

**Proteomics-basierte Suche nach Biomarkerkandidaten am
Hundemodell (COL4A5^{-/-}) zur präklinischen Diagnose des
Alportsyndroms**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

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

von Alexandra Lüse (B.Sc.)
geboren am 17.06.1992 in Omsk

Gutachter:

1. Apl.- Prof. Dr. med. Heidrun Rhode, Institut für Biochemie I, Universitätsklinikum Jena
2. PD Dr. med. habil. Ulrike John, Klinik für Kinder - und Jugendmedizin, Universitätsklinikum Jena
3. Prof. Dr. med. Oliver Groß, Abteilung Nephrologie und Rheumatologie, Universitätsklinikum Göttingen

Datum der Verteidigung: 30.06.2020

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1 Zusammenfassung	3
2 Einleitung	5
2.1 Krankheitsbild des Alportsyndroms	5
2.1.1 Grundlagen	5
2.1.2 Genetik	7
2.1.3 Pathophysiologie	8
2.1.4 Klinik	10
2.1.5 Therapie	12
2.1.6 Diagnostik	15
2.2 Definition Biomarker	17
2.3 Proteomics	18
3 Ziel der Arbeit	19
4 Methodik	20
4.1 Einführung	21
4.2 Probenkollektiv	21
4.2.1 Alporttiere	21
4.2.2 Gesundes Vergleichskollektiv	22
4.3 Material	22
4.3.1 Präfraktionierung	22
4.3.2 Proteaseverdau	22
4.3.3 Massenspektrometrie	23
4.3.4 Immunteste	23
4.3.5 Software und Datenbanken	23
4.4 Methoden	24

4.4.1 Präfraktionierung	24
4.4.2 Proteaseverdau	25
4.4.3 Massenspektrometrie	25
4.4.4 Semiquantitativer Vergleich	26
4.4.5 Datenanalyse	27
4.4.6 Immuntestevaluierung	29
5 Ergebnisse	30
5.1 zusammenfassende Übersicht der Biomarkerkandidaten	30
5.1.1 Übersicht potentieller Biomarkerkandidaten	43
5.2 Evaluierung ausgewählter Biomarkerkandidaten	47
5.2.1 Auswertung Immuntestevaluierung	47
5.2.1.1 Serum-Amyloid A	48
5.2.1.2 Gelsolin	48
5.2.1.3 Adiponektin	48
6 Diskussion	49
6.1 massenspektrometrisch identifizierte Biomarkerkandidaten	49
6.1.1 Akute Phase Proteine	49
6.1.2 Negative Akute Phase Proteine	52
6.1.3 Extrazelluläre Matrixbestandteile	54
6.1.4 Zytoskelett	58
6.1.5 Signaltransduktion	60
6.1.6 Sonstige	61
6.2 selektierte Biomarkerkandidaten	64
6.2.1 Serum-Amyloid A	64
6.2.2 Gelsolin	66
6.2.3 Adiponektin	69

6.3 Vergleich mit dem Mausmodell	71
6.4 Methodenkritik	74
7 Schlussfolgerung	76
8 Literaturverzeichnis	78
9 Anhang	108

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	EM	Elektronenmikroskopie
%	Prozent	EMT	Epithelial-mesenchymale Transformation
>/ <	größer als / kleiner als	ER	endoplasmatisches Retikulum
≥	größer gleich	ESRD	<i>endstage renal disease</i>
µl	Mikroliter	FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i> (dt.: schnelle Proteinflüssigkeitschromatographie)
µg	Mikrogramm	FSAP	Faktor 7 aktivierende Protease
1D / 2 D	erste / zweite Dimension der chromatographischen Proteinseparation	FSGS	fokal segmentale Glomerulosklerose
ACE	<i>angiotensin converting enzyme</i>	g	Gramm
AEC	<i>anion exchange chromatography</i> (dt.: Anionenaustauschchromatographie)	GBM	glomeruläre Basalmembran
AG	Arbeitsgruppe	GFR	glomeruläre Filtrationsrate
APP	Akute Phase Protein	GSN	Gelsolin
APR	Akute Phase Reaktion	HABP	Hyaluronsäure-bindendes Protein
ARAS	Autosomal-rezessives Alportsyndrom	HDL	<i>high density lipoprotein</i>
AS	Alportsyndrom	HMW	<i>high molecular weight</i>
AT1 / AT2	Angiotensin 1 / Angiotensin 2	HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (dt.: Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
Atf6α	<i>activating transcription factor 6α</i>	Hz	Hertz
CDK2	<i>cyclin dependent kinase 2</i>	Inc.	Incorporated
cGSN	zelluläres Gelsolin	JNK	Januskinase
CKD	<i>chronic kidney disease</i>	kB	Kilobasen
COL	Kollagen (Genbezeichnung)	kDa	Kilodalton
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>	KF	Komplementfaktor
EC	Endothelzellen	Kol	Kollagen (Proteinbezeichnung)
ECM	Extrazellulärmatrix		
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure		
EGF	<i>epidermal growth factor</i>		
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>		

I	Liter	pGSN	plasmatisches Gelsolin
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase	PZ	Podozyt
LC-HESI	<i>liquid chromatography heat</i>	RBP	Retinol-bindendes Protein
MS/MS	<i>electro spray ionisation tandem mass spectrometry</i> (dt.: Flüssigkeitschromatographie-Hitze-Elektrospray-Ionisation-Tandem-Massenspektrometrie)	RhoA	<i>Ras homolog gene family</i> , Mitglied A
LM	Lichtmikroskopie	RNA	<i>ribonucleid acid</i>
LMW	<i>low molecular weight</i>	ROCK	Rho-assoziierte Proteinkinase
LysC	Endoproteinase Lys-C	rpm	<i>revolutions per minute</i>
M	molar	RRT	<i>renal replacement therapy</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>	SAA	Serum-Amyloid A
MC	Mesangiumzellen	SAP	Serum-Amyloid P
mM	millimolar	SEC	<i>size exclusion chromatography</i> (dt.: Größenausschlusschromatographie)
ml	Milliliter	SOX	Sulfhydryloxidase
MMP	Matrix Metalloprotease	Tab.	Tabelle
Mr	Molekulargewicht	TGF- β 1	<i>Tissue-growth-factor β1</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleid acid</i>	TNF	Tumor Nekrose Faktor
m/z-ratio	Masse-zu-Ladung-Verhältnis	TSP	Thrombospondin
Nf-kB	<i>nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B-cells</i>	UHPLC	<i>ultra high performance liquid chromatography</i> (dt.: Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie)
nm	nanometer	VEGFA	<i>vascular endothelial growth factor A</i>
nM	nanomolar	vWF-C	<i>von Willebrand factor type C domain</i>
OMD	Osteomodulin	WHO	<i>World Health Organization</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (dt.: Polymerasekettenreaktion)	XLAS	x-chromosomales Alportsyndrom
PDGF-B	<i>platelet derived growth factor B</i>	ZO-1	Zonula occludens Protein 1
PDGFR	<i>platelet derived growth factor receptor</i>	zw.	zwischen

In der vorliegenden Promotionsarbeit werden die Aminosäuren gemäß des internationalen Drei-Buchstaben-Codes abgekürzt.

1 Zusammenfassung

Das Alportsyndrom ist eine monogenetisch bedingte Erkrankung, die x-chromosomal oder autosomal vererbt wird. Durch den fehlenden Austausch der Kollagen 4-Ketten in den glomerulären, cochleären und okulären Basalmembranen kommt es zu den typischen Symptomen: Hämaturie, Proteinurie, Innenohrschwerhörigkeit und Visusstörungen.

Bleibt die Erkrankung unbehandelt, erleiden die Patienten bereits frühzeitig ein terminales Nierenversagen. Mit Ausnahme der Nierentransplantation gibt es bis heute keine kurative Therapie. Durch die Gabe von ACE-Inhibitoren ist man jedoch aktuell in der Lage, die Progredienz der Erkrankung deutlich zu verlangsamen. Dabei sind die Effekte umso größer, je früher mit der Therapie begonnen wird. Das heißt, um maximal von der vorhandenen Therapieoption profitieren zu können, muss mit der Behandlung vor Einsetzen der Mikroalbuminurie begonnen werden.

Die aktuell genutzten Diagnosemethoden, Anamnese, Genanalyse und Histologie, detektieren präklinische Merkmalsträger nur bei Vorliegen eindeutiger Evidenzen, z.B. positiver Familienanamnese. Daraus ergibt sich ein Dilemma, denn es gibt bis heute keine alternativen validen Marker, mit denen das Alportsyndrom im präklinischen Stadium diagnostiziert werden kann.

Diesem Promotionsvorhaben liegt die Hypothese zugrunde, dass sich die Plasmakonzentration einzelner Proteine bei präklinischen Merkmalsträgern signifikant von der Gesunder unterscheidet. Die veränderten Proteine sollen in dieser Arbeit im Hundemodell des Alportsyndroms massenspektrometrisch identifiziert, mit früheren Ergebnissen aus dem Mausmodell verglichen und zumindest teilweise mittels Enzymimmuntest evaluiert werden.

Die vorliegende Promotionsarbeit bedient sich eines hypothesenfreien Ansatzes zur Biomarkersuche. Dafür wurden Proteine aus dem Blutplasma von drei präklinischen Hundewelpen, die den genetischen Defekt des Alportsyndroms tragen, und drei gesunden Geschwistertieren nativ zweidimensional fraktioniert und massenspektrometrisch analysiert. Die untersuchten Fraktionen wurden durch das Programm Proteome Discoverer™ 1.3 identifiziert und ihre Zusammensetzung mittels SIEVE™ 2.0 verglichen. Auf diese Weise konnten Konzentrationsunterschiede einzelner Proteine zwischen Merkmalsträgern und Wildtyp-Kontrolle gefunden werden.

Insgesamt wurden so 34 deutlich veränderte Proteine identifiziert. Proteine mit einem besonders hohen Anstieg beim präklinischen Alportsyndrom sind: Gelsolin, Serum-Amyloid A, Clusterin und Hyaluronan binding protein 2.

In Zusammenschau der jeweiligen zweidimensionalen Proteinverteilung und aktueller Literatur wurden Serum-Amyloid A, Gelsolin und Adiponektin als besonders vielversprechende Biomarkerkandidaten identifiziert und einer Evaluierung mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) unterzogen. Die Bestätigung der durch das Massenspektrometer detektierten Proteine gelang auf diese Weise für Gelsolin und Adiponektin. Die gemessenen Konzentrationen für das Gelsolin sind allerdings nicht verdünnungslinier. Die Adiponektin-Konzentrationen unterscheiden sich zudem nicht ausreichend eindeutig zwischen Merkmalsträgern und Wildtyp-Kontrolle. Mit dem erworbenen ELISA-Testkit war der Nachweis von Serum-Amyloid A innerhalb der Plasmaproben nicht erfolgreich. Zukünftig bedarf es in diesem Zusammenhang einer erneuten Evaluation mit anderen Testbedingungen.

In der vorliegenden Promotionsarbeit werden somit zwei Biomarkerkandidaten zur Anwendung beim präklinischen Alportsyndrom vorgeschlagen, welche jedoch weiterer Immuntestevaluierung mit größeren Probenmengen und gegebenenfalls der Unterscheidung einzelner Proteoformen bedürfen. Zudem wird ein Ausblick auf weitere potentielle Marker gegeben, für die eine Evaluation, z.B. durch Immunteste, noch aussteht. Zusätzlich gelang die Bestätigung einiger Markerkandidaten, u.a. Sulfhydryloxidase und Transferrin, aus dem durch die Arbeitsgruppe von Muckova et al. 2015 untersuchten Mausmodell.

2 Einleitung

2.1 Krankheitsbild des Alportsyndroms

Das Alportsyndrom (AS) ist eine hereditäre Erkrankung, die zur Destruktion der glomerulären, aurikulären und okulären Basalmembran führt (Kruegel et al. 2013). Die Erkrankung wurde nach ihrem Entdecker Dr. A. C. Alport benannt, welcher 1927 erstmals die Kombination von hereditärer Nephritis und Innenohrschwerhörigkeit beschrieb (Alport 1927). Nach der polyzystischen Nierenkrankheit ist das AS die zweithäufigste angeborene Nierenerkrankung, welche zum terminalen Nierenversagen (ESRD) führt (Grünfeld und Joly 1997). Schätzungsweise erkrankt 1 von 5.000 - 10.000 Menschen an der x-chromosomalen Form (XLAS) (Miner et al. 2014). Rund 1 % der weltweiten Bevölkerung sind heterozygote Carrier für die autosomal-rezessive Form des AS (ARAS) (Gross et al. 2003 B).

2.1.1 Grundlagen

Adulte Glomeruli setzen sich aus Endothelzellen (EC), der glomerulären Basalmembran (GBM), Podozyten (PZ) und den Mesangiumzellen (MC) zusammen. Während der Nephrogenese sind die basale Seite der PZ und die Anlage der Macula densa zunächst durch einen Spalt von einander getrennt. Das durch die PZ-Vorläuferzellen freigesetzte VEGF-A bedingt die Einwanderung von EC in diesen Spaltraum. Durch die Freisetzung von PDGF-B aus EC kommt es zur Einwanderung und Differenzierung von MC in der Glomerulusanlage (Kriz 2006).

MC sind spezialisierte Fibroblasten. Extraglomerulär sind sie am tubuloglomerulären Feedback beteiligt, intraglomerulär ermöglichen sie durch ihre Kontraktionsfähigkeit eine Regulation der Kapillarweite. MC sind phagozytotisch aktiv und synthetisieren Prostaglandine, Endotheline und Zytokine (Zhang et al. 2016). Zudem sind sie an der Synthese und dem Remodeling der extrazellulären Matrix (ECM) beteiligt (Onogi et al. 2004).

Der PZ-Zellkörper sitzt der GBM nicht unmittelbar auf. Wie in Abbildung (Abb.) 1 zu sehen, erfolgt seine Verankerung an den Fußfortsätzen der PZ über $\alpha_3\beta_1$ -Integrin und Dystroglykan (Kriz 2006). Agrin der GBM bindet dabei an $\alpha\beta$ -Dystroglykan, welches durch Utrophin mit dem Aktinzytoskelett des PZ verbunden ist. Das Laminin-521 der adulten GBM ist über $\alpha_3\beta_1$ -Integrin und weitere Adaptermoleküle (z.B. Talin, Vinculin) ebenfalls mit dem PZ verbunden (Patrakka und Tryggvason 2010). Durch Seit-zu-Seit-Interaktion zwischen einzelnen Fußfortsätzen entstehen sogenannte Filtrationsschlitze (Vgl. Abb. 2), welche in einer Tiefe

von ca. 4 nm von einer zusätzlichen Schlitzmembran ausgekleidet werden (Kriz 2006). Neph_{1,2,3} dient als Verbindung zwischen den PZ-Fußfortsätzen, ZO-1 ist als Bestandteil der Zonula occludens wichtig für die Zell-Adhäsion und Signalweiterleitung (Patrakka und Tryggvason 2010). Wichtiger Bestandteil der Filtrationsbarriere ist die negative, Podocalyxin-haltige Glykokalix, welche Fußfortsätze, Schlitzmembran, Filtrationsschlitz und das Endothel auskleidet (Kriz 2006).

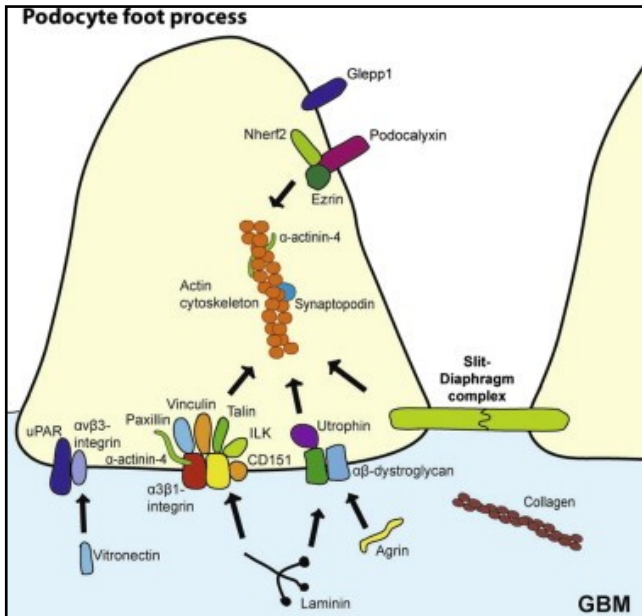


Abb. 1 Podozytenfußfortsätze

Dargestellt ist die Interaktion zwischen GBM und PZ- Fußfortsatz

(Patrakka und Tryggvason 2010).

