014). Angiotensin II spielt eine große Rolle bei der Entwicklung einer renalen Fibrose (s.o.), unter anderem auch durch die Aktivierung einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B ist, neben weiteren Funktionen, beteiligt an Immunreaktionen, Entzündungsreaktionen, Proliferation und Apoptose, sowie pathologischen renalen Vorgängen wie Nephritis, tubulointestinalen Störungen und Proteinurie (Lee et al. 2004; Guijarro und Egido 2001; Gilmore et al. 1996). Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte nachgewiesen werden, dass Clusterin die Angiotensin II-stimulierte Translokation des Transkriptionsfaktors p-NF- $\kappa$ B in den Nukleolus über eine direkte physikalische Interaktion hemmt und infolge dessen den AT1R-Spiegel in den Epithelzellen des proximalen Tubulus senkt. Damit besteht die Möglichkeit, dass Clusterin als therapeutisches Ziel für die Behandlung von Angiotensin II induzierten renalen Erkrankungen geeignet ist (Jung et al. 2014).

Die **LCAT** wurde ebenfalls ausschließlich in der präklinischen Phase des AS mit einer positiven Ratio P/WT nachgewiesen. Erwähnenswert ist hier, dass es zu keiner feststellbaren

Gegenregulierung durch Ramipril gekommen ist. Damit wurde LCAT in der Altersgruppe gefunden, in der auch Apo AI die höchste Ratio aufweist.

Patienten die an einer chronischen Nierenerkrankung leiden, haben ein dramatisch erhöhtes Risiko, an kardiovaskulären Störungen zu erkranken, wobei dieses Risiko mit sinkender Nierenfunktion weiter ansteigt und sein Maximum zum Zeitpunkt der Dialysepflichtigkeit erreicht (Calabresi et al. 2015; Go et al. 2004; Foley et al. 1998). Weiterhin sind chronische Nierenerkrankungen assoziiert mit Fettstoffwechselstörungen, ausgezeichnet durch eine signifikante Reduktion von unter anderem Plasma-HDL- (HDL= high density lipoprotein) und Apo AI-Konzentrationen (Calabresi et al. 2015). Hierbei ist die Cholesterin-Veresterung deutlich beeinträchtigt, was durch eine Reduktion der Plasma-LCAT-Konzentration und – Aktivität und ein Ansteigen des Plasma pre- $\beta$ -HDL-Gehaltes deutlich wird (Calabresi et al. 2015). Pre- $\beta$ -HDL bezeichnet dabei eine Form von HDL-Partikel (Lipid-arm oder auch als diskoides HDL), in der Apo AI im Plasma vorkommt (Calabresi et al. 2015; Rye und Barter 2004). Der HDL-Metabolismus wird durch eine große Anzahl an Plasma- und Zell-assoziierten Proteinen reguliert. Er beginnt in der Leber und im Darm mit der Sekretion des lipidarmen Apo AI, welches Phospholipide und Cholesterin akquiriert, um u.a. pre- $\beta$ -HDL zu bilden (Calabresi et al. 2015; Tsujita et al. 2005). Einmal in der Zirkulation, interagieren die pre- $\beta$ -HDL Partikel mit der LCAT. Das Enzym verestert Cholesterin und generiert dadurch  $\alpha$ -HDL. Pre- $\beta$ -HDL Partikel haben daher nur eine kurze Halbwertszeit im Plasma (Calabresi et al. 2015; Rye und Barter 2004). Die Cholesterin-Veresterung durch die LCAT spielt folglich eine zentrale Rolle für den intravaskulären HDL-Metabolismus und die Struktur und Konzentration des Plasma-HDL (Calabresi et al. 2015). Zudem wurde eine hochsignifikante Korrelation zwischen den Plasma-LCAT-Konzentrationen und dem Spiegel von Apo AI nachgewiesen (Calabresi et al. 2015). Die verringerte LCAT-Konzentration und vermutlich auch –Aktivität führt zu einer mangelhaften Cholesterin-Veresterung und einer verschlechterten HDL-Reifung, und resultiert schließlich in einem beschleunigten Katabolismus von Apo AI und Apo AII Partikeln (Calabresi et al. 2015; Rader et al. 1994). Eine im Urämie-Tiermodell reduzierte hepatische Apo AI-Produktion, könnte wahrscheinlich ebenfalls zu den niedrigen HDL-Spiegeln im Plasma von Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen beitragen (Calabresi et al. 2015; Vaziri et al. 1999). Da ein erworbener LCAT-Mangel eine der Hauptursachen von niedrigen HDL-Plasmaspiegeln bei Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen darstellt, ist LCAT ein attraktives Ziel für eine

therapeutische Intervention, um Fettstoffwechselstörungen zu behandeln, das Vorschreiten der Krankheit zu verlangsamen und damit möglicherweise das Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen für diese Patienten zu senken (Calabresi et al. 2015).

Unklar ist die Bedeutung der Erhöhung der LCAT-Konzentrationen in den untersuchten Proben der AS-Tiere (P). Das Enzym könnte im Rahmen der APP in der Leber mit co-stimuliert werden oder aber seine Elimination durch noch unbekannte Prozesse im komplexen Lipoproteinstoffwechsel verlangsamt sein.

Auch die Rolle von Apo AI muss in diesem Zusammenhang weiter untersucht werden. Während in Lundberg et al. 2012 ein Zusammenhang zwischen erhöhten Konzentrationen von Apo AI mit einem erhöhten Risiko für IgA-Nephropathie festgestellt werden konnte, konnte in Calabresi et al. 2015 bei chronischen Nierenerkrankungen eine signifikante Reduktion von Apo AI-Konzentrationen nachgewiesen werden.

Zusammenfassend sollten daher die Apo AI, AIV, CIII,  $\beta$ 2GP1, LCAT sowie Clusterin als potentielle Frühmarker in Betracht gezogen werden.

#### 5.4.3 Zellbestandteile

Leider ist es allein mit den im Rahmen dieser Arbeit erlangten massenspektrometrischen Ergebnissen, nicht möglich, die Herkunft dieser Proteine einem bestimmten Gewebe oder Organ zuzuordnen, jedoch eignen sie sich durch ihre oft eindeutigen Ratios als Surrogat-Markerkandidaten.

Einen der höchsten Anstiege während der präklinischen Phase der Erkrankung in der Gruppe P im Vergleich zur Gruppe WT beschreibt eine Fraktion des Chemorezeptors **Vom**. Er ist Mitglied einer Rezeptorfamilie die hauptsächlich im olfaktorischen System exprimiert wird, aber auch in der Niere und anderen Geweben nachgewiesen werden konnte (Zhang et al. 2010). Durch seine stark positive Ratio in Woche 4,5 und die ebenfalls stark ausgeprägte Gegenregulation durch Ramipril, ist dieses Protein eindeutig ein Biomarkerkandidat. Allerdings bedarf es weiterführend der genauen molekularen Charakterisierung der speziellen stark erhöhten Proteoform.