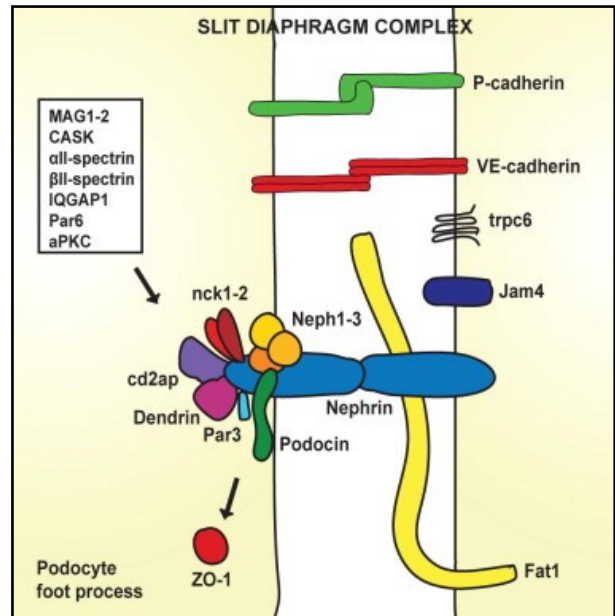


Abb. 2 Detailansicht Filtrationsschlitz

Die Filtrationsschlitz sind 30 - 40 nm breit und mit einer Schlitzmembran ausgekleidet

(Patrakka und Tryggvason 2010).

Zentraler Bestandteil des Glomerulus ist die GBM. Diese besteht aus drei Schichten: die Lamina rara interna, welche den EC zugewandt ist, eine zentrale elektronendichte Lamina densa und die den PZ zugewandte Lamina rara externa (Gekle und Merker 1966, LeBlond und Inoue 1989). Insgesamt gibt es sechs verschiedene Kollagen α -Ketten ($\alpha 1 - \alpha 6$), welche sich jeweils als Heterotrimer zusammenlagern und dadurch unterschiedliche Varianten des Kollagen 4 (Kol 4) bilden. In der fetalen GBM besteht das Kol 4 aus zwei $\alpha 1$ - und einer $\alpha 2$ -Kette und ist assoziiert mit dem fetalen Laminin-111 ($\alpha 1\beta 1\gamma 1$ -Ketten), Nidogen 1 und 2, sowie diversen Heparansulfatproteoglykanen, beispielhaft Agrin und Perlecan (Gubler 2008). Das gesunde adulte Kol 4 der GBM besteht jeweils aus einer $\alpha 3$ -, $\alpha 4$ - und $\alpha 5$ -Kette (Cosgrove und Liu 2017). Jede dieser Ketten besitzt eine 350 nm lange Kollageneinheit, welche durch eine spezielle Aminosäuren-Abfolge charakterisiert ist. Hierbei findet sich regelmäßig wiederkehrend die Aminosäure Glycin, gefolgt von zwei weiteren Aminosäuren, meist

(Hydroxy-) Prolin oder (Hydroxy-) Lysin. Der Anteil an Hydroxyprolin ist dabei entscheidend für die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, welche der Tripelhelix zusätzliche Stabilität verleihen (Gelse et al. 2003). Zudem verfügt jede α -Kette über eine kurze 7S-Einheit am 5'-Ende (N-Terminus) und eine globuläre Domäne am 3'-Ende (C-Terminus), an der die zellulären Faltungsmechanismen ihren Anfang nehmen (Hashimura et al. 2014, Gelse et al. 2003). Die Verknüpfung der drei α -Ketten zu einer Tripelhelix erfolgt u.a. nach Einbau von End-zu-End-Verbindungen am C-Terminus, kovalenten Bindungen am N-Terminus und Disulfidbrücken (Kashtan und Michael 1996). Postnatal werden die adulten Kol 4-Ketten durch PZ synthetisiert (Abrahamson et al. 2009). Zudem findet ein Austausch des Laminin-111 gegen das adulte Laminin-521 ($\alpha_5\beta_2\gamma_1$ -Ketten) statt (Kriz 2006). Auf diese Weise entsteht ein polygonales Netzwerk, in dem das adulte Kol 4 mit Laminin-521, Entactin, Nidogen, Heparansulfat und Glykoproteinen interagiert (Gubler 2008).

2.1.2 Genetik

Die für die Kol 4-Ketten kodierenden Gene liegen jeweils paarweise auf drei verschiedenen Chromosomen. Die Erbinformation für die α_1 - und α_2 -Ketten befindet sich auf dem Chromosom 13q33 - q34 (Gubler 2008), die der α_3 - und α_4 -Ketten auf Chromosom 2, Genlocus q35 - 36 und die der α_5 - und α_6 -Ketten auf dem X-Chromosom, Genlocus q22.3 (Gross und Hoefele 2018). 85 % der Patienten leiden an der x-chromosomal vererbten Form des AS. Sind die α_3 - und α_4 -Ketten des Kol 4 betroffen, liegt meist ein autosomal-rezessiver Erbgang vor (Savige et al. 2019). Autosomal-dominante Erbgänge werden vereinzelt berichtet (Feingold et al. 1985). Bisher ist keine alleinige Mutation der Erbinformation für die α_6 -Kette bekannt, welche zum AS führen würde (Pirson 1999). Jedoch zeigt ein kleiner Prozentsatz der AS-Patienten eine Deletion am 5'-Ende der benachbarten Gene der α_5 - und α_6 -Kette (Heidet et al. 1995).

Die COL4-Gene sind mit über 50 Exons und insgesamt > 51 kB sehr groß. Zudem sind bisher keine „Mutations-Hot-Spots“ bekannt, das heißt jede AS-Familie hat ihre individuelle Mutation (Pirson 1999). Typischerweise sind dies *Missense*- und *Nonsense*-Mutationen (Savige et al. 2016). Eine *single-base-pair*-Substitution resultiert dabei in einer gestörten Proteinfaltung. Sogenannte *out-of-frame*-Mutationen, wie *Frame-Shift*-Mutationen oder der frühzeitige Einbau von Stop-Codons in die Aminosäuresequenz, verändern das Leseraster und gehen mit einer gestörten Bildung der Tripelhelix einher (Kashtan und Michael 1996).

Jeder Gendefekt jeder einzelnen Kette kann zu einer Störung des gesamten Kollagennetzwerks und damit zum AS führen. Zudem scheint es eine Abhängigkeit des

Phänotyps vom Mutationslocus zu geben. Je näher die Mutation am N-Terminus ist, desto milder die Klinik. *Missense*- oder *in-frame*-Mutationen, welche das Leseraster unbeeinflusst lassen, gehen seltener mit einem frühzeitigen ESRD einher als Mutationen, die das Leseraster verändern (Gross et al. 2002).

2.1.3 Pathophysiologie

Für das AS sind die Ketten $\alpha 3$ - 5 entscheidend. Diese sind Bestandteil der Lamina densa in den Basalmembranen der Glomeruli, der Cochlea, sowie der Descemet- und Bruch-Membran (Kashtan und Michael 1996).

Alle AS-Merkmalsträger werden zunächst gesund mit den fetalen Kol 4-Ketten $\alpha 1$ und $\alpha 2$ geboren (Gubler 2008), welche von allen drei Zelltypen im Glomerulus produziert werden (Abrahamson et al. 2009). Die Betroffenen können keine gesunden adulten Kollagenketten ($\alpha 3$, $\alpha 4$ oder $\alpha 5$) in ihren PZ herstellen (Kruegel et al. 2013). Dadurch bleibt die dünnere GBM bestehen, welche sich aus $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ -Ketten zusammensetzt (Cosgrove und Liu 2017), weniger mechanische Stabilität aufweist (Kruegel et al. 2013) und anfälliger für Endoproteolyse ist (Kalluri et al. 1997). Die vermehrte Expression von Kollagen 5 und 6, sowie Fibronectin sorgt für eine zusätzliche Destabilisierung der GBM (Humphreys 2018). Da fetale Kollagenketten schwächer quervernetzt werden als adulte, kann die GBM beim AS den im Laufe der Entwicklung steigenden Perfusionsdrücken der Niere nicht mehr standhalten (Gunwar et al. 1998). Das fetale Laminin-111 kann zudem nicht gegen adultes Laminin-521 ausgetauscht werden (Miner und Sanes 1994, Miner 2011). Die Bindung der PZ an Laminin-521 über $\alpha 3\beta 1$ -Integrin ist jedoch essentiell für die Funktionsfähigkeit der GBM (Kreidberg et al. 1996). Da PZ postnatal nicht mehr proliferationsfähig sind (Fogo 2007), kommt es bei gestörter Interaktion mit der GBM zur Rarefizierung der PZ-Fußfortsätze (Wickman et al. 2016). In der Folge entstehen dehiszente Areale, in denen sich die PZ von der GBM ablösen (Kriz et al. 1998, Kriz 2013), sodass sich mesangiale Matrixproteine und Plasmaproteine ablagern können, welche wiederum zu einer Progression der Sklerosierung beitragen (Kriz et al. 1998, Cosgrove und Liu 2017). Die veränderte Interaktion zwischen den PZ und der fehlerhaften GBM führt zu einer vermehrten Freisetzung von Chemokinen (z.B. TGF- $\beta 1$) aus MC, PZ, Tubuluszellen und interstitiellen Fibroblasten (Liu et al. 2016, Remuzzi und Bertani 1998). TGF- $\beta 1$ aktiviert pro-apoptotische Signalkaskaden (z.B. MAPK, JNK-Kaskade), welche wiederum zum Untergang der PZ führen (Yamaguchi et al. 1995). Über die Induktion der CTGF -Expression und -Aktivität führt TGF- $\beta 1$ indirekt zu einer gesteigerten Synthese von Kollagen 1 (Kol 1) in MC und Fibroblasten (Liu et al. 2016). Die gesteigerte Produktion von ECM-Bestandteilen reduziert

die glomeruläre Filtrationsfläche und damit die renale Filtrationsfähigkeit (Ishimura et al. 1989). Die Plasmaproteine, welche durch die zerstörte Nierenfiltrationsbarriere in das Tubulussystem gelangen, schädigen die Tubuluszellen und fördern die Freisetzung weiterer pro-inflammatorischer Zytokine (D'Amico und Bazzi 2003, Abbate et al. 1998). Die Transformation geschädigter Tubulusepithelzellen zu Myofibroblasten (Epithelial-mesenchymale Transformation, EMT) konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden (Neilson 2006). Die umliegende Basalmembran wird dabei lokal durch Proteolyse zunehmend geschädigt (Greenberg et al. 2018, Neilson 2006). Aus einer asymptomatischen Mikrohämaturie entwickelt sich eine progrediente Störung der Nierenfiltrationsbarriere und daraus letztendlich das terminale Nierenversagen.

In Abb. 3 können die histologischen Unterschiede zwischen neun Wochen alten gesunden Mäusen (Wildtyp-Kontrolle) und gleichaltrigen COL4A3-defizienten Mäusen nachvollzogen werden. Unabhängig vom Alport-Subtyp ist typischerweise die trilamelläre Schichtung der Basalmembran aufgehoben, die Lamina densa erscheint anfangs verdünnt (bis zu 100 nm), im Verlauf unregelmäßig verdickt (bis zu 1200 nm), die inneren und äußeren Konturen verschwimmen (Pirson 1999) und es entsteht ein korbflechtartiges Muster (Flinter et al. 1988).

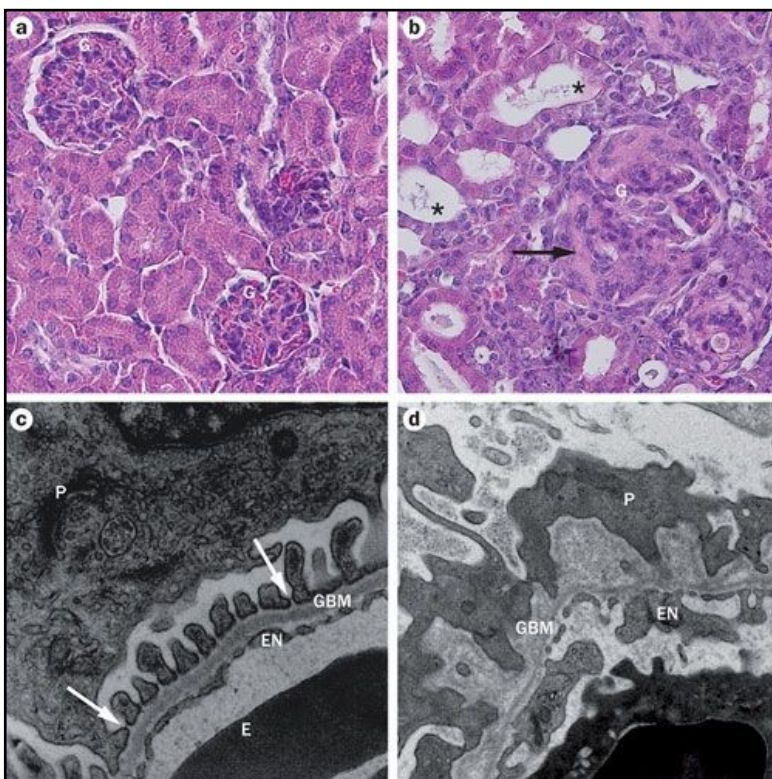


Abb. 3 Histologie Wildtyp-Kontrolle und AS

a: LM-Aufnahme: Wildtyp-Kontrolle
 b: LM-Aufnahme: COL4A3^{-/-} Maus, der schwarze Pfeil zeigt auf Areale fokal segmentaler Glomerulosklerose, Sterne markieren zerstörtes Tubulusgewebe; c: EM-Aufnahme: Wildtyp-Kontrolle, der weiße Pfeil zeigt auf die Schlitzmembran; d: EM-Aufnahme: COL4A3^{-/-} Maus; Abkürzungen: P: Podozyten, EN: Endothel, GBM: glomeruläre Basalmembran, E: Erythrozyt (Kruegel et al. 2013).

2.1.4 Klinik

Beim XLAS sind naturgemäß Männer häufiger und schwerwiegender betroffen als Frauen. Allerdings entwickeln auch heterozygot betroffene Frauen letztendlich Nierenschäden (Jais et al. 2003). Beim ARAS und der autosomal-dominanten Form des AS erkranken Männer und Frauen gleich häufig (Storey et al. 2013).

Erstes und wichtigstes Symptom des AS ist die Mikrohämaturie. Diese ist bei 100 % der männlichen und 95 % der weiblichen XLAS-Patienten nachweisbar (Kashtan 2018). Bei einem Großteil der Patienten (62 % XLAS-Männer, 66 % aller ARAS-Patienten) findet sich zudem eine intermittierende Makrohämaturie (Gubler 2008).

Bedingt durch den Verlust der glomerulären Barrierefunktion kommt es im Verlauf der Erkrankung zur Proteinurie. Der genaue Zeitpunkt unterliegt dabei einer starken interfamiliären Variabilität. Bei männlichen XLAS-Patienten liegt der Beginn typischerweise zwischen Kindheit und Adoleszenz (Kashtan et al. 2013). Weibliche XLAS-Patienten entwickeln durchschnittlich im Alter von 7 Jahren eine Proteinurie (Yamamura et al. 2017). Bei 85 % der Kinder mit ARAS lässt sich bereits vor Vollendung des 6. Lebensjahres eine Proteinurie nachweisen, wobei die Ausprägung mit Alter und Progression der Nierenerkrankung korreliert (Gubler 2008).

Das ESRD stellt das Endstadium der progredienten Niereninsuffizienz dar. Es ist definiert durch eine glomeruläre Filtrationsrate (GFR) unter 15 ml/min/1,73 m² oder der Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie (*renal replacement therapy*, RRT), beispielsweise einer Hämodialyse oder Nierentransplantation (Levey et al. 2003). Unbehandelt erleiden die Patienten im Durchschnitt mit 22 Jahren ein Nierenversagen (Gross et al. 2012). Das Risiko, ein ESRD zu entwickeln, wächst bei männlichen XLAS-Patienten von 70 % im Alter von 30 Jahren auf 90 % im Alter von 40 Jahren (Jais et al. 2000). 12 % der Frauen mit XLAS erkranken vor ihrem 41. Lebensjahr am ESRD (Kashtan 2018).

Ein Großteil der AS-Patienten entwickelt zusätzlich eine Innenohrschwerhörigkeit. So zeigen 90 % der XLAS-Männer im Alter von 40 Jahren Symptome einer Hochtonschwerhörigkeit (Kashtan 2005). Bei den weiblichen XLAS-Patienten konnte dies in ca. 45 % der Fälle nachgewiesen werden (Kashtan und Michael 1996). Diagnostiziert wird die Innenohrschwerhörigkeit durchschnittlich im Alter von 12 Jahren, wobei weibliche Betroffene meist später erkranken (Kashtan und Michael 1996, Mais et al. 2003). In der Audiometrie zeigt sich eine bilaterale Reduktion der Sensitivität im Bereich von 2000 bis 8000 Hz, welche sich im Krankheitsverlauf auf den Sprachbereich (500 - 3000 Hz) ausbreiten kann (Gubler 2008). Untersuchungen an Hirnstamm evozierten Potentialen

lokalisierten die Schädigung zumeist im Bereich der cochleären Stria vascularis (Gleeson 1984).

Die häufigste Augenveränderung bei AS-Patienten ist die periphere Fleckretinopathie (Shaw et al. 2007). Während etwa 25 - 50 % der männlichen XLAS-Patienten an einem Lenticonus anterior erkranken (Zhang und Ding 2018), ist dies bei weiblichen XLAS-Patienten eher untypisch (Savige und Colville 2009). Der Lenticonus anterior ist assoziiert mit einem frühzeitigen ESRD und nahezu pathognomonisch für das AS. Unbehandelt kann er zum Visusverlust führen (Zhang und Ding 2018). Weitere Augenerkrankungen, wie Keratokonus und Katarakt, wurden ebenso beschrieben (Chugh et al. 1993).