Als Indikatoren für die Zellteilungsrate im Organismus lassen sich der Transkriptionsfaktor **Zinkfingerprotein 758** sowie die **Superoxid-Dismutase** interpretieren.

Das **Coiled-Coil-Domäne enthaltende Protein 158** zeigt sich in der präklinischen Phase der Erkrankung mit einer deutlich niedrigeren Konzentration in den Tieren der Gruppe P im Vergleich zur Gruppe WT. Nach der Behandlung mit Ramipril lässt sich hier eine positive Ratio für Ram/P beobachten. In Woche 6 verhält sich dieses Protein komplett gegensätzlich zur Initialphase des AS. In Woche 7,5 wiederum zeigt sich erneut, wie bereits in Woche 4,5 eine niedrigere Konzentration bei P, verglichen mit Gruppe WT.

Die Konzentration der **Carboanhydrase 14** weist über den gesamten untersuchten Krankheitsverlauf hinweg stets geringere Konzentrationen in den Proben der Gruppe P im Vergleich zu denen der Gruppe WT auf, am deutlichsten jedoch bei Woche 6. Unter der Gabe von Ramipril zeigt sich in jeder Phase eine positive Ratio Ram/P.

Die Carboanhydrase 14 ist ein membran-assoziiertes Enzym, dessen Aufgabe in der Hydratisierung von Kohlenstoffdioxid zu Kohlensäure und der entsprechenden Umkehrreaktion besteht. Bei Mäusen findet die Genexpression der Carboanhydrase 14 vorrangig im proximalen Tubulus der Nieren und dem Herzen statt, gefolgt von der Skelettmuskulatur, dem Gehirn, der Lunge und Leber (Mori et al. 1999). Sie spielt eine entscheidende Rolle für den Säure-Base-Haushalt der Niere, indem sie dort die Rückresorption von Hydrogencarbonat aus dem proximalen Tubulus reguliert. Ohne den suffizienten Ablauf dieses Vorganges entstünde eine Azidose durch einen erhöhten Bicarbonatverlust. Dieses Enzym ist im gesamten Verlauf der Erkrankung im Blut dauerhaft erniedrigt im Vergleich zu den Konzentrationen der gesunden Individuen, was, wenn es gleichbleibende Leakage-Raten aufweist, für eine zunehmend eingeschränkte Funktion des proximalen Tubulus sprechen könnte.

#### 5.4.4 EZM Komponenten

Es konnten mehrere Proteine identifiziert werden, deren erhöhte Präsenz im Blut für einen vermehrten Umsatz innerhalb der EZM sprechen könnte.

Die Konzentrationen von **Fibronektin** sind bereits ab Woche 4,5 über den gesamten untersuchten Krankheitsverlauf hinweg in den Proben der Gruppe P gegenüber WT erhöht, wobei sich ein Maximum in Woche 6 darstellt.

Fibronektin ist ein Glykoprotein der EZM und stellt einen ihrer Hauptbestandteile dar. Es ist u.a. verantwortlich für Gewebereparaturen, Gewebefibrose, Angiogenese und Zellmigration (White und Muro 2011). Die Tatsache, dass die stärkste Erhöhung für Fibronektin in Woche 6 gefunden wurde, könnte als ein Zeichen für eine hohe Aktivität stattfindender EZM-Reparaturvorgänge während dieser Krankheitsphase gedeutet werden.

Auch die **Isoform 3 der Sulfhydryl-Oxidase 1** (QSOX1) ist in den Tieren der Gruppe P bereits im Alter von 4,5 Wochen mit einer positiven Ratio P/WT vertreten und wird deutlich medikamentös beeinflusst. Dieses Protein zeigt offenbar in Woche 6 keinen Konzentrationsunterschied zu WT jedoch in Woche 7,5 die höchste positive Ratio P/WT. Allerdings ist hier ein geringerer Einfluss durch Ramipril zu beobachten.

Dieses Enzym ist essenziell für den stabilen Einbau von Laminin in die EZM (Ilani et al. 2013). Diese Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass bei geringerem Spiegel von QSOX1 die Zell-Matrix-Adhäsion negativ beeinflusst wird. In dieser Untersuchung zeigt sich ein direkter Zusammenhang von einem geringeren Lamininanteil in der EZM bei einem niedrigen QSOX1-Spiegel. Da das Enzym in direktem Bezug zum Aufbau der GBM steht, ist es als möglicher Frühmarker unbedingt in Betracht zu ziehen.

Für das **Leucin-reiche-HEV-Glykoprotein** (LRHEV) konnten über den gesamten untersuchten Krankheitsverlauf hinweg höhere Konzentrationen in den Proben der Gruppe P im Vergleich zu denen der Gruppe WT nachgewiesen werden. Während die mittleren Ratios für P/WT mit zunehmendem Alter steigen, sinken die Ratios P/Ram und verhalten sich somit exakt gegenläufig. Damit stellt sich offenbar ein mit dem Alter sinkender Einfluss der Ramipriltherapie auf die Konzentration des LRHEV dar.

Das LRHEV ist ein Bestandteil des Transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ )-Signalweges. TGF $\beta$  ist ein wichtiges Zytokin bei chronischen Nierenerkrankungen, denn es wird als Antwort auf Verletzungen der Niere von deren Tubuluszellen synthetisiert (Kanwar 2012). Die stetig erhöhten Konzentrationen des LRHEV bei den Tieren der Gruppe P über alle Krankheitsphasen hinweg kann somit mit der im Verlauf steigenden Ausschüttung von TGF $\beta$

aufgrund fortschreitender Schädigung der Tubuli in Zusammenhang gebracht werden. Damit und vor allem durch die Tatsache, dass es bereits ab Woche 4,5 mit positiver Ratio gefunden wurde, wäre dieses Protein als präklinischer Krankheitsmarker geeignet.

Ausschließlich in der präklinischen Phase des AS konnte eine positive Ratio für die **Isoform 2 der Kollagen- $\alpha$ 1(I)-Kette** (COL $\alpha$ 1) gefunden werden. Die mittlere Ratio P/Ram von 35,7 spricht für eine stark ausgeprägte Gegenregulation durch die Gabe von Ramipril. Wie eingangs erläutert, behält die GBM bei AS-Patienten die fetale Verteilung von  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 2-Kollagenketten bei. Der Nachweis einer Konzentrationsänderung von Peptiden dieser Ketten in Woche 4,5 zeigt einen im Vergleich zur Gruppe WT erhöhten Umsatz der  $\alpha$ 1-Kette im erkrankten Organismus an. In den weiteren untersuchten Krankheitsphasen konnte es allerdings nicht in veränderter Konzentration gefunden werden. Aber gerade durch seine Präsenz am Beginn der Pathogenesekette eignet es sich als präklinischer Marker.