Ein sehr geringer Prozentsatz der Alportpatienten erkrankt zusätzlich an einer ösophagealen Leiomyomatose (Gubler 2008). Diese äußert sich ab der späten Kindheit u.a. durch Dysphagie, retrosternalen Druckschmerz und Dyspnoe und kann mittels Barium-Breischluck, Röntgen, MRT oder CT diagnostiziert werden (Kashtan und Michael 1996).

Tabelle (Tab.) 1 enthält eine Zusammenfassung über jene Symptome, welche auch zur klinischen Diagnosenstellung herangezogen werden, sowie deren Häufigkeiten je nach Subtyp des AS. Die Tabelle unterscheidet nicht zwischen den ESRD *onset*-Typen. Innerhalb des XLAS werden zudem geschlechtsspezifische Unterschiede aufgeführt.

Tab. 1: Übersicht über Symptome und deren Häufigkeit im Rahmen des AS

in Anlehnung an Flinter et al. 1988, Gross et al. 2004 A;* Savige und Colville 2009, *¹Oka et al. 2014, *²Shaw et al. 2007.

Symptom	Häufigkeit des Symptoms	
	XLAS	ARAS
positive Familienanamnese bezüglich Hämaturie mit/ ohne ESRD	100 % ♂ 95 % ♀	100 %
progrediente Innenohrschwerhörigkeit	90 % ♂ 45 % ♀	40 %* ¹
Augenveränderungen		
Fleckretinopathien	85 % ♂ / 25 % ♀* ²	87 %
Lenticonus anterior	50 % ♂	häufig*
diffuse Leiomyomatose des Ösophagus	1 - 2 % (überwiegend XLAS)	

2.1.5 Therapie

Der einzige kurative Therapieansatz des AS besteht aktuell in der Nierentransplantation. Es konnte gezeigt werden, dass Alportpatienten nach einer Nierentransplantation ein signifikant besseres Outcome haben als Patienten mit anderen Nierenerkrankungen (Temme et al. 2012). Die Post-Transplantations-Anti-GBM-Nephritis stellt dabei eine seltene, jedoch schwerwiegende Komplikation dar und betrifft hauptsächlich männliche XLAS-Patienten (Kashtan 2018).

Um das Nierenversagen hinauszuzögern, verfügen wir aktuell über mehrere pharmakotherapeutische Optionen. Durch den Einsatz von Cyclosporinen konnte in der Vergangenheit eine Abnahme der durchschnittlichen Proteinurie bewirkt werden. Allerdings entwickelten die Patienten starke nephrotoxische Nebenwirkungen (Charbit et al. 2007).

Es wurde außerdem versucht, Stammzellen durch die GBM migrieren zu lassen, sodass sie sich am Ort der Membranschädigung zu PZ ausdifferenzieren können. Jedoch konnten die bisherigen Studien *in vivo* keine ausreichende Stammzelldifferenzierung und Regeneration geschädigter Glomeruli zeigen (Sedrakyan et al. 2012, Gross et al. 2014). Zudem stellt die Stammzelltransplantation noch immer einen potentiell lebensbedrohlichen Eingriff dar (Gross et al. 2009).

Der Einsatz von Chaperonen soll einer möglichen fehlerhaften Proteinfaltung bei „milden“ Mutationsformen entgegenwirken. Bei Patienten mit XLAS aufgrund einer *Missense*-Mutation führte die Therapie mit dem synthetisch hergestellten 4-Phenylbutyrat zu einer verbesserten Proteinfaltung im endoplasmatischen Retikulum (ER), der Stabilisierung bereits gefalteter Proteine und einem erleichterten Transport der Proteine aus dem ER. Zudem gelang der Nachweis einer gesteigerten COL4A5-Transkriptionsrate bei den behandelten XLAS-Patienten (Wang et al. 2017).

Aktuell gilt die Gabe des ACE-Inhibitors Ramipril als Erstlinien-Therapie bei AS. Es wird empfohlen, betroffene Kinder noch vor Auftreten der Proteinurie unter kindernephrologischer Kontrolle mit Ramipril in hoher Dosierung zu therapieren. Alternativ können Angiotensin-Antagonisten (AT1-Antagonisten) in Erwägung gezogen werden (Gross et al. 2004 A). Sowohl ACE-Inhibitoren als auch AT1-Antagonisten bewirkten im Mausmodell eine deutliche Verbesserung der Proteinurie. Im direkten Vergleich zwischen Candesartan und Ramipril zeigte sich jedoch eine schnellere Verschlechterung der Nierenfunktion unter Candesartan-Therapie. Zudem konnte Ramipril die Konzentration profibrotischer Substanzen deutlicher senken und damit eine stärkere Reduktion der glomerulären Fibrosierung bewirken (Gross et al. 2004 B). In einer prospektiven Untersuchung von heterozygoten AS-Merkmalsträgern war ein ähnlicher Effekt nachweisbar. Im Beobachtungszeitraum von vier Jahren konnte die Progression der Nephritis durch die Gabe von ACE-Inhibitoren bzw. AT-Antagonisten aufgehalten werden (Stock et al. 2017). Im COL4A3-knockout-Mausmodell konnte gezeigt werden, dass sich die fibrotische Umwandlung des Nierenparenchyms signifikant hinauszögern lässt, wenn man betroffene Tiere vor Beginn der Proteinurie einer ACE-Inhibitor-Therapie zuführt. In der selben Studie wurde dargelegt, dass sich die Überlebensdauer der erkrankten Mäuse nach präklinischer Therapie durch ACE-Inhibitoren verdoppelt (Gross et al. 2003 A). Der Beginn des ESRD und damit die Notwendigkeit einer RRT lässt sich beim Menschen signifikant verzögern, wenn die Patienten präemptiv mit Ramipril behandelt werden (Vgl. Abb 4). So wurden AS-Patienten ohne Ramipriltherapie im Durchschnitt mit 22 Jahren dialysepflichtig. Die Zeit bis zum Beginn einer Dialysebehandlung konnte bei Betroffenen im CKD-Stadium III - IV (T-III) signifikant um rund 3 Jahre hinausgezögert werden. Ein Therapiebeginn mit 13 Jahren (T-II) verzögerte den Beginn der Dialyse sogar um 18 Jahre. Keiner der präemptiv behandelten Patienten (T-I) hatte zum Publikationszeitpunkt der Studie die Dialysepflichtigkeit erreicht.

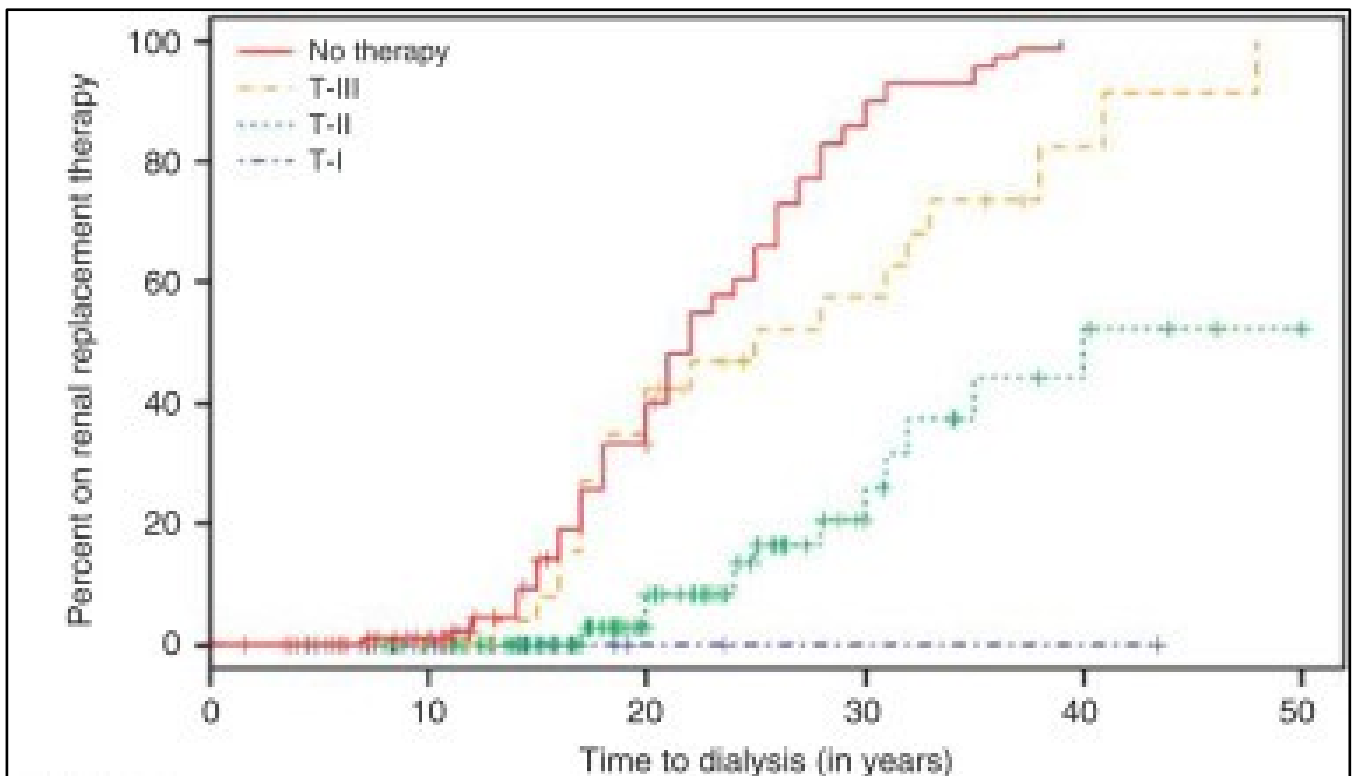


Abb. 4 Zusammenhang zwischen Krankheitsstadium, Therapieschema und Dialysepflichtigkeit

rot: AS-Patienten, ohne Ramipriltherapie; gelb: CKD Stadium III-IV; grün: Proteinurie > 0,3 g/d; blau: Mikrohämaturie und/ oder Mikroalbuminurie (Gross et al. 2012).

Der positive Effekt einer frühzeitigen Therapie mit ACE-Inhibitoren konnte durch den Vergleich erkrankter Geschwisterpaare repliziert werden (Vgl. Abb. 5). Dabei wurden AS-Geschwister untersucht, die sich in Mutation und Umweltbedingungen glichen. Die älteren Geschwister erhielten allerdings erst später oder gar keine Ramipriltherapie. Das Durchschnittsalter zu Beginn einer RRT in dieser Patientengruppe betrug 27 Jahre. Die jüngeren Geschwister konnten aufgrund der bekannten positiven Familienanamnese frühzeitig diagnostiziert und behandelt werden. Letztere waren zu Beginn einer RRT im Durchschnitt 40 Jahre alt (Gross et al. 2012).

Zudem wird ein positiver Effekt von ACE-Inhibitoren auf die Überlebensspanne von Alportpatienten beschrieben. Ein Großteil der Betroffenen verstarb ohne medikamentöse Therapie im Alter von 30 bis 55 Jahren. Durch Gabe von ACE-Inhibitoren konnte die Lebenserwartung der Patienten signifikant verlängert werden (Gross et al. 2012).

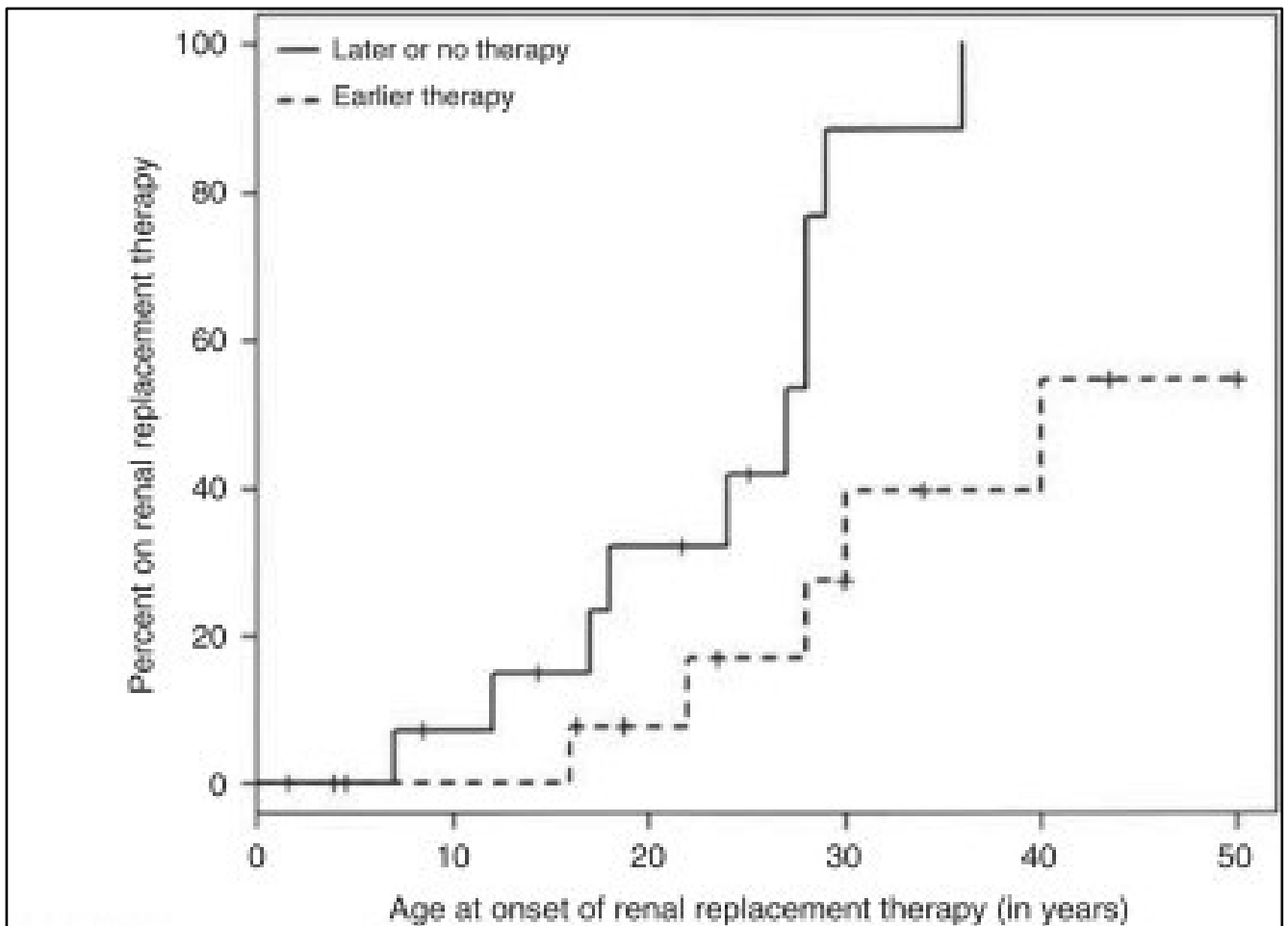


Abb. 5 Geschwistervergleich

Ein frühzeitiger Therapiebeginn mit ACE-Inhibitoren verlängert die Zeitspanne bis zum Beginn der RRT. Zudem verringert die frühzeitige Therapie den prozentualen Anteil der Patienten mit RRT (Gross et al. 2012).

2.1.6 Diagnostik

Aufgrund der vielfältigen Manifestationsmöglichkeiten des AS, der lange unbemerkten unspezifischen Symptome und der heutigen besten Therapieoption ist es prognoseentscheidend, Kinder mit einer Hämaturie, auch bei negativer Familienanamnese, frühzeitig einer diagnostischen Abklärung hinsichtlich des AS zu unterziehen. Diese setzt sich aktuell aus Anamnese, Genanalyse und Nierenbiopsie mit anschließender Histologie zusammen.

Die klinische Diagnosenstellung erfolgt gegenwärtig anhand der in Abb. 6 aufgeführten Merkmale. Der Nachweis einer diffusen ösophagealen Leiomyomatose oder einer

entsprechenden COL4-Mutation (der α 3-, α 4- oder α 5-Kette) können als zusätzliche Diagnosekriterien eingeschlossen werden (Jais et al. 2000).

1. positive Familienanamnese hinsichtlich Hämaturie mit/ ohne Progression zum ESRD
2. progrediente Innenohrschwerhörigkeit
3. Augenveränderungen (z.B. Lenticonus anterior, Fundus albipunctatus)
4. charakteristische ultrastrukturelle Veränderungen der GBM
(z.B. Aufsplitterung, Lamellierung, Verdickung, Verdünnung der GBM)

Abb. 6 Übersicht über aktuell genutzte klinische Diagnosemerkmale

Für die klinische Diagnosenstellung müssen mindestens drei der aufgeführten Kriterien erfüllt sein (Flinter et al. 1988).

Die Genanalyse ist ein aufwändiges und teures Verfahren, welches erst dann durchgeführt wird, wenn ein begründeter Verdacht auf das AS besteht (Gross et al. 2004 A), so z.B. bei familiärer Häufung oder bereits bestehenden Symptomen.

Die Nierenbiopsie und Histologie sind zwar gut geeignet, um Veränderungen der GBM zu detektieren. Zum Zeitpunkt erkennbarer Veränderungen ist jedoch bereits davon auszugehen, dass sich die Patienten im symptomatischen Stadium der Erkrankung befinden und somit nicht mehr in vollem Umfang von der Therapie mit ACE-Inhibitoren profitieren würden. Frühe Gewebeproben hingegen können lichtmikroskopisch unauffällig sein (Heidet und Gubler 2009) und sind daher für die frühzeitige Diagnosenstellung ungeeignet. Zusätzlich müssen die Risiken invasiver Eingriffe (u.a. Blutungen, Infektionen) bedacht werden.

Mehr als 50 % der Alportpatienten zeigen immunhistochemisch keine Veränderungen, da z.B. *Missense*-Mutationen zu nur leicht veränderten Genprodukten führen, welche mit den verfügbaren Methoden nicht nachweisbar sind (Gross et al. 2004 A). Leichte Ablagerungen von IgM, IgG oder Komplementfaktor C3 können jedoch detektierbar sein (Gubler et al. 1981).

Somit wird deutlich, dass die aktuell vorhandenen diagnostischen Mittel zur Detektion des präklinischen AS ungeeignet sind.

2.2 Definition Biomarker

Die *National Institutes of Health Biomarkers Definitions Working Group* definiert Biomarker als „a characteristic that is objectively measured and evaluated as an indicator of normal biological processes, pathogenic processes, or pharmacological response to a therapeutic intervention“ (Biomarkers Definition Working Group 2001). Laut Weltgesundheitsorganisation WHO ist ein Biomarker „any substance, structure, or process that can be measured in the body or its products and influence or predict the incidence of outcome or disease“ (World Health Organization & International Programme on Chemical Safety 2001). Dabei sind Biomarker objektive, quantifizierbare Charakteristika biologischer Prozesse (Strimbu und Tavel 2010). Ihr Nutzen besteht in der Diagnosenstellung, Prognose, sowie Evaluation von Krankheitsverlauf, Krankheitsschwere und Therapieerfolg (Biomarkers Definition Working Group 2001). Bezüglich ihrer klinischen Anwendbarkeit unterscheidet man prognostische (patientenabhängig), prädiktive (therapieabhängig), pharmakodynamische (medikamentenabhängig) und Surrogatparameter (als Reflexion des Endpunktes, z.B. Überleben). Zudem unterscheidet man *in vivo* von *in vitro* Biomarkern. Erstere umfassen klinische Symptome oder radiologisch nachweisbare Veränderungen, während Letztere in gewonnenem Probenmaterial des Patienten nachgewiesen werden. Hierzu zählen u.a. Zellen, Metabolite und Proteine. Die Art der Probengewinnung bestimmt die Invasivität. So gelten der Nachweis von Substanzen im Urin als nicht-invasiv, Blutentnahmen als minimal invasiv und Biopsien als invasiv (Reindl 2016). Mit der Genanalyse und Nierenbiopsie dominieren aktuell die (minimal) invasiven Verfahren die Diagnostik des AS.

Die Suche nach Biomarkerkandidaten zur Detektion des präklinischen AS kann hypothesengetrieben oder in einem hypothesenfreien Ansatz erfolgen. Für Letzteren werden die Plasmaproteome von Merkmalsträgern mit denen gesunder Kollektive verglichen. Die Identifizierung von Biomarkerkandidaten kann in einem ersten Schritt mittels Massenspektrometrie erfolgen. Finden sich deutliche Konzentrationsunterschiede, kann dies hinweisend auf potentielle Marker Kandidaten sein. Es schließt sich eine erste Evaluation mit passenden Immuntesten zur Validierung der gefundenen Ergebnisse an. Danach folgen die unabhängige Bestätigung der gefundenen Proteine mittels ausreichend großer Probenbiobanken und eine letzte prospektive Validierung (Pavlou et al. 2013). Abb. 7 fasst die einzelnen Validierungsschritte zusammen, wobei in dieser Dissertation die ersten zwei Arbeitsschritte vorgenommen wurden.

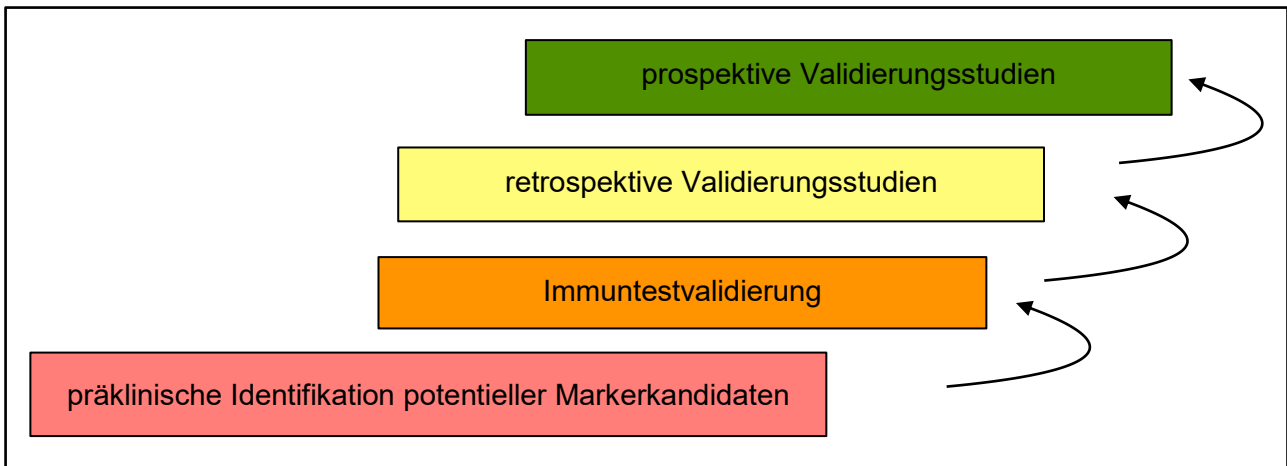


Abb. 7 Prozess der Biomarkeretablierung

Dargestellt sind die Identifikation potentiell wertvoller Biomarker, sowie die sich anschließenden Validierungsschritte (Pavlou et al. 2013).

2.3 Proteomics

Unter dem Begriff „Proteom“ werden alle Proteine eines biologischen Systems zu einem definierten Zeitpunkt unter definierten Bedingungen zusammengefasst (Flaig und Krieg 2005). Der proteomische Ansatz der Biomarkersuche gehört zu den hypothesenfreien Studiendesigns. Sie sind semiquantitativ, komparativ und stehen meist zu Beginn der Biomarkersuche (Reindl 2016). Detaillierte Ausführungen zur proteomischen Biomarkersuche können der Dissertation von J. Reindl, sowie zahlreichen Publikationen (beispielhaft Vlahou und Fountoulakis 2005, Rifai et al. 2006) entnommen werden. Hervorzuheben ist der hohe Zeitbedarf solcher Analysen. Dieser ergibt sich aus den großen Datenmengen, bedingt durch die Vielzahl der Plasmaproteine und deren posttranslationalen Modifikationen.

3 Ziel der Arbeit

Für eine rechtzeitige Diagnose des präklinischen AS sind neue valide Diagnoseparameter notwendig, die gegenwärtig nicht verfügbar sind. Diese können aus ethischen und praktischen Gründen nicht an Kleinkindern gesucht werden. Da es sowohl Mäuse als auch Hunde mit identischen Mutationen und vergleichbaren klinischen Verläufen im Zeitraffer gibt (Gross et al. 2004 A), ist die Suche nach Biomarkerkandidaten, deren Analyse und Evaluation in derartigen Tiermodellen gut möglich. Die größere erreichbare Probenmenge des Hundemodells ist ein großer Vorteil gegenüber dem Mausmodell.

Dieser Promotionsarbeit liegt die Hypothese zugrunde, dass im Blutplasma von präklinischen AS-Hunden mit einer COL4A5-Mutation eine andere Proteinzusammensetzung feststellbar ist als bei gesunden Geschwistertieren. Darunter sollten Proteine sein, die sich als Diagnoseparameter des präklinischen AS eignen.

Deshalb sollen die Plasmaproteine von Merkmalsträgern im präklinischen Stadium und gesunden Geschwistertieren des gleichen Wurfs Proteomics-basiert semiquantitativ verglichen werden. Dazu soll die im Institut für Biochemie entwickelte und etablierte, auf Mikrotiterplatten basierende, native mehrdimensionale Proteom-Separation angewendet werden (Wendler et al. 2013). Die EDTA-Plasmaproben werden dabei zunächst zweidimensional präfraktioniert. Es folgt der enzymatische Verdau mit Trypsin und LysC und anschließend die massenspektrometrische Analyse.

Aus der zu erwartenden Vielzahl von stark unterschiedlichen Proteinen sollen Biomarkerkandidaten extrahiert werden, die zur Detektion des präklinischen AS geeignet sein könnten. Einige davon sollen mittels ELISA in präklinischen Hundeproben quantifiziert werden. Mit dieser Arbeit sollen außerdem die am Mausmodell von Muckova et al. 2015 vorgeschlagenen Biomarkerkandidaten validiert werden.

4 Methodik

Eine Übersicht über die im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte ist der Abb. 8 zu entnehmen.

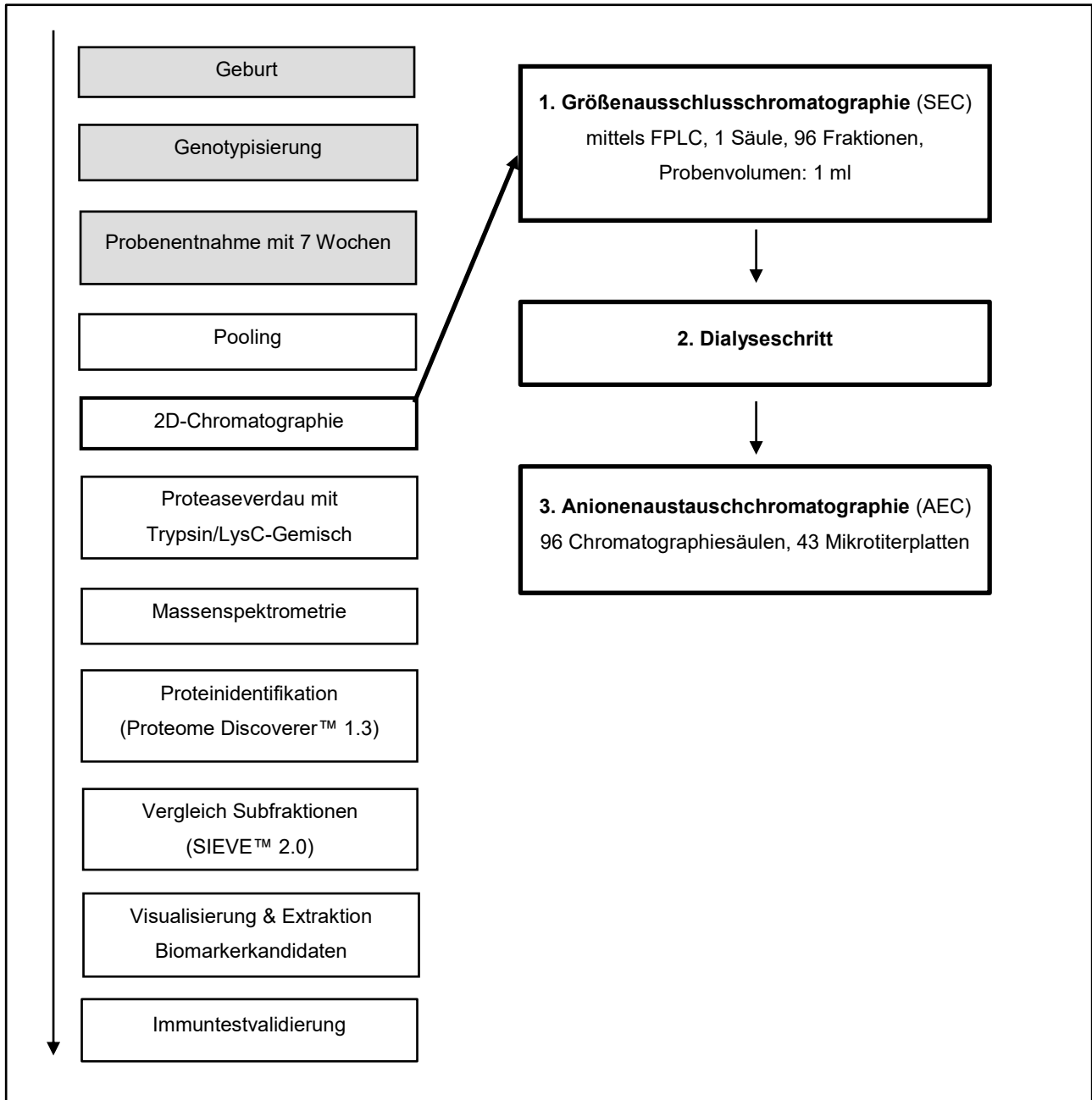


Abb. 8 Studienablauf

Dargestellt sind der Studienablauf zwischen Frühjahr 2017 und Frühjahr 2019 (links), sowie eine detaillierte Aufschlüsselung der einzelnen Arbeitsschritte der 2D-Chromatographie (rechts). Die von der University of Texas durchgeführten Arbeitsschritte sind grau unterlegt.

4.1 Einführung

Die Proben wurden uns von der veterinärmedizinischen Fakultät der University of Texas überlassen. Es handelt sich dabei um Plasmaproben von je drei 7 Wochen alten Hunden mit einer Spontanmutation für das XLAS und deren gesunden Geschwistern. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte über eine native 2D-Chromatographie. Zunächst wurden die Proteome der Plasmaproben mittels Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC) gemäß ihres Molekulargewichtes (Mr) aufgetrennt (1D). Anschließend erfolgt die Trennung nach Proteinladung (2D) über die Anionenaustauschchromatographie (*anion exchange chromatography*, AEC). Nach dem Verdau mit Proteasen wurden die Peptide der Subfraktionen massenspektrometrisch analysiert. Der anschließende Konzentrationsvergleich zwischen den Merkmalsträgern und ihren gesunden Geschwistern erfolgte mittels SIEVE™ 2.0. Aufgrund des x-chromosomalen Vererbungsmusters wurden männliche Merkmalsträger mit ihren gesunden männlichen Geschwistern verglichen. Mittels Excel-Makros konnten Ratios, Peptidanzahl und Hits visualisiert werden. Aus 164 verändert gefundenen Proteinen wurden in Zusammenschau aktueller Literatur die 34 aussichtsreichsten Biomarkerkandidaten extrahiert und drei anschließend mittels Immuntest evaluiert.

4.2 Probenkollektiv

Die Blutentnahme erfolgte über die Punktion der Vena jugularis. Das Blut wurde in EDTA-Röhrchen gesammelt, anschließend sofort gekühlt und innerhalb von 30 Minuten bei 1500 rpm für 10 min. bei 4 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Proben gekühlt und der Plasmaüberstand abgenommen. Maximal zwei Stunden nach Entnahme wurde das Plasma bei - 80 °C fixiert und so zwischen zwei und drei Wochen, ebenfalls bei - 80 °C, gelagert. Anschließend wurden die Proben in Trockeneis nach Jena verschickt, wo sie in flüssigem Stickstoff gelagert wurden. Frost-Tau-Wechsel waren zu keinem Zeitpunkt erlaubt. Um das nötige Probenvolumen zu erreichen, wurden die Plasmaproben von jeweils drei Hunden derselben Gruppe zusammengeführt (sog. *Pooling*).

4.2.1 Alporttiere

Die untersuchten Proben stammen von einer Hundekolonie mit einer natürlich vorkommenden 10 Basenpaare umfassenden Deletion auf Xq22.3. Zum Entnahmezeitpunkt des Plasmas waren die Hunde 7 Wochen alt und befanden sich, gemessen an renalen Parametern, im präklinischen Stadium.

4.2.2 Gesundes Vergleichskollektiv

Es handelt sich hierbei um genotypisch gesunde männliche Geschwisterhunde des selben Wurfes wie die Merkmalsträger.