Alle gefundenen Bestandteile von **Inter-Alpha-Trypsin Inhibitoren (IATI) (AMBP, HCH1, HCH2)** zeigen in Woche 4,5 einen synergistischen Anstieg in den gleichen Subfraktionen der Proben von Gruppe P. Besonders für HCH2 wird auch eine starke Beeinflussung durch den angewendeten ACE-Hemmer deutlich. In Woche 6 waren lediglich für AMBP und HCH1 Konzentrationsänderungen im Vergleich der Gruppen P und WT nachweisbar. In der letzten untersuchten Krankheitsphase sind wieder alle drei von uns nachgewiesenen Ketten der IATI mit positiven Ratios P/WT vertreten. Dabei zeigen sich für HCH1 und HCH2 die höchsten, und für AMBP die geringsten Konzentrationsunterschiede zu WT. Damit konnten in allen Altersgruppen alterierte Ketten des IATI nachgewiesen werden. Alle drei von uns nachgewiesenen Komponenten reagieren in den gleichen Subfraktionen in vergleichbarem Ausmaß mit einem Rückgang durch die Gabe von Ramipril.

IATI ist eine heterogene Gruppe von in der EZM und auch im Blut auftretenden Proteinen. Sie bestehen stets aus jeweils einer leichten Kette, beispielsweise aus der AMBP-Gruppe, und einer oder zwei schweren Ketten (Zhuo und Kimata 2008). IATI bilden in der EZM verschiedener Gewebe einen Hyaluronan-assoziierten Proteinkomplex (Zhuo et al. 2004). Die Zellen der proximalen Tubuli der Nieren sind umgeben von Hyaluronan-Strängen, die mit verschiedenen EZM-Proteinen, unter ihnen der oben vorgestellte Typ IATI, ein funktionelles Netzwerk bilden (Selbi et al. 2006). Darüber hinaus zeigt dieser IATI antiproteolytische Aktivität durch die Interaktion mit verschiedenen Komplementfaktoren, beispielsweise

durch die Suppression der C5-Aktivierung (Zhuo und Kimata 2008). Durch die katalytischen Eigenschaften und sein vermehrtes Auftreten, könnte dieser Komplex eine Erkrankung des Nierengewebes widerspiegeln. Weiterhin sind AMBP und HCH2 als negative APP in Ratten und Menschen bekannt (Daveau et al. 1998; Daveau et al. 1993). Folglich könnte eine erhöhte Konzentration dieser Ketten nicht die Reaktion der Leber sondern ihre Freisetzung aus der renalen EZM während deren Umbau anzeigen. Die dargestellten Konzentrationsänderungen in den Tieren der Gruppe P könnten entweder durch eine erhöhte Expression während der fokalen Akute-Phase-Reaktion oder eine vermehrte proteolytische Freisetzung bedingt sein. Außerdem besteht für den beschriebenen IATI ein Zusammenhang mit fibrotischen Gewebeveränderungen (Garantziotis et al. 2008). Aus diesen Gründen sind AMBP, HCH1 und HCH2 als potentielle Marker für das AS zu betrachten.

## **5.5 Biomarkerkandidaten**

Nach Auswertung und Interpretation der Ergebnisse, können 25 Biomarkerkandidaten vorgeschlagen werden, die sich durch eindeutige Ausrichtung ihrer Konzentrationsänderung, das Auftreten bereits in der präklinischen Krankheitsphase und eine gegenläufige Regulation unter Ramipril auszeichnen.

Dazu zählen Proteine, die ausschließlich im Alter von 4,5 Wochen erhöhte Konzentrationen in den Tieren der Gruppe P im Vergleich zur Gruppe WT aufweisen, wie Retinol-bindendes Protein 4, Serum-Amyloid P, HMW Kininogen II, LCAT, Clusterin, BHSM1 sowie COL $\alpha$ 1. Aber auch Proteine, die über den gesamten untersuchten Krankheitsverlauf, oder zumindest über zwei beobachtete Altersgruppen hinweg, mit ansteigenden Konzentrationen bei AS-unbehandelten-Mäusen nachgewiesen werden konnten, sind in Betracht zu ziehen. Dazu gehören Hämopectin, Haptoglobin, Angiotensinogen, Transferrin, Apo A I, Apo A IV, Apo CIII,  $\beta$ 2GP1, Komplementfaktor H, Fibronectin, QSOX1, LRHEV, Bestandteile des IATI-Komplexes (AMBP, HCH1, HCH2) und der Vom. Abschließend müssen das Zinkfingerprotein 758 und die Superoxid-Dismutase erwähnt werden, die ab Woche 4,5 in verschiedenen Krankheitsphasen mit jeweils gegenläufigen Quotienten gefunden wurden.

Trotz der oben genannten Indizien, sind sie bisher noch immer lediglich als Markerkandidaten zu betrachten, denn ihr tatsächlicher diagnostischer Wert muss zunächst

durch weitere Validierungsschritte mit großen Probenanzahlen humaner Proben belegt werden. Um in der präklinischen Diagnostik des AS eingesetzt werden zu können, muss im weiteren Verlauf ihre diagnostische Sensitivität und Spezifität nachgewiesen werden. Ihr Vorkommen muss spezifisch für das AS sein und die Identifikation von AS-Patienten aus einer Gruppe von gesunden Patienten bzw. Patienten mit anderen chronischen Nierenerkrankungen zulassen.

## 6 Schlussfolgerung

Die Analyse der Maus-Serum-Proben des AS-Mausmodels COL4A3<sup>-/-</sup> ergab 25 Biomarkerkandidaten.

Proteine, deren Konzentration sich in kranken im Vergleich zu gesunden Individuen, vor allem in der präklinischen Phase der Erkrankung, unterscheidet, eignen sich besonders für die Früherkennung des AS. Zu ihnen gehören Retinol-bindendes Protein 4, Serum-Amyloid P, HMW Kininogen II, LCAT, Clusterin, BHSM1 sowie COL $\alpha$ 1.

Einige der Biomarkerkandidaten, wie Hämopexin, Haptoglobin, Angiotensinogen, Transferrin, Apo AI, Apo AIV, Apo CIII,  $\beta$ 2GP1, Komplementfaktor H, Fibronectin, QSOX1, LRHEV, Bestandteile des IATI-Komplexes (AMBP, HCH1, HCH2), Vom, Zinkfingerprotein 758 und die Superoxid-Dismutase wurden in mindestens zwei der untersuchten Krankheitsphasen mit veränderten Konzentrationen gefunden. Diese können daher nicht nur vorrangig der Früherkennung des AS, sondern vor allem der Bewertung des Krankheitsverlaufes und der Klärung des zugrundeliegenden Pathomechanismus, dienen.

Im weiteren Verlauf müssen die genannten Biomarkerkandidaten mittels Immuntesten und möglichst mit humanen Proben validiert werden, um zu prüfen, inwieweit sie sich tatsächlich als präklinische Marker für das AS eignen (siehe Kapitel 2.5.3, Abb. 1).

## 7 Literaturverzeichnis

Abbate, M. and G. Remuzzi (2003). "Renoprotection: Clues from knockout models of rare diseases." *Kidney International* 63(2): 764-766.