4.3 Material

4.3.1 Präfraktionierung

- Äkta purifier™ system (GE Healthcare, München, Deutschland)
- HiLoad Superdex™ 200 column (16/60, GE Healthcare, München, Deutschland)
- 96-well deep-well-Mikrotiterplatten (Deepwell Platte 96, 1.1 ml, Polypropylen, 701350, BRAND GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland)
- TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan) (108382, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- HCl (Salzsäure rauchend 37 %, ROTIPURAN®, 4625, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- NaCl (Natriumchlorid > 99,8 %, 9265, Carl Roth)
- EDTA (E-9884, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- 96-fach Dialysekammern (Eigenentwicklung AG Proteomics) mit Membran 0,025 µm, white VSWP14250 (Merck Millipore, Billerica ,MA, USA)
- 96-well UV-Star® Microplates (655801, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland)
- 384-well UV-Star® Microplates (781801, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland)
- SpectraMax Plus³⁸⁴ (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)
- automatisierte Analyseplattform CyBio®-Robospense: Pipettierer CyBio®-Well-Roboterarm SCARA (Selective Compliance Assembly Robot Arm) (CyBio AG, Jena, Deutschland)
- Chromatographiesäule mit Toyopearl DEAE-650M (Tosoh Bioscience GmbH, Stuttgart, Deutschland; Eigenentwicklung AG Proteomics)

4.3.2 Proteaseverdau

- 96-well twin tech PCR-Mikrotiterplatten (0030128.648, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Guanidin-HCL (Guanidin-Hydrochlorid, Fluka, 50940, Sigma-Aldrich)
- Thermocycler (TB1 Thermoblock, Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland)
- Dithiothreitol (20710, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland)

- Jodacetamid (26710, SERVA)
- Mikrodialysekammern (Micro Dialyzer MD 100 Grid-Kit 48, 40840, scienova GmbH, Jena, Deutschland)
- TrypsinLysC (V5072, PROMEGA, Fitchburg, WI, USA)
- Ameisensäure (1.00264, Merck KGaA)
- Ammoniumbicarbonat (NH_4HCO_3 , 7094, Carl Roth)

4.3.3 Massenspektrometrie

- H₂O (ROTISOLV® LC-MS-Grade, AE72, Carl Roth)
- Acetonitril (ROTISOLV® HPLC Gradient Grade, 8825, Carl Roth)
- 1-Propanol (> 99,5 %, zur Synthese, 9169, Carl Roth)
- Automatisierter Probengeber Accela™ Autosampler (60057-60020, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Pumpe Thermo Scientific™ Accela 1250 (60057-60111, Thermo Fisher Scientific)
- HPLC-Säule Thermo Scientific Hypersil GOLD, 50x1 mm (Thermo Fisher Scientific)
- LTQ Orbitrap™ Discovery (Thermo Fisher Scientific)

4.3.4 Immunteste

- Nori® Canine SAA1 ELISA Kit, Produktnummer: GR115278 (Genorise Scientific Inc., Glen Mills, PA, USA)
- Canine Gelsolin (GS) ELISA Kit, Katalognummer: MBS2603447 (MyBioSource, San Diego, CA, USA)
- Cat Adiponectin (ADP) ELISA Kit, Katalognummer: MBS080454 (MyBioSource, San Diego, CA, USA)

4.3.5 Software und Datenbanken

- Microsoft Windows, Microsoft Excel, Microsoft Word (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA)
- UniProtKB (www.expasy.org)
- SoftMax® Pro (Molecular Devices)
- UNICORN™ Control Software (GE Healthcare)
- Xcalibur™ 2.1 (Thermo Fisher Scientific)
- CyBio® Composer (CyBio AG)
- SIEVE™ 2.0 (Thermo Fisher Scientific)
- Proteome Discoverer™ 1.3 (Thermo Fisher Scientific)
- In-house-Software:

- „ProteomProjekt“
- „DatumPosWandlung.exe“

4.4 Methoden

4.4.1 Präfraktionierung

Zunächst erfolgte die Trennung der Proteine nach ihrem Mr mittels SEC an einer *fast performance liquid chromatography* (FPLC)-Anlage der Firma GE-Healthcare. Eine detaillierte Zusammenfassung des Eichvorganges lässt sich der Dissertation von J. Reindl entnehmen (Reindl 2016). Bei einer individuellen Probenmenge von 0,52 ml wurden jeweils drei Proben zu einer Gesamtmenge von 1,56 ml gepoolt. Diese wurde mit 0,44 ml Pufferlösung (10 mM TRIS, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,4) ergänzt. Die verdünnte Plasmapoolprobe wurde für 10 min. bei 10000 rpm zentrifugiert. Von dem klaren Überstand wurden je 1 ml auf die Säule (HiLoad™ 16/60 Superdex 200 prep grade) aufgetragen. Die Trennung erfolgte bei 19 °C mit einer Flussrate von 1 ml/min. Das Säulenvolumen betrug insgesamt 120 ml, wobei die Sammlung der Fraktionen nach Durchlaufen des Totvolumens (ca. $\frac{1}{3}$ des gesamten Säulenvolumens) begann. Die Fraktionierung von je 600 µl pro 1D-Fraktion erfolgte in eisgekühlten 1,1 ml-deep-well-Platten mit 96 wells. Es folgte eine Absorbanzmessung bei 205, 215, 280, 340, 460 und 700 nm im Absorbanz-Reader SPECTRAmaxPLUS™, wozu aus den 96 Fraktionen je 150 µl in eine 96er UV-Star™-Platte überführt wurden. Die Messungen ermöglichten einen ersten Überblick über die Elutionsprofile, Proteingrößen und eventuelle Fehlerquellen. Zur Entsalzung der Proben zwischen dem ersten und zweiten Trennschritt der Chromatographie erfolgte ein Dialyseschritt. Näheres zu dem gewählten Verfahren ist der Dissertation von J. Reindl zu entnehmen (Reindl 2016). Die zweite Dimension der Präfraktionierung erfolgte durch die AEC, das heißt die Trennung der Plasmaproteine aller 1D-Fraktionen nach ihrer negativen Netto-Ladung mit einem Stufengradienten. Hierzu wurden Arrays von 96 Chromatographiesäulen verwendet. Die AEC-Separation erfolgte in 43 vollautomatisierten Elutionsschritten, welche in circa vier Stunden für die 1D-Probensätze gleichzeitig abgearbeitet werden konnten. Auf diese Weise entstanden pro Probe (Plasmapools der AS-Hunde, Wildtyp-Kontrolle) je 4128 2D-Fraktionen, die in je 11 Platten mit je 384 Wells aufgefangen wurden. Aufgrund des daraus resultierenden hohen Zeitbedarfs erfolgte eine Selektion der zu analysierenden Subfraktionen. Dabei sollte in mindestens einer der beiden Proben (AS-Merkmalsträger, Wildtyp-Kontrolle) die Proteinkonzentration > 0,03 mg/ml betragen. Auf diese Weise kann die Detektionsempfindlichkeit des Massenspektrometers gesichert werden. Um die Praktikabilität zu gewährleisten, wurde außerdem innerhalb der

chromatographischen Verteilungsfelder nur jede zweite Fraktion ausgewählt. Das ist möglich, weil sich jedes Protein auf mindestens drei Subfraktionen verteilt. Dennoch mussten pro Probe 655 Subfraktionen analysiert werden. Da die Proben (AS-Merkmalsträger, Wildtyp-Kontrolle) jedoch unter exakt gleichen Bedingungen aufgearbeitet, chromatographisch gemessen und miteinander verglichen werden, liefert diese Methode sichere Ergebnisse. Durch den Einschluss jeder zweiten Fraktion erklärt sich das schachbrettartige Muster der 2D-Proteinverteilung (Vgl. Abb. 9 - 12).

4.4.2 Proteaseverdau

Ziel des tryptischen Verdau ist die Generierung definierter Peptide aus allen Proteinen. Hierfür wurden 75 µl der selektierten Fraktionen mit 25 µl einer 8 M Guanidin-HCl-Lösung in einer 96er-PCR-Mikrotiterplatte vermischt und für 20 Minuten bei 90 °C im Thermoblock denaturiert. Im Anschluss wurden die Probengemische im Eisbad gekühlt. Um eine ausreichende Reduktion der Disulfidbrücken zu gewährleisten, folgten die Hinzugabe von 5 µl einer 210 mM Dithiothreitol-Lösung, sowie ein weiterer Inkubationsschritt bei 37 °C für 1 Stunde im Wasserbad. Zusätzlich mussten die freien SH-Gruppen alkyliert werden, um eine erneute Ausbildung von Disulfidbrücken zu verhindern. Diese irreversible Alkylierung erfolgte durch Hinzugabe von 5 µl einer 1,1 M Jodacetamid-Lösung und 30 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur in Dunkelheit. Daran schloss sich die Dialyse des Probengemisches in Mikrodialysatoren unter Rühren gegen 2 l einer 20 mM NH_4HCO_3 -Lösung an. Dies geschah für 60 Minuten ohne Wechsel des Dialysepuffers. Es folgte die Hinzugabe eines Trypsin/LysC-Gemisches der Firma Promega. Dafür wurde zunächst 1 mg des Enzymgemisches in 1 ml 20 mM NH_4HCO_3 gelöst. Davon ausgehend wurde anschließend eine Protease-Menge mit einem Enzym-Protein-Verhältnis von ca. 1:40 zugesetzt. Das so entstandene Gemisch inkubierte über Nacht bei 37 °C im Wasserbad. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Verdau durch Hinzugabe von 5 µl 280 mM Ameisensäure gestoppt und die Proben bis zur Analyse im Massenspektrometer bei - 80 °C eingefroren.

4.4.3 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie beruht auf der Detektion ionisierter Peptide. Hierzu müssen die verdauten Fraktionen mittels *UHPLC* aufgetrennt werden. Dies erfolgte automatisiert mittels eines Accela™-*UHPLC*-Autosampler-Systems. Die Peptide wurden dabei an einer Hypersil GOLD Säule (50x1, Partikelgröße 1,9 µm) mittels Acetonitrilgradienten separiert und das Eluat kontinuierlich in das Massenspektrometer injiziert. Anhand ihres Masse-zu-Ladung-Verhältnisses (*m/z*-ratio) können die Peptidmassen und -sequenzen daraufhin identifiziert

werden. Die methodischen Details sind hinreichend beschrieben worden (Reindl 2016). Das injizierte Probenvolumen betrug 20 µl, wobei jede Probe in einer Doppelbestimmung analysiert wurde. Ein solcher Durchlauf dauerte 30 Minuten. Zur Vermeidung von Verschleppungen wurde die Säule nach jeder Subfraktion mit Wasser beprobt. Für die interne Kontrolle wurde pro Platte (92 Proben) dreimal Transferrin mitgeführt. Für die massenspektrometrische Analyse wurde die LTQ-Orbitrap™ Discovery (Thermo Fisher Scientific) genutzt. Dieses Gerät arbeitet als Tandem-Massenspektrometer. Das heißt, es finden sich zwei hinter einander geschaltete Analysatoren, je einmal für die tryptisch erzeugten Peptide bzw. deren Fragmente. Der Bereich der erfassbaren Peptide liegt zwischen 350,00 und 1700,00 (m/z). Mittels *Top10*-Methode wurden anschließend die zehn signalintensivsten Ionen des ersten Scanvorgangs fragmentiert und die Bruchstücke analysiert. Die so gewonnenen Daten wurden von der Software Thermo Xcalibur® als Rohdateien (raw) ausgegeben.

Die Identifikation der Peptidsequenzen und daraus abgeleitet der in den Fraktionen enthaltenen Proteine erfolgte durch die Software Proteome Discoverer™ 1.3. Konnte ein Protein auf diese Weise identifiziert werden, ist mit hoher Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass es sich auch in der ausgewerteten Fraktion befindet. Die Empfindlichkeitsgrenzen und Auswertalgorithmen können jedoch die Identifikation einzelner Proteine erschweren, sodass bei fehlender massenspektrometrischer Identifikation nicht automatisch von der Abwesenheit eines Proteins ausgegangen werden kann.

4.4.4 Semiquantitativer Vergleich

Zum semiquantitativen Vergleich der identifizierten Proteine wurde das Analyseprogramm SIEVE™ 2.0 (Thermo Fisher Scientific) genutzt. Die Resultate wurden mittels zugeordneter Xcorr-Parameter (1.5, 2.0, 2.25, 2.5) gefiltert. Es wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ festgelegt. Es wurden jeweils die zwei zueinander gehörenden Fraktionen (korrespondierend, homolog, mit gleichen Koordinaten in der 2D-Matrix) miteinander verglichen, in diesem Fall von AS-Merkmalsträgern und ihren gesunden männlichen Geschwistertieren. Dies erfolgte unter Einbeziehung beider Doppelbestimmungen und unter Prüfung messtechnisch bedingter Varianzen. Generiert wurden dabei Quotienten (Ratios aus AS-Merkmalsträger/ Wildtyp-Kontrolle) der Protein-zugehörigen Signalintensitäten. Absolute Konzentrationen sind mit dem verfügbaren Equipment nicht zu erhalten. Stattdessen erhält man für jedes Protein in jeder Fraktion die Ratio und die Anzahl der diesen zugrundeliegenden Peptide und Hits (als Maß für deren Konzentration).

4.4.5 Datenanalyse

Insgesamt wurden mittels ProteomDiscoverer™ 1.3 3116 Proteine mit mindestens einem Peptid identifiziert, wobei durch SIEVE™ 2.0 1623 veränderte Proteinketten dargestellt werden konnten. Pro Fraktion wurde eine separate Excel-Tabelle mit den Ratios jedes identifizierten Proteins angelegt. Danach wurden alle Ratios aller Proteine aller Fraktionen mit den zugehörigen Koordinaten aus der 2D-Trennung in einem Datenblatt vereinigt. Durch mehrere *in-house*-Makros (G. Ditze, Forschungswerkstätten des Universitätsklinikums Jena) konnte die Verteilung der Proteine, ihre Ratios, Peptidzahlen (Peptidcount) und Hits in der 2D-Matrix visualisiert werden. Für das angewandte Verfahren kann bereits ab einer zweifachen Änderung (Ratio ≥ 2 oder ≤ 0.5) sicher gesagt werden, dass diese Werte deutlich über der experimentellen Streuung liegen. Die festgelegten Grenzen werden daher als „vom experimentellen Fehler sicher unterscheidbar“ eingestuft (Wendler et al. 2013). Im Folgenden wird hierfür die Formulierung „hoch wahrscheinlich“ verwendet.

Aufgrund der sehr großen Datenmengen wurden in diesem Promotionsvorhaben nur die 500 in AS-Tieren veränderten Proteine weiter analysiert, die die höchste Anzahl von Peptiden und Hits aufwiesen. Von besonderem Interesse sind dabei Ratios $> 4,0$ (mindestens vierfach höhere Proteinkonzentration im Plasma von AS-Merkmalsträger in der entsprechenden 2D-Fraktion im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle) bzw. $< 0,25$ (mindestens vierfach kleinere Proteinkonzentration in der entsprechenden 2D-Fraktion der AS-Merkmalsträger im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle). Proteine, die mindestens einmal eine der beiden Ratios zeigten, wurden in einer separaten gemeinsamen Tabelle zusammengeführt. Dabei wurde jede Ratio in jeder Fraktion der 2D-Matrix separat betrachtet und eingeschlossen, wenn sie > 1 Peptidcount und > 1 Hit aufwies. Proteine, die mehrfach in verschiedenen benachbarten Subfraktionen gleichsinnig verändert in AS-Tieren vorkamen, wurden dabei in sog. Clustern zusammengefasst. Ein Cluster wird definiert als räumlich zusammenhängende (z.B. im Abstand von zwei Fraktionen) gleichsinnige Veränderung der Ratios in der 2D-Matrix. Proteine, welche nur in einer einzigen Fraktion mit einem Hit, einem Peptidcount und ohne erkennbares Cluster auftraten, wurden verworfen.

Im Folgenden werden die strengen Einschlusskriterien zusammengefasst:

1. In wenigstens einer 2D-Fraktion wurde die Ratio durch SIEVE™ 2.0 mit $< 0,25$ oder $> 4,0$ (AS-Merkmalsträger/ Wildtyp-Kontrolle) bewertet.
2. Das Verhältnis der Summen aller Hits, die über alle 2D-Fraktionen/ Cluster hinweg zu höheren oder niedrigeren Konzentrationen bei Merkmalsträgern als bei den Wildtyp-Kontrollen führten, muss mindestens 10:1 zu allen jeweils gegensinnig veränderten 2D-Fraktionen betragen.
3. 2D-Fraktionen, welche Proteine enthielten, die nur in Merkmalsträgern, nicht aber in der homologen 2D-Fraktion der Wildtyp-Kontrolle vorkamen, sind besonders wesentlich und wurden mit der Zahl „99999“ markiert (in den Abb. 10 und 12 als > 100 dargestellt).
4. All jene Proteine, welche keinem Cluster zugeordnet werden konnten oder nur durch ein einziges Peptid und einen einzigen Hit identifiziert worden sind, wurden von der Analyse ausgeschlossen.
5. Als „unverändert“ wurden all jene Proteine bewertet, welche mindestens zehnmals mehr Hits innerhalb des Bereiches zwischen 0,25 und 4,0 als darüber hinausgehend aufwiesen.

Als hochverdächtig galten in dieser Untersuchung Proteine, die nahezu ausschließlich Erhöhungen oder Erniedrigungen in AS-Proben zeigen. Aufgrund der späteren klinischen Anwendbarkeit der potentiellen Biomarker lag das besondere Augenmerk auf den Erhöhungen, da diese mittels ELISA sicherer zu detektieren sind. Aber auch Proteine mit mehreren Clustern sind interessant, da sich dahinter pathognomonische Proteinvarianten, sog. Proteoformen, verbergen können, die durch die Präfraktionierung aufgetrennt wurden.