Alport, A. (1927). "Hereditary familial congenital hemorrhagic nephritis." *The British Medical Journal* 1: 504-506.

Amara, U., et al. (2010). "Molecular Intercommunication between the complement and coagulation systems." *The Journal of Immunology* 185(9): 5628-5636.

Angel, T. E., et al. (2012). "Mass spectrometry-based proteomics: Existing capabilities and future directions." *Chemical Society Review* 41: 3912-3928.

Appel, G. B., et al. (2005). "Membranoproliferative glomerulonephritis type II (Dense deposit disease): An update." *Journal of the American Society of Nephrology* 16(5): 1392-1403.

Arrondel, C., et al. (2004). "A large tandem duplication within the COL4A5 gene is responsible for the high prevalence of alport syndrome in french polynesia." *Kidney International* 65: 2030-2040.

Artuso, R., et al. (2012). "Advances in alport syndrome diagnosis using next-generation sequencing." *European Journal of Human Genetics* 20: 50-57.

Attman, P.-O., et al. (2011). "The effect of decreasing renal function on lipoprotein profiles." *Nephrology Dialysis Transplantation* 26(8): 2572-2575.

Bachmann, H. J. (1979). *Nierenbiopsie bei Kindern*. Berlin Heidelberg New York, Springer-Verlag.

Bae, E. H., et al. (2015). "Characterization of the intrarenal renin-angiotensin system in experimental alport syndrome." *The American Journal of Pathology* 185(5): 1423-1435.

Bakker, W., et al. (2005). "Protease activity of plasma hemopexin." *Kidney International* 68(2): 603-610.

Barthel, D., et al. (2012). "Plasminogen is a complement inhibitor." *The Journal of Biological Chemistry* 287(22): 18831-18842.

Baum, A., et al. (2008). "Searching biomarker candidates in serum using multidimensional native chromatography." *Journal of Chromatography B* 876: 31-40.

Berg, J., et al. (2013). *Biochemie*. Berlin Heidelberg, Springer Spektrum.

Cabré, A., et al. (2007). "Retinol-binding protein 4 as a plasma biomarker of renal dysfunction and cardiovascular disease in type 2 diabetes." *Journal of Internal Medicine* 262: 496-503.

Calabresi, L., et al. (2015). "Acquired lecithin-cholesterol acyltransferase deficiency as a major factor in lowering plasma HDL levels in chronic kidney disease." *Journal of Internal Medicine* 277(5): 552-561.

Cheung, P. K., et al. (2000). "Induction of experimental proteinuria in vivo following infusion of human plasma hemopexin." *Kidney International* 57(4): 1512-1520.

Collinsova, M., et al. (2006). "Inhibition of betaine-homocysteine S-methyltransferase causes hyperhomocysteinemia in mice." *The Journal of Nutrition* 136(6): 1493-1497.

Cosgrove, D., et al. (1996). "Collagen COL4A3 knockout: A mouse model for autosomal alport syndrome." *Genes and Development* 10: 2981-2992.

D'Armiento, J., et al. (1997). "Tissue, temporal and inducible expression pattern of haptoglobin in mice." *Gene* 195(1): 19-27.

Daveau, M., et al. (1998). "Hepatic and extra-hepatic transcription of inter-alpha-inhibitor family genes under normal or acute inflammatory conditions in rat." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 350(2): 315-323.

Daveau, M., et al. (1993). "Human inter-alpha-inhibitor family in inflammation: Simultaneous synthesis of positive and negative acute-phase proteins." *Biochemical Journal* 292(2): 485-492.

Delobel, J., et al. (2010). "Biomarker analysis of stored blood products: Emphasis on pre-analytical issues." *International Journal of Molecular Sciences*(11): 4601-4617.

Flaig, M. J. and R. C. Krieg (2005). *Proteomics: Die Zukunft hat schon begonnen. Fortschritte der praktischen Dermatologie und Venerologie*, Springer. 19: 90-95.

Foley, R. N., et al. (1998). "Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease." *American Journal of Kidney Disease* 32(5): S112-S119.

Gabay, C. and I. Kushner (1999). "Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation." *New England Journal of Medicine* 340(6): 448-454.

Garantziotis, S., et al. (2008). "Serum inter-alpha-trypsin inhibitor and matrix hyaluronan promote angiogenesis in fibrotic lung injury." *American Journal of respiratory and critical care medicine* 178(9): 939-947.

Gehrs, K. M., et al. (2006). "Age-related macular degeneration - Emerging pathogenetic and therapeutic concepts." *Annals of Medicine* 38(7): 450-471.

Gilmore, T., et al. (1996). "Rel/NF-kappaB/IkappaB proteins and cancer." *Oncogene* 13(7): 1367-1378.

Go, A. S., et al. (2004). "Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization." *New England Journal of Medicine* 351(13): 1296-1305.

Gross, O. (2012). "Alport-Syndrom und Syndrom der dünnen Basalmembran - Update 2012." *Der Nephrologe* 7(6): 511-514.

Gross, O., et al. (2003). "Preemptive ramipril therapy delays renal failure and reduces renal fibrosis in COL4A3-knockout mice with alport syndrome." *Kidney International* 63: 438-446.

Gross, O., et al. (2009). "Stem cell therapy for alport syndrome: The hope beyond the hype." *Nephrology Dialysis Transplantation* 24(3): 731-734.

Gross, O., et al. (2012). "Safety and efficacy of the ACE-inhibitor ramipril in alport syndrome: The double-blind, randomized, placebo-controlled, multicenter phase III EARLY PRO-TECT alport trial in pediatric patients." *ISRN Pediatrics* 2012: 1-6.

Gross, O., et al. (2005). "Nephroprotection by antifibrotic and anti-inflammatory effects of the vasopeptidase inhibitor AVE7688." *Kidney International* 68(2): 456-463.

Gross, O., et al. (2012). "Early angiotensin-converting enzyme inhibition in alport syndrome delays renal failure and improves life expectancy." *Kidney International* 81: 494-501.

Gross, O., et al. (2004). "Antifibrotic, nephroprotective potential of ACE inhibitor vs AT1 antagonist in a murine model of renal fibrosis." *Nephrology Dialysis Transplantation* 19: 1716-1723.

Gubler, M.-C. (2007). "Inherited diseases of the glomerular basement membrane." *Nature Clinical Practice Nephrology* 4(1): 24-37.

Guijarro, C. and J. Egido (2001). "Transcription factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and renal disease." *Kidney International* 59(2): 415-424.

Hertz, J. M. (2009). "Alport syndrome - Molecular genetic aspects." *Danish Medical Bulletin* 56: 105-152.

Holers, V. M. (2014). "Complement and its receptors: New insights into human disease." *Annual Review of Immunology* 32: 433-459.

Hsieh, T.-J., et al. (2002). "High glucose stimulates angiotensinogen gene expression via reactive oxygen species generation in rat kidney proximal tubular cells." *Endocrinology* 143(8): 2975-2985.

Hu, Q., et al. (2005). "The orbitrap: A new mass spectrometer." *Journal of Mass Spectrometry* 40(4): 430-443.

Hudson, B. G., et al. (2003). "Alport's syndrome, goodpasture's syndrome, and type IV collagen." *The new england journal of medicine* 348(25): 2543-2556.

Ilani, T., et al. (2013). "A secreted disulfide catalyst controls extracellular matrix composition and function." *Science* 341(6141): 74-76.

Ji, C., et al. (2007). "Mechanisms of protection by the betaine-homocysteine methyltransferase/betaine system in HepG2 cells and primary mouse hepatocytes." *Hepatology* 46(5): 1586-1596.

Jung, G.-S., et al. (2014). "Clusterin/apolipoprotein J attenuates angiotensin II-induced renal fibrosis." *PLOS ONE* 9(8): 1-11.

Kakoki, M. and O. Smithies (2009). "The kallikrein-kinin system in health and in diseases of the kidney." *Kidney International* 75: 1019-1030.

Kalmovarin, N., et al. (1991). "Extrahepatic expression of plasma protein genes during inflammation." *Inflammation* 15(5): 369-379.

Kanwar, Y. S. (2012). "TGF $\beta$  and renal fibrosis - A pandora's box of surprises." *The American Journal of Pathology* 181(4): 1147-1150.

Kapojos, J., et al. (2003). "Production of hemopexin by TNF-alpha stimulated human mesangial cells." *Kidney International* 63(5): 1681-1686.

Kashtan, C. E., et al. (2013). "Clinical practice recommendations for the treatment of alport syndrome: A statement of the alport syndrome research collaborative." *Pediatric Nephrology* 28: 5-11.

Katayama, K., et al. (2008). "Irradiation prolongs survival of alport mice." *Journal of the American Society of Nephrology* 19(9): 1692-1700.

Katayama, K., et al. (2014). "Searching for a treatment for alport syndrome using mouse models." *World Journal of Nephrology* 3(4): 230-236.

Khalil, H. M., et al. (2015). "Retinol binding protein-4 levels in early diabetic nephropathy in egyptian patients with type 2 diabetes." *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry* 10(1): 39-46.

Kreusch, S., et al. (2008). "Searching biomarker candidates in serum using multidimensional native chromatography - 1. Enhanced separation method." *Journal of Chromatography B* 875: 567-572.

Kruegel, J., et al. (2012). "Alport syndrome: Insights from basic and clinical research." *Nature Reviews Nephrology* 9: 170-178.

Lähteenmäki, K., et al. (2000). "Plasminogen activation in degradation and penetration of extracellular matrices and basement membranes by invasive bacteria." *Methods* 21(2): 125-132.

Lee, F. T. H., et al. (2004). "Interactions between angiotensin II and NF- $\kappa$ B-dependent pathways in modulating macrophage infiltration in experimental diabetic nephropathy." *Journal of the American Society of Nephrology* 15(8): 2139-2151.

Lees, G. E., et al. (1997). "Glomerular ultrastructural findings similar to hereditary nephritis in 4 english cocker spaniels." *Journal of Veterinary Internal Medicine* 11(2): 80-85.

Lemmink, H. H., et al. (1994). "Mutations in the type IV collagen  $\alpha$ 3 (COL4A3) gene in autosomal recessive alport syndrome." *Human Molecular Genetics* 3(8): 1269-1273.

Lemmink, H. H., et al. (1997). "The clinical spectrum of type IV collagen mutations." *Human mutation*(9): 477-499.

Lennon, R., et al. (2008). "Hemopexin induces nephrin-dependent reorganization of the actin cytoskeleton in podocytes." *Journal of the American Society of Nephrology* 19(11): 2140-2149.

Levey, A. S., et al. (2003). "National kidney foundation practice guidelines for chronic kidney disease: Evaluation, classification, and stratification." *Annals of Internal Medicine* 139(2): 137-147.

Longo, I., et al. (2002). "COL4A3/COL4A4 mutations: From familial hematuria to autosomal-dominant or recessive alport syndrome." *Kidney International* 61: 1947-1956.

Lottspeich, F. and H. Zorbas (1998). *Bioanalytik*. Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag GmbH.

Lundberg, S., et al. (2012). "Impact of the apolipoprotein B/apolipoprotein A-I ratio on renal outcome in immunoglobulin A nephropathy." *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology* 46(2): 148-155.

Makarov, A. (2000). "Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis." *Analytical Chemistry* 72(6): 1156-1162.

Mathur, A. and E. L. Herzog (2012). "Sticking it to fibrocytes with serum amyloid P." *Journal of Leukocyte Biology* 92(4): 693-694.

Matsusaka, T., et al. (2012). "Liver angiotensinogen is the primary source of renal angiotensin II." *Journal of the American Society of Nephrology* 23(7): 1181-1189.

Mori, K., et al. (1999). "Isolation and characterization of CA XIV, a novel membrane-bound carbonic anhydrase from mouse kidney." *The Journal of Biological Chemistry* 274(22): 15701-15705.

Muckova, P., et al. (2015). "Preclinical alterations in the serum of COL(IV)A3-/- mice as early biomarkers of alport syndrome." *Journal of Proteome Research* 14(12): 5202-5214.

- Nagel, M., et al. (2005). "Novel COL4A5, COL4A4, and COL4A3 mutations in alport syndrome." *Human mutation* 26(1).
- Netzer, K.-O., et al. (1997). "Alport syndrome: Clinical and genetic correlation in a type-IV collagen disease " 122: 116-123.
- Nielsen, C. (1977). "Lenticonus anterior and alport's syndrome." *Acta Ophthalmologica* 56(4): 518-530.
- Niessen, W. M. (2006). *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry*. Boca Raton, Taylor and Francis Group.
- Ninichuk, V., et al. (2006). "Multipotent mesenchymal stem cells reduce interstitial fibrosis but do not delay progression of chronic kidney disease in collagen 4A3-deficient mice." *Kidney International* 70(1): 121-129.
- Noris, M. and G. Remuzzi (2008). "Translational mini-review series on complement factor H: Therapies of renal diseases associated with complement factor H abnormalities: Atypical haemolytic uraemic syndrome and membranoproliferative glomerulonephritis." *Clinical and Experimental Immunology* 151(2): 199-209.
- Pickering, M. C. and H. T. Cook (2008). "Translational mini-review series on complement factor H: Renal diseases associated with complement factor H: Novel insights from humans and animals." *The Journal of Translational Immunology* 151(2): 210-230.
- Pirson, Y. (1999). "Making the diagnosis of alport's syndrome." *Kidney International* 56: 760-775.
- Pozniak, B. P. and R. B. Cole (2007). "Current measurements within the electrospray emitter." *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 18(4): 737-748.
- Ptolemy, A. and N. Rifai (2010). "What is a biomarker? Research investments and lack of clinical integration necessitate a review of biomarker terminology and validation schema." *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 70(242): 6-14.
- Rader, D. J., et al. (1994). "Markedly accelerated catabolism of apolipoprotein A-II (ApoA-II) and high density lipoproteins containing ApoA-II in classic lecithin: Cholesterol acyltransferase deficiency and fish-eye disease." *The Journal of Clinical Investigation* 93(1): 321-330.
- Razzaq, S. (2006). "Hemolytic uremic syndrome: An emerging health risk." *American Family Physician* 76(6): 991-996.
- Reich, H., et al. (2005). "Albumin activates ERK via EGF receptor in human renal epithelial cells." *Journal of the American Society of Nephrology* 16(5): 1266-1278.