Zusätzlich wurden in Tab. 2 all jene identifizierten Proteine aufgeführt, die in den untersuchten Proben zwar nicht alle genannten strengen Kriterien erfüllten, jedoch in früheren Untersuchungen als potentielle Biomarker vorgeschlagen worden sind (Muckova et al. 2015, Pohl et al. 2013, Smets et al. 2010, Brandt et al. 2014, Ferlizza et al. 2015). Soweit möglich, wurden alle Proteine gemäß ihrer biologischen Funktion gruppiert. Einzelne Proteine könnten dabei mehrfach zugeordnet werden, sind der Einfachheit halber aber entsprechend nur einer ihrer Funktionen gruppiert worden. Die Charakterisierung der Proteine wurde mittels der Datenbank UniProtKB (www.expasy.org) durchgeführt. Jene Sequenzen von sogenannten „uncharakterisierten“ Proteinen, für die keine passenden

homologen Proteine gefunden wurden, sind im Anhang als Tabelle 5 „Übersicht der veränderten uncharakterisierten Proteine“ zusammengefasst.

Aufgrund der umfangreichen Datenmenge erfolgte in Zusammenschau aktueller Literatur eine weitere Eingrenzung auf klinisch potentiell verwertbare Markerkandidaten, welche in Tab. 3 „Übersicht potentieller Biomarkerkandidaten“ zusammengefasst sind. Basierend auf der aktuell vorhandenen Datenlage erfolgte die Auswahl von drei Markerkandidaten, Serum-Amyloid A, Gelsolin und Adiponektin, welche einer Immuntestevaluierung zugeführt wurden.

4.4.6 Immuntestevaluierung

Die Verifizierung der potentiellen Biomarker Serum-Amyloid A, Gelsolin und Adiponektin erfolgte mittels kommerziell erwerbbarer Sandwich-ELISA-Kits der Firmen Genorise Scientific Inc. (Serum-Amyloid A) und MyBioSource Inc. (Gelsolin, Adiponektin). Zunächst erfolgte eine Vorvalidierung mit jeweils zwei Proben und je vier Verdünnungen. Bei erfolgreichem Nachweis des Proteins in den Plasmaproben schließt sich die eigentliche Quantifizierung an. Die Probenvorbereitung und Testdurchführung erfolgten gemäß der Herstellerangaben. Zur Kalibrierung wurde jeweils eine Standardreihe mitgeführt. Die Absorbanzmessung wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm an dem Gerät SpectraMax Plus³⁸⁴ vorgenommen. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors wurden im Anschluss die Konzentrationen der Analyten berechnet. Dieses Prozedere erfolgte jeweils als Doppelbestimmung für die verwendeten Proben.

5 Ergebnisse

5.1 zusammenfassende Übersicht der Biomarkerkandidaten

Von den 500 analysierten Proteinen wurden all jene extrahiert, die im Vergleich zwischen männlichen Merkmalsträgern und ihren gesunden männlichen Geschwistern als „deutlich unterschiedlich“ bewertet worden sind. Proteine, welche als eher unspezifisch gelten (beispielhaft Albumin) wurden von der weiteren Betrachtung ausgeschlossen. Auch Immunglobulinketten, welche zwar zahlreich als verändert nachgewiesen werden konnten, besitzen aufgrund der nicht möglichen Charakterisierung ihrer Spezifität für uns keine analytische Verwertbarkeit. Die verbleibenden 164 veränderten Proteine sind in Tab. 2 „Übersicht veränderter Proteinkonzentrationen“ zusammengefasst. Von besonderem Interesse sind dabei jene Proteine, die ausschließlich gleichsinnige Ratios (entweder erhöht oder erniedrigt) zeigen. In Tab. 2 sind sie in der Spalte „Anm.“ mit den Buchstaben **A** (ausschließlich erniedrigte Ratios in der gesamten 2D-Matrix) bzw. **B** (ausschließlich erhöhte Ratios in der gesamten 2D-Matrix) markiert. In der Spalte „Tendenz“ findet sich eine Zusammenfassung jeder einzelnen Ratio inklusive Hits und Peptidcounts zu einer Gesamttendenz hinsichtlich der Konzentrationsänderung in AS-Merkmalsträgern. Innerhalb der 2D-Matrices vieler Proteine zeigen einzelne Subfraktionen gegenläufige Ratios. Diese werden in der Spalte „Tendenz“ aufgrund möglicher relevanter Proteinmodifikationen ebenfalls aufgeführt, müssen aber in der weiterführenden Evaluation genauer untersucht und gegebenenfalls als eigenständige Biomarkerkandidaten betrachtet werden. Einige Proteine konnten zudem mit mehreren IDs nachgewiesen werden. Die entsprechenden Protein-IDs finden sich in diesen Fällen zusammengefasst in Tab. 2 wieder. All jene Markerkandidaten, für die sich eine Immuntestevaluierung in dieser Promotionsarbeit anschließt, sind in Tab. 2 grün hinterlegt. Aussichtsreiche Biomarkerkandidaten, für die eine zukünftige Immuntestevaluierung sinnvoll erscheint, sind gelb hinterlegt.

Tab. 2: Übersicht veränderter Proteinkonzentrationen

gemäß Auswertung mit SIEVE™ 2.0, soweit möglich gruppiert nach der Proteinfunktion es gelten die in 4.4.5 verwendeten Kriterien; A: ausschließlich erniedrigte Ratios im gesamten Template; B: ausschließlich erhöhte Ratios im gesamten Template; Bedeutung Pfeile: ↓/↔/↑ = Ratio < 0,25/ Ratio = 0,25 - 4,0/ Ratio > 4,0 in AS-Merkmalsträgern im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle; ✓ = Tendenz Erniedrigung, ↗ = Tendenz Erhöhung der Proteinkonzentration in AS-Merkmalsträgern; Die Tendenz ergibt sich, wenn zwar deutlich unterschiedliche Ratios zwischen AS-Merkmalsträger und Wildtyp-Kontrolle nachweisbar, aber die strengen Kriterien aus 4.4.5 nicht erfüllt worden sind.

Protein-ID	Proteinname	Tendenz	Anm.
Positive Akute-Phase-Proteine			
F6Y713	Alpha_1_acid glycoprotein	✓	
Q6PXD8	Ceruloplasmin (Fragment)	✓	
F1PY40/ E2R7A3	Complement factor I	✓	
J9P1G2	Complement C1q B chain	✓	
E2RJC2	Complement C1q C chain	✓	
F1PNG7	Complement C1r	✓	
E2RGT6	Complement C6	✓	
E2RG01	Complement C7	✓	
F1PGM9	Complement component 4 binding protein alpha	✓	
J9NYG8	Complement component 4 binding protein beta	✓	
E2RH18	Complement factor properdin	✓	
F1PW65	Fibrinogen beta chain	✓	
F1P8G0	Fibrinogen gamma chain	✓	
G1K2D9	Haptoglobin	✓	
F1PZC6	Histidine rich glycoprotein	✓	

Protein-ID	Proteinname	Tendenz	Anm.
F1PAX2	Ceruloplasmin	↓	
J9P4B4	Complement C1q A chain	↓	A
F1P6E1	Complement C1s	↓	A
F1PIX8	Complement C3	↓	
E2R141	Complement C8 beta chain	↓	
F6XKC0	Complement C8 gamma chain	↓	A
T2KEN6	Pentraxin	↗	
J9P8Z6	Complement C9	↑	B
J9NVE9	Serum amyloid A protein	↑	B
Q8WMR1/A0A0H 4NYY6	Plasminogen (Fragment)	↗↘	
A1ILJ0	Alpha 1 antitrypsin	↓↑	
F6UME0	Alpha_2_macroglobulin	↓↑	
F1PBL4/ J9NRV7	Fibrinogen alpha chain	↓↔↑	
F1P7J4	Complement C5	↓↔	
F1PZR4	Hemopexin	↓↔	
F1Q421	Plasminogen	↓↔	
Negative Akute-Phase-Proteine			
J9P430	Transferrin	↓↑	
E2R4E7	Afamin	↓↔↑	
F1Q4D9	Retinol binding protein 4	↓↔	
E2R5U8	Transthyretin	↓↔	
Immunsystem			

Protein-ID	Proteinname	Tendenz	Anm.
E2QWN7	Lymphocyte cytosolic protein 1	↘	
Q8MJZ1	Polymeric immunoglobulin receptor (Fragment)	↘	
F1PEH8	Proline_serine_threonine phosphatase interacting protein	↘	A
F1PSS2	Thrombospondin 4	↘	A
E2RJE0	Cartilage oligomeric matrix protein	↓	A
Q5I2D7	CD56 140 kDa isoform	↓	A
Extrazelluläre Matrixbestandteile			
F1Q3I5	Collagen type 1 alpha 1 chain	↗	
F1PLT8	Sulfhydryl oxidase	↗	
F1PHY1	Collagen type I alpha 2 chain	↑	
F1PJH3	Collagen type XIII alpha 1 chain	↑	B
J9NUI6/ F1Q418/F1PG39/ J9P7I3/H9GWW4/ H9GWY3/ H9GWY1	Inter_alpha_trypsin inhibitor heavy chains 1-4	↓	
J9P8M2/ F1P6H7	Fibronectin	↓↑	
E2R416	Lumican	↓↑	
E5G723	Collagen type 1 alpha 1 (Fragment)	↓↔↑	
Q2YF02	Vitronectin (Fragment)	↗↓	
Signaltransduktion			
E2RJ91	BTB domain containing 7	↘	

Protein-ID	Proteinname	Tendenz	Anm.
J9P559	Diphosphoinositol pentakisphosphate kinase 2	↘	
J9PAK7	Guanine nucleotide_binding protein subunit gamma	↘	
F1PGJ8	Leucine rich repeat and coiled_coil centrosomal protein 1	↘	
F1P8X1	Serine/threonine_protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B	↘	
F6XG82	Strawberry notch homolog 2	↘	
E2RFB7	Amine oxidase	↓	
J9P2L4	HtrA serine peptidase 1	↓	A
E2RT77	Junction mediating and regulatory protein_ p53 cofactor	↓	A
F1PEM3	Tyrosine_protein kinase	↗	
J9NWC1	MOB kinase activator 2	↗	
J9P8A0	Non_SMC condensin II complex subunit D3	↗	
E2R8G0	SNF2 histone linker PHD RING helicase	↗	
E2QV33	Mediator complex subunit 22	↑	B
F1PPD2	Striatin	↘↗	
B5U1S6	Adiponektin (Fragment)	↓↔↑	
E2QYU2	Clusterin	↑↔↓	
J9NTU3	FGFR1OP N_terminal like	↓↔	
Chemotaxis			
H2BF45	Attractin (Fragment)	↓	

Protein-ID	Proteinname	Tendenz	Anm.
J9NSS7	Leucine rich alpha_2_glycoprotein 1	↗	
E2RLY1	Cysteine protease	↕	
Blutgerinnung			
F1PKX3	Coagulation factor XIII A chain	↘	
F1Q041	Coagulation factor XIII B chain	↘	
Q9TUN8	Glykoprotein GPIIb	↘	
F1Q4A3	Coagulation factor X	↓	
F1PSS8	Protein S (alpha)	↓	
Q7M321	Plasmin (Fragment)	↗	
J9NSF9	Prothrombin	↕	
Zytoskelett			
F1Q2P6	Dynein axonemal heavy chain 6	↘	A
E2RP26/ J9P5S3	Filamin C	↘	A
F1PTY1	Keratin_type II cytoskeletal 1	↘	
J9NYC0	Microfibril associated protein 4	↘	
Q076A5	Myosin_4	↘	
F1P9J3	Myosin_9	↘	A
E2R7I7	Nuclear prelamin A recognition factor like	↘	
J9P669	Cadherin 5	↓	
F1PLV6	Fibulin_1	↓	A
E2RLA5	Golgi membrane protein 1	↓	
J9P319	Osteomodulin	↓	A

Protein-ID	Proteinname	Tendenz	Anm.
Q076A1	Alpha_cardiac myosin heavy chain (Fragment)	↗	
J9NV47/ F1Q1K9	Hyaluronan binding protein 2	↗	B
J9P187	Myosin IXA	↗	
F1PE53	Rho associated coiled_coil containing protein kinase 2	↗	
F1PV43	Capping actin protein of muscle Z_line alpha subunit 3	↑	B
J9P216	Formin	↙↗	
F1PYU9	Keratin_type I cytoskeletal 10	↙↗	
J9P5V6	Talin 1	↙↗	
F6Y3P9	Gelsolin	↑↔↓	
E2RK02	Glycosylphosphatidylinositol specific phospholipase D1	↓↔	
Zellzyklus			
E2QTQ1	Ankyrin repeat and BTB domain containing 1	↙	A
F1Q4B9	Centlein	↙	
F1P9C3	Centrosome and spindle pole associated protein 1	↙	
E2RNY6	DIS3 homolog_exosome endoribonuclease and 3_5 exoribonuclease	↙	
E2QUR2	Glutamyl_prolyl_tRNA_synthetase	↙	
J9NZY7	Midasin	↙	A
E2RKW5	Nuclear receptor corepressor 1	↙	

Protein-ID	Proteinname	Tendenz	Anm.
F6V533	Structural maintenance of chromosomes 1B	↙	
J9P8U1	Tudor domain containing 9	↙	
E2REP7	Zinc finger with KRAB and SCAN domains 2	↙	A
E2QXT4	DexH_box helicase 58	↗	B
J9NYQ5	Growth arrest specific 2 like 3	↗	
E2RQR3	Leucyl_tRNA synthetase 2_mitochondrial	↗	
J9P393	Staufen double_stranded RNA binding protein 1	↗	B
J9JHU7	Centromere protein E	↙↗	
J9P002	Centrosomal protein 152	↙↗	
J9PAD2	Mediator complex subunit 12	↙↗	
E2R3P0	NOC2 like nucleolar associated transcriptional repressor	↙↗	
Sonstige			
Q7M310	Angiotensin I (Fragment)	↙	
F1PQF9	Anoctamin	↙	
J9NWZ8	Asparagins synthetase domain containing 1	↙	A
J9PB14	Biotinidase	↙	A
E2R8W7	Calcium binding protein 39	↙	
F1PYB2	Cilia and flagella associated protein 46	↙	
Q076A8	Developmental myosin heavy chain embryonic	↙	
J9P3P3	FUN14 domain containing 2	↙	A
E2RKQ6	Galectin 3 binding protein	↙	

Protein-ID	Proteinname	Tendenz	Anm.
J9P028	Glutathionperoxidase	↘	
E2R886	Kininogen 1	↘	
J9NS32	Leucine rich repeat and Ig domain containing 2	↘	A
F1PAQ3	Maltase_glucoamylase	↘	
J9PB32	Striatin	↘	A
F1PCE5	Serpin family A member 1	↘	
E2RES2	Serpin family C member 1	↘	
J9P8Q8	Serpin family D member 1	↘	
F1PXC8	WWC family member 3	↘	A
E2RAK7	Apolipoprotein A_II	↓	
F1P8Z5	Apolipoprotein B	↓	
P56595	Apolipoprotein C_I	↓	
J9NWJ6	Apolipoprotein C_II	↓	
F1PJ74/ P18649	Apolipoprotein E	↓	
E2RQ71	Apolipoprotein M	↓	
F1PPE5	Bioorientation of chromosomes in cell division 1 like 1	↗	
E2RPB8	C-type lectin domain family 3 member	↗	
A0A1K0FUG1	Globin A1	↗	
A0A1K0GGH0	Globin A2	↗	
F1PAF3	Hepatocyte growth factor activator	↗	
E2RK65	Kelch like family member 8	↗	

Protein-ID	Proteinname	Tendenz	Anm.
F1PGN5	Protein tyrosine phosphatase_receptor type Z1	↗	B
E2RCK4	RB1 inducible coiled_coil 1	↗	
F6V049	Alpha Mannosidase	↘↗	
F1PXN2	Alpha Fetoprotein	↘↗	
F1PAL5	Angiotensinogen	↘↗	
Q95159/ Q9TV65	Angiotensinogen (Fragment)	↘↗	
J9P843/ F1PDJ5/P02648	Apolipoprotein A_I	↘↗	
W8VYQ1	Apoptosis inhibitor of macrophage	↕↔↘	
E2RE76	Apolipoprotein A_IV	↘↔↗	
E2RE76	Apolipoprotein A_IV	↘↔↗	
F1PA63	Lecithin_cholesterol acyltransferase	↘↔	
Q2VDR4/ Q2VDN1	Apolipoprotein B (Fragment)	↘↔	
A0A0M5JRC1	Apolipoprotein B_100 (Fragment)	↘↔	
F1PDJ0	Apolipoprotein C_III	↘↔	
D5G334	Apolipoprotein E4 (Fragment)	↘↔	
F1PYM4	Insulin like growth factor binding protein acid labile subunit	↘↔	
F1PNV5	Kallikrein B1	↘↔	
Q2VDR4/ Q2VDN1	Apolipoprotein B (Fragment)	↘↔	
A0A0M5JRC1	Apolipoprotein B_100 (Fragment)	↘↔	

Die Verteilung der Proteine in der 2D-Matrix, inklusive erhöhter bzw. erniedrigter Ratios ist exemplarisch in Abb. 9 für Serum-Amyloid A, in Abb. 10 für Gelsolin und in Abb. 11 für Adiponektin gezeigt. Abb. 12 zeigt die 2D-Proteinverteilung des Haptoglobins. Dies soll beispielhaft zur Veranschaulichung einer Verteilung ohne eindeutige Tendenz zur Konzentrationserhöhung oder - Erniedrigung dienen.