Rye, K.-A. and P. J. Barter (2004). "Formation and metabolism of prebeta-migrating, lipid-poor apolipoprotein A-I." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24: 421-428.

Sachetelli, S., et al. (2006). "RAS blockade decreases blood pressure and proteinuria in transgenic mice overexpressing rat angiotensinogen gene in the kidney." *Kidney International* 69(6): 1016-1023.

Schrödl, W., et al. (2016). "Acute phase proteins as promising biomarkers: Perspectives and limitations for human and veterinary medicine." *Proteomics - Clinical Applications* 10(11): 1077-1092.

Schultz, K. R., et al. (2006). "Toward biomarkers for chronic graft-versus-host disease: National institutes of health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: III. Biomarker working group report." *Biology of Blood and Marrow Transplantation*(12): 126-137.

Selbi, W., et al. (2006). "Characterization of hyaluronan cable structure and function in renal proximal tubular epithelial cells." *Kidney International* 70(7): 1287-1295.

Stangl, S., et al. (2015). "Association between apolipoprotein A-IV concentrations and chronic kidney disease in two large population-based cohorts: Results from the KORA studies." *Journal of Internal Medicine* 278(4): 410-423.

Stenson, P. D., et al. (2003). "Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 Update." *Human mutation* 21(6): 577-581.

Stevens, P. E. and A. Levin (2013). "Evaluation and management of chronic kidney disease: Improving global outcomes 2012 clinical practice guideline." *Annals of Internal Medicine* 158(11): 825-830.

Storey, H., et al. (2013). "COL4A3/COL4A4 mutations and features in individuals with autosomal recessive alport syndrome." *Journal of the American Society of Nephrology* 24(12): 1945-1954.

Sugimoto, H., et al. (2006). "Bone-marrow-derived stem cells repair basement membrane collagen defects and reverse genetic kidney disease." *103(19): 7321-7326.*

Sunden, S. L. F., et al. (1997). "Betaine-homocysteine methyltransferase expression in porcine and human tissues and chromosomal localization of the human gene." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 345(1): 171-174.

Temme, J., et al. (2012). "Incidence of renal failure and nephroprotection by RAAS inhibition in heterozygous carriers of X-chromosomal and autosomal recessive alport mutations." *Kidney International* 81: 779-783.

Tran, J. C., et al. (2011). "Mapping intact protein isoforms in discovery mode using top-down proteomics." *Nature* 480: 254-258.

Tsujita, M., et al. (2005). "On the hepatic mechanism of HDL assembly by the ABCA1/apoA-I pathway." *The Journal of Lipid Research* 46: 154-162.

Vaziri, N. D., et al. (1999). "Hepatic HDL receptor, SR-B1 and Apo A-I expression in chronic renal failure." *Nephrology Dialysis Transplantation* 14(6): 1462-1466.

Veidal, S. S., et al. (2011). "Assessment of proteolytic degradation of the basement membrane: A fragment of type IV collagen as a biochemical marker for liver fibrosis." *Fibrogenesis & Tissue Repair* 4(22): 1-11.

Vergés, B., et al. (2012). "Retinol-binding protein 4 is an independent factor associated with triglycerides and a determinant of very low-density lipoprotein-apolipoprotein B100 catabolism in type 2 diabetes mellitus." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 32(12): 3050-3057.

Weinhäusel, A. and U. Giese (2014). "Biomarker-Entwicklung: Von der Identifikation bis zu der Validierung." <http://www.git-labor.de>.

Wendler, S., et al. (2013). Automated native sample preparation for proteome analysis. *Automation Systems of the 21th Century*. D. Arent and M. Freebush. New York, Nova Science Publishers: 1-50.

White, E. S. and A. F. Muro (2011). "Fibronectin splice variants: Understanding their multiple roles in health and disease using engineered mouse models." *IUBMB Life* 63(7): 538-546.

Williams, K. T. and K. L. Schalinske (2010). "Homocysteine metabolism and its relation to health and disease." *BioFactors* 36(1): 19-24.

Yamashita, M. and J. B. Fenn (1984). "Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme." *The Journal of Physical Chemistry* 88(20): 4451-4459.

Yang, J. and B. Zhang (2015). "Value of determination of haptoglobin and  $\alpha$ 1-antitrypsin in predicting response to glucocorticoid therapy in children with primary nephrotic syndrome." *Chinese Journal of Contemporary Pediatrics* 17(3): 227-231.

Yao, X.-d., et al. (2012). "Challenge in pathologic diagnosis of alport syndrome: Evidence from correction of previous misdiagnosis." *Orphanet Journal of Rare Diseases* 100(7): 1-8.

Ying, J., et al. (2012). "Overexpression of mouse angiotensinogen in renal proximal tubule causes salt-sensitive hypertension in mice." *American Journal of Hypertension* 25(6): 684-689.

Yoshioka, K., et al. (1994). "Normal distribution and abnormalities in x-linked alport syndrome revealed by monoclonal antibody." *American Journal of Pathology* 144: 986-996.

Zeisberg, M., et al. (2006). "Stage-specific action of matrix metalloproteinases influences progressive hereditary kidney disease." *PLOS Medicine* 3(4): e100.

Zhang, X., et al. (2010). "High-throughput microarray detection of vomeronasal receptor gene expression in rodents." *Frontiers in Neuroscience* 4(164): 1-20.

Zhuo, L., et al. (2004). "Inter-alpha-trypsin inhibitor, a covalent proteoglycosaminoglycan-protein complex." *The Journal of Biological Chemistry* 279(37): 38079-38082.

Zhuo, L. and K. Kimata (2008). "Structure and function of inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chains." *Connective Tissue Research* 49(5): 311-320.