Abgebildet sind dabei relevante Auszüge aus der 2D-Verteilung der jeweiligen Proteine. In grüner Schrift dargestellt sind jene Ratios, die eine höhere Proteinkonzentration in AS-Merkmalsträgern im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle widerspiegeln. Sind die entsprechenden Werte zusätzlich grün hinterlegt, werden sie als „hoch wahrscheinlich“ eingestuft (beispielhaft Vgl. Abb. 9). In AS-Merkmalsträgern erniedrigte Proteinkonzentrationen werden in roter Schrift abgebildet und gelb hinterlegt, wenn diese als „hoch wahrscheinlich“ gelten (beispielhaft Vgl. Abb. 10). Jene Werte, die nach den festgelegten Kriterien als unverändert gelten, werden in den Abbildungen 9 - 12 in schwarzer Schrift abgebildet. Von besonderem Interesse sind zudem Proteoformen, welche nur in AS-Merkmalsträgern, nicht aber in der Wildtyp-Kontrolle vorkommen. Die entsprechenden Ratios werden in der 2D-Proteinverteilung als > 100 dargestellt.

JANVED_CANLF Serum amyloid A protein OS=Canis lupus familiaris GN=LOC102153886 PE=3 SV=1																			Mr (kDa)
1	2	3	18	19	20	21	22												Mr (kDa)
R	P	H	R	P	H	R	P	H	R	P	H	R	P	H	R	P	H		
33																			
34																			
35																			
36																			
37																		382	
38																		362	
39																		344	
40																			
41																		309	
42																			
43																			
44																			
45																		251	
46																			
47																			
48																			
49																		203	
50																			
51																		183	
52																			
53																		165	

Abb. 9 Auszug aus 2D-Verteilung für Serum-Amyloid A
 R: Ratio aus AS-Merkmalsträger/Wildtyp-Kontrolle; P: Peptidcount H: Hits; Mr: Molekulargewicht in kDa; ; schwarze Umrandung veranschaulicht beispielhaft Cluster; > 100: Division durch 0.

F6Y3P9_CANLF Gelsolin OS=Canis lupus familiaris GN=GSN PE=4 SV=1																	Mr
2	3	8	9	17	18	19	19	18	17	17	18	18	19	19	18	17	Mr
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	(kDa)
1																	
53																	
54	0,05	2	3														148
55				0,08	3	4											141
56																	
57													0,74	10	42		
58											1,33	8	22				
59									1,34	5	26			0,43	21	105	
60												0,07	21	137			108
61																	103
62																	97
63																	92
64																	
65																	
66																	
67																	
68																	
69																	

Abb. 10 Auszug aus der 2D-Verteilung für Gelsolin
 Details siehe Abb. 9.

B5U1S6_CANILU_Adiponectin (Fragment) OS=Canis lupus PE=2 SV=1												Mr (kDa)						
1			2			3			23			24			25			Mr (kDa)
R	P	H	R	P	H	R	P	H	R	P	H	R	P	H	R	P	H	
16																		
17																		
18																		
19																		
20																		884
21																		
22																		
23																		
24																		
25																		
26																		
27																		
28																		
29																		551
30																		
31																		
32																		
33																		
34																		
35																		
36																		
37																		
38																		
39																		

Abb. 11 Auszug aus der 2D-Verteilung für Adiponektin
 Details siehe Abb. 9.

G1K2D9_CANLF Haptoglobin OS=Canis lupus familiaris GN=LOC479668 PE=3 SV=1																						
	2		3		9		10		11		12		15		16		17		18		Mr	
	R	P	H	R	P	H	R	P	H	R	P	H	R	P	H	R	P	H	R	P	H	(kDa)
1																						
43																						264
44	0,47	7	44	0,23	20	178																6,45
45				0,54	10	33	0,44	2	13													5
46	12,8	3	5	4,79	5	16	4,24	5	26	341	1	2										16
47	2,47	5	17	4,06	15	64	8,3	5	38	1	1	8	2,27	3	19	1,84	16	219				238
48				4,06	15	64	8,3	5	38	1	1	8	2,27	3	19	1,84	16	219				226
49				4,06	15	64	8,3	5	38	1	1	8	2,27	3	19	1,84	16	219				214
50	0,05	14	95	0	15	124	2831	2	10				3,16	19	144	0,49	28	532	19	12	85	203
51				0	15	124	2831	2	10				3,16	19	144	0,49	28	532				193
52	0	16	148	0,16	17	134	>100	1	8	20,9	14	53	3,2	20	162	1,9	24	341	11	9	42	183
53				0,16	17	134	>100	1	8	20,9	14	53	3,2	20	162	1,9	24	341	0	21	216	174
54	1,27	20	170	0,03	14	111							3,2	20	162	1,9	24	341	0,14	11	46	165
55				0,03	14	111							3,2	20	162	1,9	24	341				156
56	1,27	10	58	2,81	4	7							3,2	20	162	1,9	24	341	985	7	28	148
57				2,81	4	7							3,2	20	162	1,9	24	341				141
58				2,81	4	7							3,2	20	162	1,9	24	341				134
59				2,81	4	7							3,2	20	162	1,9	24	341				127
60				2,81	4	7							3,2	20	162	1,9	24	341				120
61				2,81	4	7							3,2	20	162	1,9	24	341				114
62				2,81	4	7							3,2	20	162	1,9	24	341				108
63				2,81	4	7							3,2	20	162	1,9	24	341				103
64				2,81	4	7							3,2	20	162	1,9	24	341				97
65				2,81	4	7							3,2	20	162	1,9	24	341				92
66				2,81	4	7							3,2	20	162	1,9	24	341				88
				2,81	4	7							3,2	20	162	1,9	24	341				83
				2,81	4	7							3,2	20	162	1,9	24	341				79

Abb. 12 Auszug aus der 2D-Verteilung für Haptoglobin
 Details siehe Abb. 9.

5.1.1 Übersicht potentieller Biomarkerkandidaten

Tab. 3 enthält die Zusammenfassung potentiell wertvoller Biomarker aus Tab. 2. Dabei sind all jene Proteine besonders hervorzuheben, welche ausschließlich höhere Konzentrationen in Merkmalsträgern zeigen oder bei denen der überwiegende Teil eine Ratio > 4,0 verzeichnet. Jene Proteine sind aufgrund der besseren analytischen Verwertbarkeit von besonderem Interesse für die weitere Evaluation. In Tab. 3 sind sie blau hinterlegt. Jene Proteine, für die sich in dieser Promotionsarbeit eine Immuntestevaluierung anschließt, sind in Tab. 3 grün hinterlegt. Proteine, die die restlichen Kriterien in 4.4.5 erfüllen und/ oder aufgrund früherer Studien als potentielle Marker zu bewerten sind, werden ebenfalls mit aufgeführt.

In Zusammenschau unserer Ergebnisse und der aktuellen Literatur sind Serum-Amyloid A (SAA), sowie Gelsolin (GSN) und Adiponektin hervorzuheben und werden im nachfolgenden gesondert besprochen.

Tab. 3: Übersicht potentieller Biomarkerkandidaten

es gelten die in 4.4.5 verwendeten Kriterien; Bedeutung Pfeile: siehe Tab. 2; ✓ = Immuntest kommerziell erhältlich.

Protein-ID	Proteinname	Tendenz	Immuntest Verfügbarkeit
Erhöhte Ratios in AS-Merkmalsträgern			
J9NV47/F 1Q1K9	Hyaluronan binding protein 2	↗	✓
E2R8G0	SNF2 histone linker PHD RING helicase	↗	
F1Q3I5	Collagen type 1 alpha 1 chain	↗	✓
Q076A1	Alpha_cardiac myosin heavy chain (Fragment)	↗	✓
T2KEN6	Pentraxin	↗	✓
J9NWC1	MOB kinase activator 2	↗	
E2RQR3	Leucyl_tRNA synthetase 2_mitochondrial	↗	✓
F1PLT8	Sulfhydryl oxidase	↗	✓

Protein-ID	Proteinname	Tendenz	Immuntest Verfügbarkeit
J9P187	Myosin IXA	↗	
F1PEM3	Tyrosine_protein kinase	↗	✓
J9NSS7	Leucine rich alpha_2_glycoprotein 1	↗	✓
F1PV43	Capping actin protein of muscle Z_line alpha subunit 3	↑	
F1PHY1	Collagen type I alpha 2 chain	↑	✓
F1PJH3	Collagen type XIII alpha 1 chain	↑	✓
J9P8Z6	Complement C9	↑	✓
E2QV33	Mediator complex subunit 22	↑	✓
J9NVE9	Serum amyloid A protein	↑	✓
Erniedrigte Ratios in AS-Merkmalsträgern			
Q7M310	Angiotensin I (Fragment)	↘	✓
F1PSS2	Thrombospondin 4	↘	
F1PY40/E 2R7A3	Complement factor I	↘	
J9P319	Osteomodulin	↓	✓
F1P6E1	Complement C1s	↓	
Sowohl erhöhte als auch erniedrigte Ratios in AS-Merkmalsträgern			
F1PAL5	Angiotensinogen	↗↘	
Q9TV65/Q 95159	Angiotensinogen (Fragment)	↗↘	
J9P5V6	Talin 1	↗↘	✓
B5U1S6	Adiponektin (Fragment)	↓↔↑	✓

Protein-ID	Proteinname	Tendenz	Immuntest Verfügbarkeit
E2QYU2	Clusterin	↓↔↑	✓
E5G723	Collagen alpha 1 type I (Fragment)	↓↔↑	✓
J9P8M2/F 1P6H7	Fibronektin	↓↑	✓
F6Y3P9	Gelsolin	↓↔↑	✓
F1PZR4	Hemopexin	↓↔	✓
F1PNV5	Kallikrein B1	↓↔	✓
F1Q4D9	Retinol binding protein 4	↓↔	✓
F1PA63	Lecithin_cholesterol acyltransferase	↘↔	
J9P430	Transferrin	↓↑	✓

5.2 Evaluierung ausgewählter Biomarkerkandidaten

Nach Auswahl der 34 potentiellen Biomarker (Vgl. Tab. 3) erfolgt aufgrund der zeitnahen Erwerbbarkeit von nur wenigen Testkits eine Eingrenzung auf drei vielversprechende Markerkandidaten zur Immuntestevaluierung. Basierend auf den Proteinverteilungen werden Serum-Amyloid A (ausschließlich erhöhte Ratios in Merkmalsträgern) und Gelsolin (bis zu 90-fach erhöhte Ratios in AS-Merkmalsträgern) ausgewählt. Adiponektin wird wegen seiner Effekte auf Glomeruli ebenfalls in die Immuntestevaluierung einbezogen.

5.2.1 Auswertung Immuntestevaluierung

Nachfolgend sind die Ergebnisse der Immuntestevaluierung mittels ELISA dargestellt. In den mitgeführten Eichreihen gelang jeweils verdünnungsabhängig der Nachweis unterschiedlicher Standardkonzentrationen, sodass prinzipiell davon ausgegangen werden kann, dass die Immunteste funktioniert haben. Mit Plasmaproben gelang hingegen nur der Nachweis von Gelsolin und Adiponektin.

5.2.1.1 Serum-Amyloid A

Für die Serumproben gelang mit dem erworbenen Testkit in keiner der Verdünnungen ein Nachweis des SAA.

5.2.1.2 Gelsolin

Zwar konnte GSN in den Plasmaproben in allen Verdünnungen nachgewiesen werden, jedoch sind die gemessenen Konzentrationen nicht verdünnungslinier. Daher sollten Aussagen daraus nur mit Vorsicht abgeleitet werden. Stattdessen bedarf es weiterer Immunteste verschiedener Hersteller, die verlässliche Messungen zulassen.

5.2.1.3 Adiponektin

Auch für das Adiponektin gelang der Nachweis mittels ELISA. Jedoch wurden sowohl in den Plasmaproben der AS-Merkmalsträger als auch der Wildtyp-Kontrolle Adiponektinkonzentrationen von rund 4 ng/ml gemessen. Damit ist mit dem verwendeten Test kein eindeutiger Unterschied zwischen Merkmalsträgern und Wildtyp-Kontrolle feststellbar. Aufgrund fehlender Verfügbarkeit wurde zudem ein Testkit verwendet, welches zwar spezifisch für das Katzenadiponektin ist, aufgrund starker Homologien der Proteine jedoch auch beim Hund Anwendung finden kann.

6 Diskussion

6.1 massenspektrometrisch identifizierte Biomarkerkandidaten

In Zusammenschau aktueller Literatur, sowie dem Verhalten innerhalb der 2D-Proteinverteilungen wurden die bedeutendsten Markerkandidaten ausgewählt und werden im Folgenden eingehend besprochen. Dabei sind in den Proben präklinischer AS-Merkmalsträger proteomisch bereits Zeichen der Gewebsinflammation, Fibrose und des Zelluntergangs nachweisbar. Anzeichen einer Filtrationsstörung können hingegen noch nicht nachgewiesen werden.

6.1.1 Akute Phase Proteine

Komplementsystem: Das Komplementsystem gehört zum angeborenen Immunsystem (Xavier et al. 2017). Es wird u.a. durch körperfremde Strukturen, Zellschädigung und Immunglobuline aktiviert (Ricklin et al. 2010), nimmt Einfluss auf das adaptive Immunsystem (Ricklin et al. 2016, Sim et al. 2016) und trägt zur Inflammation bei (Xavier et al. 2017). Der C1-Komplex besteht aus drei Untereinheiten, C1s, C1r und C1q. C1q bindet Immunglobuline und aktiviert kaskadenartig C1r und C1s. Zudem fördert C1q die Gewebspermeabilität, Proliferation und Migration von EC und steigert die Produktion proinflammatorischer Zytokine (Xavier et al. 2017). Rezeptoren für C1q sind u.a. auf der Oberfläche renaler MC zu finden (Prodinger et al. 2003). Obwohl der Großteil der zirkulierenden Komplementfaktoren (KF) von der Leber synthetisiert wird (Zhou et al. 2001), gelang in der Vergangenheit der Nachweis diverser extrahepatischer Syntheseorte, darunter auch der Niere (Morgan und Gasque 1997, Naughton et al. 1996). So konnte *in vitro* gezeigt werden, dass KF sowohl glomerulär (Sacks et al. 1993 A, Zhou et al. 1993), tubulär (Brooimans et al. 1991, Seelen et al. 1993), als auch epithelial (Sacks et al. 1993 B) und mesangial (van den Dobbelen et al. 1994) synthetisiert werden. Deren gegebenenfalls unterschiedliche molekulare Merkmale könnten zukünftig hinweisend auf den Ort der Schädigung innerhalb des Glomerulus sein.

Als Akute Phase Proteine (APP) steigt die Plasmakonzentration der KF im Rahmen einer Inflammation an (Zhou et al. 2001).

Xavier et al. wiesen eine gesteigerte Synthese aller drei C1-Subtypen durch interstitielle Zellen und PDGFR- β -positive Perizyten im Rahmen einer Nierenfibrosierung bei Mäusen nach (Xavier et al. 2017). In menschlichem Plasma konnte zudem eine erhöhte Konzentration von C1r und C1s bei Patienten im CKD Stadium II-III und Stadium V unter

Hämodialyse gemessen werden (Song et al. 1998). In Urin- und Serumproben von Patienten mit IgA-Nephropathie und CKD-Patienten zeigte sich eine erhöhte Konzentration der KF C5b-9. Die Höhe der Urinexkretion dieser Faktoren korreliert dabei invers mit der geschätzten glomerulären Filtrationsrate und positiv mit der Menge an Retinol-bindendem Protein (RBP) im Urin der Patienten (Wen et al. 2018). Pohl berichtete von einer Erhöhung der KF 3 und 6 im Serum von AS-Patienten (Pohl 2008). Von einigen Autoren wird eine Überfunktion des Komplementsystems als mögliche Ursache progredienter Gewebsschädigung diskutiert (Ricklin und Lambris 2013, Noris und Remuzzi 2013). In diesem Zusammenhang ist das Complement-binding protein 4 von besonderem Interesse. Es blockiert die Spaltung von C3 und C5, inhibiert damit die Assemblierung des Membran-attackierenden-Komplexes und schützt die Zellen so vor einer komplementbedingten Selbstschädigung (Zhou et al. 2001).

Bisher wurde überwiegend die Urinexkretion von KF untersucht. Ein vermehrtes Auftreten von KF im Urin bei manifestem AS zeugt jedoch vermutlich von einer bereits geschädigten Nierenfiltrationsbarriere und eignet sich somit nicht zur Diagnostik des präklinischen AS.

In dieser Studie wurden zahlreiche, hauptsächlich erniedrigte und wenige teils erhöhte Ratios im Plasma der AS-Merkmalsträger nachgewiesen. Die erniedrigten Ratios könnten auf einen Verbrauch der KF hindeuten. Erhöhte Ratios fanden sich hingegen in dieser Untersuchung u.a. für den KF 9. Dies stützt die Ergebnisse früherer Untersuchungen an CKD-Patienten. Die Konzentrationserhöhung des Complement-binding protein 4 alpha könnte als Schutzmechanismus vor Endoproteolyse interpretiert werden. Daher sollten diese zwei Proteine künftig näher untersucht werden, gegebenenfalls mit Unterscheidung einzelner höher konzentrierter Proteoformen.