## 8 Anhang

**Tab. 11: Serumproteine mit mehreren gegenläufigen Clustern in AS-Mäusen und ihre Beeinflussung durch Ramipril (einschließlich zusätzlicher Daten)**

	hoch in AS (P/WT) oder unter Ramipriltherapie (Ram/P)
	hoch in AS (WT/P <sup>l</sup> ) oder unter Ramipriltherapie (P/Ram <sup>l</sup> )

### Legende:

Anzahl der Cluster/Fraktionen	„Cluster“ beschreibt die erkennbare Häufung (benachbarte Fraktionen in der 2D-Matrix, in denen das gleiche Protein in gleicher Änderungsrichtung identifiziert wurde, mit max. Abstand von 3 1D-Fraktionen und 6 2D-Fraktionen) „Fraktionen“ beschreibt die Gesamtanzahl der 2D-Fraktionen, die das betreffende Protein in den analysierten Clustern enthalten
Mittlere Ratio P/WT	Mittelwert der Ratio P/WT in allen gleichsinnigen Clustern enthaltenen Fraktionen; Entspricht dem Faktor der Erhöhung (Ratio >1) bzw. der Verminderung (<1) in AS-Mäusen gegenüber WT
Mittlere Ratio P/Ram	Die Ratio Ram/P beschreibt den Effekt von Ramipril im Vergleich zu unbehandelten AS-Mäusen. Hier wurde jedoch der Kehrwert des Mittelwertes der Ratio Ram/P in Fraktionen mit gleichsinnigen Clustern zur Verdeutlichung des Faktors der Änderung unter Ramipriltherapie gebildet; cave: Bei Reduzierung der Serumkonzentration eines Proteins in AS-Mäusen unter Ramipriltherapie gegenüber untherapierten Mäusen wird deshalb hier eine Ratio >1, bei Erhöhung eine Ratio <1 angezeigt. Der Kehrwert wurde gebildet, um den numerischen Wert der gegenläufigen Änderung unter Ramipriltherapie direkt mit der Änderung in P gegenüber WT vergleichen zu können.
Peptide	Anzahl gefundener unikater Peptide
Frames	Definierter rechteckiger Bereich in der m/z-Retentionszeit Ebene
Hits	Jedes identifizierte Peptid, auch identische, mehrmals gefundene, die einer Gruppe oder Untergruppe von Massewerten entsprechen, werden zu einem Hit zusammengefasst

Protein ID	Proteinkette	Sieve Version	Alter in Wochen	Anzahl der Cluster/ Fraktionen	Mittlere Ratio Abweichung in AS	Mittlere Ratio Abweichung Unter Ramipril	Peptide	Frames	Hits	Fraktion 1D_2D
Plasmaproteine										
P32261	Antithrombin III	2.0	6.0	1/9	10.2	0.8	1	1	2	31_16
							2	2	2	32_17
							1	1	1	33_20
							2	2	4	34_17
		2.0	7.5	1/16	2.5	23.4	2	2	9	32_15
							1	1	2	33_12
							2	2	4	33_14
							1	1	2	34_11
							1	2	3	34_13
							4	4	11	34_15
E9Q939	Serotransferrin	2.0	4,5	2/5	12,4	2,3	3	3	12	35_16
							1	1	2	36_15
							2	2	2	36_17
							1	1	1	25_02
							1	1	1	32_03
							3	5	22	33_02
Q92111	Serotransferrin	2.0	4,5	1/2	40,7	4,5	1	1	2	33_02
							1	1	3	34_01
		2.0	7,5	1/2	7,9	-	1	1	2	33_01
							1	1	2	34_02
E9Q2Q7	Serotransferrin (Fragment)	2.0	4,5	2/13	19,7	13,3	1	1	2	18_01
							1	1	2	20_01
							1	1	1	20_26
							1	1	2	22_01
							1	1	2	22_20
							1	1	1	23_02
							6	8	19	29_19
							3	3	7	32_20
							2	3	6	33_00
							2	2	8	33_02
							3	4	20	34_03
							3	4	25	36_01
							2	3	5	38_00
		2.0	7,5	4/20	1,2	8,8	1	2	13	31_01
							6	8	35	31_18
							2	2	8	32_04
							5	5	21	32_22
							1	1	1	33_08
							9	12	35	12_25
							4	4	11	12_31
							3	3	5	19_24
							5	6	31	24_23
							3	3	8	25_24
							5	6	15	26_23
							5	9	18	33_01
							2	3	9	33_18
6	8	37	34_02							
2	2	10	35_18							
2	3	10	36_02							
1	1	3	36_21							
1	2	10	37_01							
1	2	8	37_03							

F7BAE9	Serotransferrin (Fragment)	2.0	6,0	3/15	2,5	20,9	1	1	1	37_20
							1	1	2	22_21
							1	1	1	30_01
							2	3	16	31_02
							2	2	4	33_14
							1	1	4	34_01
							3	3	6	34_03
		1	1	2	35_10					
		1	1	1	36_01					
		2.0	7,5	3/18	1,9	1,9	1	1	5	32_22
							1	1	2	34_15
							5	9	43	12_25
							3	3	12	12_31
							1	1	6	20_23
							2	3	11	21_22
							4	6	27	24_23
							3	3	6	26_23
							1	1	1	27_24
							2	2	9	33_01
							3	3	23	34_02
							1	1	6	34_04
1	1						2	36_00		
3	6						27	36_02		
1	1	1	37_01							
1	1	1	37_03							
1	1	4	38_02							
1	1	2	39_03							
2.1	7,5	2/8	2,1	4,0	1	1	5	32_04		
					2	3	12	21_22		
					2	3	11	24_23		
					1	1	2	26_23		
					1	1	6	35_03		
					2	3	17	36_02		
					1	2	7	37_01		
					2	2	4	37_03		
					1	1	1	16_01		
F7CJN9	Serotransferrin (Fragment)	2.0	7,5	3/38	1,4	2,0	4	4	10	17_02
							2	2	3	30_22
							1	1	4	31_03
							1	1	2	33_08
							1	1	1	33_20
							2	2	4	17_32
							6	8	29	18_31
							5	7	11	19_24
							5	7	26	20_23
							7	9	40	21_22
							1	1	1	21_30
							1	1	1	24_21
							12	20	93	24_23
							1	1	1	24_27
							2	2	4	24_29
							1	1	1	24_31
							7	7	22	25_24
							9	12	25	26_23
							3	4	8	27_20
							3	3	5	27_24
							1	1	1	29_23
1	1	2	30_19							
1	1	2	32_13							

							14	24	143	33_01
							7	10	77	33_18
							18	27	162	34_02
							12	17	67	35_01
							6	7	38	35_03
							2	2	8	35_18
							5	5	7	36_00
							11	14	91	36_02
							5	6	12	36_04
							5	5	17	37_01
							3	4	11	37_20
							2	3	11	39_01
							4	5	9	39_03
							1	1	1	40_02
		2.1	7,5	3/10	1,8	2,6	2	3	15	31_01
							3	3	23	12_25
							2	2	6	12_31
							2	3	12	21_22
							3	4	29	24_23
							1	1	2	26_23
							1	1	6	35_03
							3	4	22	36_02
							1	2	7	37_01
							1	1	1	37_03
D3YR8	Serotransferrin (Fragment)	2.1	7,5	3/12	3,0	4,5	1	1	7	23_24
							1	2	17	12_25
							1	1	4	12_31
							2	2	12	21_22
							1	1	8	24_23
							1	1	6	24_29
							1	1	7	26_23
							1	1	11	34_02
							1	2	15	35_03
							2	3	24	36_02
							1	1	5	37_01
							1	1	5	37_03
Zellbestandteile										
E9QAA1	Zinkfingerprotein 758	2.0	4.5	2/8	2.2	17.1	1	1	1	31_19
		2.0	6.0	1/3	8.1	3,3	1	1	1	32_16
							1	1	1	36_17
K7N6T2	Vomeronal 2, Rezeptor 67	2.0	4.5	2/4	4.7	-	1	1	1	19_31
		2.1	4.5	1/3	102.9	181.8	1	1	1	31_15
							1	1	1	32_16
							1	2	2	33_13
		2.0	6.0	2/4	124.2	-	1	1	1	11_31
							1	1	1	13_31
P08228	Superoxid-Dismutase [Cu-Zn]	2.0	4.5	1/2	4.0	4.9	3	3	9	40_01
							1	1	4	41_02
		2.0	7.5	1/2	2.7	-	1	1	1	38_02
							1	1	1	40_00
Q8CDI6	Coiled-Coil Domäne enthaltend Protein 158	2.0	4.5	1/5	31.3	10.7	1	1	1	31_17
							1	2	2	32_16
							1	1	1	33_17
		2.0	6.0	1/2	8.3	-	1	1	2	31_16
							1	1	1	32_19
		2.1	6.0	1/7	5.6	4.4	1	1	1	31_16
							1	1	1	32_15
							1	2	3	32_17



## Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Ablauf des Entwicklungsprozesses von Biomarkern
- Abb. 2: Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers
- Abb. 3: Ergebnisse aus SIEVE 2.0 – Datenausschnitt zur Fraktion A\_20\_01 p\_wt
- Abb. 4: Auszug P/WT bei 4,5 Wochen mit SIEVE 2.0 – Markierung eines positiven Clusters
- Abb. 5: Darstellung der Haptoglobin-Quotienten mit SIEVE 2.0 in der 2D-Trenn-Matrix für P/WT bei 4,5 Wochen
- Abb. 6: Eichgerade der 1. Dimension
- Abb. 7: Chromatogramme der nativen Serumproteine nach Größenausschlusschromatographie (1D) im Alter von 4,5 Wochen
- Abb. 8: Chromatogramme der nativen Serumproteine nach Größenausschlusschromatographie (1D) im Alter von 6 Wochen
- Abb. 9: Chromatogramme der nativen Serumproteine nach Größenausschlusschromatographie (1D) im Alter von 7,5 Wochen
- Abb. 10: Vergleich der nativen Serumproteinverteilung der Gruppe P im Alter von 4,5 bis 9 Wochen
- Abb. 11: Ausschnitt des 2D-Diagrammes der Gruppe WT bei 4,5 Wochen
- Abb. 12: Mittelwerte der Proteinkonzentrationen aus neun 2D-Fractionen (s. Abb.11) mit Immunglobulinen als dominante Proteine
- Abb. 13: Mittelwerte der Proteinkonzentration aus neun 2D-Fractionen (s. Abb.11) mit Transferrin als dominantes Protein
- Abb. 14: Mittelwerte der Proteinkonzentration aus je neun 2D-Fractionen der Cluster Albumin 1 und 2 (s. Abb.11) mit Albumin als dominantes Protein

## Tabellenverzeichnis

- Tab. 1: Stadien chronischer Nierenerkrankungen
- Tab. 2: Verwendete Maus-Serum Pools
- Tab. 3: Eichproteine
- Tab. 4: Elutionsprotokoll der 2. Dimension
- Tab. 5: Gruppierung der Ratios
- Tab. 6: Auszug Ergebnistabelle P gegen WT und Ram am Beispiel von Haptoglobin
- Tab. 7: Serumproteinkonzentrationen in mg/ml
- Tab. 8: Bei AS-Mäusen höher konzentrierte Serumproteine und ihre Beeinflussung durch Ramipril
- Tab. 9: Bei AS-Mäusen niedriger konzentrierte Serumproteine und ihre Beeinflussung durch Ramipril
- Tab. 10: Serumproteine mit mehreren gegenläufigen Clustern in AS-Mäusen und ihre Beeinflussung durch Ramipril
- Tab. 11: Serumproteine mit mehreren gegenläufigen Clustern in AS-Mäusen und ihre Beeinflussung durch Ramipril (einschließlich zusätzlicher Daten)

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, mich bei allen zu bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Dissertation unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt Dr. Heidrun Rhode, für das vermittelte Fachwissen und die stets verlässliche Hilfestellung bei all meinen Fragen.

Weiterhin bedanke ich mich bei Sindy Wendler, Bärbel Tautkus und Dr. Petra Mucnkova für das Feedback, die vielen Anregungen und Denkanstöße.

Meinem Arbeitgeber, Markus Klemp, danke ich für das entgegengebrachte Verständnis, wenn es um den hohen Zeitaufwand bei der Erstellung dieser Dissertation ging.

Meinen Freunden Theresa Fietz, Lena Pfaffinger, Franziska Hanika, Michaela Vogel und Christian Rose danke ich von ganzem Herzen, für den Zuspruch, die Ablenkung, den Spaß und für die Freundschaft, die sie mir in den letzten Jahren geschenkt haben, wenn ich mal wieder nicht weiter wusste.

Besonderen Dank schulde ich meiner Familie, allen voran meiner Mutter Monika Alert, meinem Vater Jens Alert sowie meiner Großmutter Elisabeth Alert, die jeder auf seine ganz eigene Weise, Vorbilder für mich sind. Danke für das Verständnis und die Geduld in den vielen Zeiten, in denen mein Kopf nur voll mit Arbeit war. Ihr habt immer daran geglaubt, dass ich alles erreichen kann, was ich will.

All das habe ich nie als selbstverständlich angesehen. Herzlichen Dank!

## Lebenslauf

Vor- und Zuname Mandy Alert

Geburtsdatum 09.07.1990

Geburtsort Neuhaus am Rennweg

Staatsangehörigkeit Deutsch

Familienstand ledig

Wohnort 98724 Neuhaus am Rennweg  
Sonneberger Straße 154

Schulbildung 08/1997 – 07/2001 Staatliche Grundschule Neuhaus/Rwg.  
08/2001 – 05/2009 Staatliches Gymnasium Neuhaus/Rwg.  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium 10/2009 – 12/2014 Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Studienfach: Zahnmedizin  
Abschluss: Staatsexamen

Berufliche Tätigkeit 03/2015 – 02/2017 Assistenz Zahnärztin  
Zahnarztpraxis Marcus Klemp  
Eisfelder Straße 14, 98724 Neuhaus am Rennweg  
Seit 03/2017 angestellte Zahnärztin  
Zahnarztpraxis Marcus Klemp  
Eisfelder Straße 14, 98724 Neuhaus am Rennweg

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Heidrun Rhode, Petra Muckova und Sindy Wendler,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift des Verfassers