Hemopexin: Hemopexin gehört zu den APP (Tolosano et al. 2010) und wird, außer in der Leber, u.a. auch nach TNF- α -Stimulation aus MC freigesetzt (Kapojos et al. 2003). Dabei scheint es am Nephrin-abhängigen Remodeling des Aktinzytoskeletts der PZ beteiligt zu sein (Lennon et al. 2008). Zudem wird Hemopexin eine Proteaseaktivität zugeschrieben, welche u.a. mit der *minimal change disease* in Verbindung gebracht wird (Bakker et al. 2005). Letztere ist vor dem AS die häufigste Ursache des nephrotischen Syndroms im Kindesalter (Eddy und Symons 2003). Über eine Neutralisierung der negativ geladenen Glykokalix könnte aktiviertes Hemopexin die Nierenfiltrationsbarriere stören (Bakker et al. 2005).

Brandt et al. konnten Hemopexin als Teil des Hundeproteoms identifizieren (Brandt et al. 2014). Nach renaler Schädigung zeigte sich im Mausmodell eine fokale Akkumulation von Hemopexin in den Epithelzellen des proximalen Tubulus (Zager et al. 2012). In AS-Mäusen steigt die Serumkonzentration von Hemopexin ab der 7,5. Lebenswoche an (Muckova et al. 2015). Im Mausmodell von Alert zeigten die COL4A3-defizienten Tiere zu jedem Erhebungszeitpunkt höhere Hemopexin-Serumkonzentrationen als die Wildtyp-Kontrolle (Alert 2018). Auch in humanen Serumproben konnten erhöhte Hemopexinkonzentrationen beim manifesten AS massenspektrometrisch nachgewiesen werden (Baum et al. 2008). Die Untersuchung von Pohl et al. aus dem Jahr 2013 konnte jedoch weder in Urin-, noch in Plasmaproben einen signifikanten Konzentrationsunterschied zwischen manifestem AS und gesunder Kontrollgruppe zeigen. Zwischen AS und der Gruppe anderer Nephropathien sind die Konzentrationen zwar verschieden, jedoch nicht signifikant unterschiedlich (Pohl et al. 2013).

In der vorliegenden Untersuchung zeigten sich hauptsächlich erniedrigte Ratios in AS-Merkmalsträgern. Da die Konzentrationsänderungen jedoch insgesamt uneinheitlich in der Literatur beschrieben werden, bleibt zu klären, ob die fehlende Übereinstimmung mit dem Mausmodell (Muckova et al. 2015) durch die unterschiedlichen Spezies bedingt sein könnte. Derartige speziesabhängige Konzentrationsunterschiede konnten bereits für verschiedene APP gezeigt werden (Cray et al. 2009).

Pentraxin: Die Gruppe der Pentraxine gehört ebenfalls zu den APP (Lech et al. 2013) und kann in kurzkettige (u.a. Serum-Amyloid P) und langkettige (u.a. Pentraxin-3) Mitglieder unterteilt werden (Vilahur und Badimon 2015). Allen gemeinsam ist die „*Pentraxin signature*“ Domäne, bestehend aus der Aminosäureabfolge His-x-Cys-x-Ser/Thr-Trp-x-Ser, wobei x für jede beliebige Aminosäure stehen kann (Garlanda et al. 2005).

Das in dieser Studie gefundene Pentraxin kann mittels UniProtKB (www.expasy.org) nicht näher klassifiziert werden. Allerdings ist es möglich, aufgrund des Mr Rückschlüsse auf die Pentraxingruppe zu ziehen. Das hier massenspektrometrisch identifizierte Pentraxin mit der Protein-ID T2KEN6 zeigt in der vorliegenden 2D-Proteinverteilung ein Mr von rund 130 kDa. Ein Serum-Amyloid P-Monomer besitzt ein Mr von rund 25 kDa (Hutchinson et al. 2000), woraus sich ebenfalls ein Mr von rund 125 kDa für das Serum-Amyloid P-Pentamer ergibt. Damit könnte es sich bei dem gefundenen Pentraxin möglicherweise um eine Variante des Serum-Amyloid P (SAP) handeln. Da andere Pentraxine deutlich abweichende Mr aufweisen, scheiden sie bei der Identifikation des vorliegenden Pentraxins aus.

SAP erkennt pathogen-assoziierte molekulare Muster (Castaño et al. 2009) und stimuliert die Phagozytose (Bharadwaj et al. 2001). In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass rekombinant hergestelltes humanes SAP die Progression renaler Fibrosierung in COL4A3-defizienten AS-Mäusen attenuieren und deren Überlebensdauer um 20 % steigern kann (Nakagawa et al. 2016). In COL4A3-defizienten Mäusen steigt die Serumkonzentration von SAP bereits ab der 4,5. Lebenswoche, wobei der Effekt im Verlauf schwächer wird (Muckova et al. 2015, Alert 2018) Für CKD-Patienten ließ sich dazu passend eine negative Korrelation zwischen Erkrankungslast und SAP-Plasmakonzentration nachweisen. Histologisch zeigte sich eine vermehrte Ablagerung von SAP im Nierengewebe im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium (Castaño et al. 2009).

In der vorliegenden 2D-Proteinverteilung fanden sich sowohl Cluster erhöhter als auch erniedrigter Ratios in den Merkmalsträgern. Damit lässt sich zumindest teilweise das Ergebnis des Mausmodells von Muckova et al. bestätigen. Es wäre dabei denkbar, dass eine Proteoform des SAP besonders zu Beginn des AS als aussagekräftiger Marker dienen kann, während die Effekte mit Progredienz der Erkrankung schwächer werden. Um Pentraxin jedoch als präklinischen Biomarker verwenden zu können, muss zunächst eine genauere Untersuchung der verschiedenen Proteoformen erfolgen.

6.1.2 Negative Akute Phase Proteine

Transferrin: Transferrin gehört zu den negativen APP, deren Produktion in der Leber während einer Entzündungsreaktion herabgesetzt wird (Gabbay und Kushner 1999). Transferrin ist der wichtigste Eisentransporter des Körpers (Gaweda 2017), steigert u.a. die Chemokinsynthese, die NO-Produktion und ist in der Lage, Lipopolysaccharide (LPS) zu binden (Schrödl et al. 2016).

Bei COL4A3^{-/-} Mäusen zeigte sich im Gegensatz zur Akute-Phase-Reaktion (APR) eine erhöhte Transferrin-Serum-Konzentration bereits ab der 4,5. Lebenswoche. Für einige Proteoformen ließ sich eine 40-fach erhöhte Transferrinkonzentration im Serum präklinischer AS-Mäuse nachweisen (Muckova et al. 2015). Auch in humanen AS-Serumproben gelang der Nachweis erhöhter Transferrinkonzentrationen (Baum et al. 2008). In der Vergangenheit wurde ein positiver Zusammenhang zwischen erhöhter Urin-Transferrin-Konzentration und Glomerulosklerose beschrieben. Eine signifikante Erhöhung der Transferrin-Urin-Konzentration zeigte sich zudem bei schwerer tubulointerstitieller Schädigung (Li Y et al. 2012). Die vermehrte Filtration von Transferrin und die erhöhte

Transferrinkonzentration im Urin könnten dabei die Mikroalbuminurie im Rahmen glomerulärer Schädigung aggravieren (Bernard et al. 1988).

Anders als im Mausmodell fanden sich in der zugrundeliegenden 2D-Proteinverteilung für das Transferrin mit der Protein-ID J9P430 Cluster deutlich erniedrigter Ratios in Merkmalsträgern. Dies ist konform mit der Zugehörigkeit des Transferrins zu den negativen APP. Dennoch sind einige Transferrinfraktionen erhöht, was wiederum die Ergebnisse des Mausmodells bestätigen würde. Für die Evaluation des Transferrins als Biomarker beim präklinischen AS muss dieser Widerspruch, z.B. durch die Untersuchung möglicher Proteoformen, geklärt werden.

Retinol-bindendes Protein 4: Das RBP4 zählt ebenfalls zu den negativen APP (Fleck 1989). RBP4 kann sowohl frei im Plasma zirkulieren, als auch an Proteine gebunden vorkommen (Donadio et al. 2001). Als *low-molecular-weight* (LMW)-Protein (Mr: 21,2 kDa, Donadio et al. 2001) wird RBP4 im Glomerulus frei filtriert und über den Megalin-Cubulin-Komplex im proximalen Tubulus degradiert (DeLoor et al. 2013) und anschließend rückresorbiert (Chacar et al. 2017).

Im Urin gesunder Hunde ist RBP entweder nicht nachweisbar oder bleibt als Verhältnis aus Urin-RBP zu Kreatinin unter 0,15 mg/g (Hokamp und Nability 2016). Kommt es zu einer Tubulusfunktionsstörung, z.B. im Rahmen tubulointerstitieller Fibrose, ist die Proteolyse gestört und RBP verstärkt im Urin nachweisbar (Chacar et al. 2017). Die Urin-Konzentration von RBP ist dabei sowohl beim Hund als auch dem Menschen positiv mit dem Ausmaß tubulointerstitieller Fibrose korreliert (Pallet et al. 2014, Forterre et al. 2004).

Eine Untersuchung an Hunden mit CKD zeigte einen signifikanten Anstieg der RBP-Konzentration im Urin der betroffenen Tiere (Smets et al. 2010). Brandt et al. gelang 2014 der Nachweis von insgesamt 14 potentiellen Markern renaler Erkrankungen, darunter auch RBP4 (Brandt et al. 2014). Bei COL4A3^{-/-} Mäusen zeigte sich im Gegensatz zur APR ein Anstieg der RBP4-Serumkonzentration im präklinischen Stadium (Muckova et al. 2015). Beim Menschen hingegen ist ein Anstieg der RBP-Plasmakonzentration erst ab einer GFR < 40 ml/min/1,73 m² zu beobachten (Donadio et al. 2001).

In dieser Untersuchung fanden sich hauptsächlich unveränderte bis erniedrigte Ratios des RBP4 in den Merkmalsträgern. Der Konzentrationsabfall in Merkmalsträgern ist dabei konform mit der Rolle des RBP als negatives APP, widerspricht jedoch dem Konzentrationsanstieg aus dem Mausmodell von Muckova et al. Es bleibt daher offen,

inwiefern der Konzentrationsanstieg von RBP4 spezifisch für das Mausmodell ist. Zudem fehlen Daten über intra- und interindividuelle Langzeit-Variabilitäten der RBP-Plasmakonzentration (Liu et al. 2018). Da die RBP-Plasmakonzentration beim Menschen stark von einer reduzierten GFR abhängt, bleibt zudem fraglich, inwieweit sich RBP als präklinischer Diagnoseparameter eignet.

6.1.3 Extrazelluläre Matrixbestandteile

Kollagene: Im Folgenden werden die nachgewiesenen Ketten der Kollagene I und XIII besprochen.

Kol 1 gehört zu den fibrillenbildenden Kollagenen (Hornigold et al. 2013). Entscheidend für dessen Akkumulation in der glomerulären ECM ist das Enzym Transglutaminase-2 (Skill et al. 2004), welches Glutanyl-Lysin Brücken bildet (Kleman et al. 1995). Reduziert man die Ablagerung von Kol 1 in sklerotischen Glomeruli führt dies u.a. zu einer signifikanten Reduktion der Proteinurie und des Serumkreatininlevels (Hornigold et al. 2013).

In gesunden adulten Glomeruli ist Kol 1 kaum nachweisbar (Couchman et al. 1994). Nach TGF- β 1-Stimulation sind glomeruläre EC gesunder Mäuse jedoch in der Lage, Kol 1 zu synthetisieren (Lenz et al. 1998).

Für das Kol 1 gelang der massenspektrometrische Nachweis der α 1- und α 2-Ketten. Letztere zeigte zwei- bis fünffach erhöhte Ratios in Merkmalsträgern. Die Proteinverteilung der Kol 1 α 1-Kette hingegen weist heterogene Ratios auf (Cluster unveränderter, sowie Cluster erhöhter Ratios in Merkmalsträgern). Dies deutet daraufhin, dass die gefundenen Veränderungen eher durch die unterschiedliche Metabolisierung der einzelnen Peptidfragmente, als durch die gesamte Kette erzeugt wurden. Alternativ wäre auch eine verstärkte Proteolyse beim AS als Ursache für die heterogene Proteinverteilung denkbar.

Kollagen XIII (Kol 13) gehört zu den membrangebundenen Kollagenen (Dennis et al. 2010). Es ist in der Lage, α 1 β 1-Integrin (Dennis et al. 2010, Nykvist et al. 2000), sowie Fibronectin, Perlecan, Heparin und Nidogen 2 zu binden (Tu et al. 2002). Während nur ein geringer Prozentsatz frei zirkulierender Monozyten α 1 β 1-Integrin exprimiert (Dennis et al. 2010), findet sich im Nierengewebe von AS-Mäusen eine hohe Anzahl α 1 β 1-Integrin-positiver Monozyten (Sampson et al. 2001). α 1 β 1-Integrin vermittelt dabei Kollagen-abhängig Zellproliferation und - Adhäsion (Gardner et al. 1996, Pozzi et al. 1998), womit die Migration von Monozyten in das Interstitium der Alportnieren erleichtert wird. Dies bedingt eine verstärkte Myofibroblasten - und Matrixakkumulation.

Unter physiologischen Bedingungen ist Kol 13 nicht im Nierenkortex nachweisbar (Dennis et al. 2010). Im Nierenkortex von Alportmäusen hingegen gelang der Nachweis einer erhöhten Kol 13 mRNA-Syntheserate und -Proteinkonzentration (Dennis et al. 2010).

Ein Konzentrationsanstieg der Kollagen 1 α 1-Kette konnte im Serum von 4,5 Wochen alten COL4A3^{-/-} Mäusen (Muckova et al. 2015), sowie in humanem Plasma von AS-Patienten nachgewiesen werden (Pohl et al. 2013). Allerdings sind beim Menschen die immunologisch quantifizierten Plasmakonzentrationen nicht signifikant verschieden zwischen AS-Patienten und gesunder Vergleichsgruppe (Pohl et al. 2013). α 1-Integrin^{-/-} AS-Mäuse lebten doppelt so lange, wie α 1-Integrin-positive AS-Mäuse (Sampson et al. 2001, Cosgrove et al. 2000). Die Gabe monoklonaler Antikörper gegen die α 1 β 1-Integrin-Bindungsstelle des Kol 13 schützt Alportmäuse zudem vor renaler Fibrosierung. In derselben Untersuchung zeigte sich jedoch kein positiver Effekt auf das Überleben der AS-Mäuse (Dennis et al. 2010).

Die vorliegende Untersuchung ergab ausschließlich erhöhte Kol 13-Konzentrationen in Merkmalsträgern. Dies könnte durch eine vermehrte Freisetzung extrazellulärer Matrixbestandteile beim Remodeling erklärt werden und macht das Kol 13 zu einem vielversprechenden Markerkandidat.

Somit scheinen beide in dieser Untersuchung nachgewiesene Kollagen-Subtypen potentiell für die Diagnose des präklinischen AS geeignet zu sein. Im nächsten Schritt muss sich eine Evaluierung mit geeigneten Immuntesten anschließen, die im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich gewesen ist.

Fibronektin: Fibronektin ist ein 270 kDA Glykoprotein (Endlich et al. 2017), welches von Fibroblasten und EC sezerniert und danach in die ECM eingebaut wird, wo es an Kollagenfibrillen (Bonnans et al. 2014), sowie weiteren Bestandteilen der ECM binden kann (Endlich et al. 2017). Durch die Bindung an Integrine (Bonnans et al. 2014) stellt Fibronektin eine Brücke zwischen den PZ und der GBM dar (Lennon et al. 2014). Als Bestandteil der ECM dient Fibronektin als Reservoir für Wachstumsfaktoren, welche durch Proteolyse aus ihm freigesetzt werden können (Bonnans et al. 2014). Bei der familiären Glomerulonephritis gelang der Nachweis deutlicher Ablagerungen plasmatischen Fibronektins (Assmann et al. 1995). Der plasmatische Ursprung des Fibronektins konnte bei der sogenannten Glomerulopathie mit Fibronektinablagerung bestätigt werden (Castelletti et al. 2008). Ähnliches kann auch beim AS beobachtet werden (Humphreys 2018). Zudem wird die Rolle

von Fibronectin als Sensor im Rahmen mechanischer Belastung von PZ diskutiert (Endlich et al. 2017).

Die Fibronectin-Plasmakonzentration korreliert bei Patienten mit IgA-Nephropathie positiv mit dem Grad der Ablagerung von plasmatischem Gelsolin (pGSN) in den Glomeruli (Han et al. 2013). Im COL4A3^{-/-} Mausmodell zeigte sich ein Anstieg der Fibronectin-Serumkonzentration ab Woche 4,5 mit einem Maximum in Woche 6 (Alert 2018). Miner und Sanes wiesen zudem eine vermehrte Fibronectinablagerung in der GBM von COL4A3-defizienten Mäusen nach (Miner und Sanes 1996). Erhöhte Fibronectinkonzentrationen konnten auch im Serum von AS-Patienten gefunden werden (Baum et al. 2008, Pohl 2008). Jedoch sind die Ergebnisse uneinheitlich. Aufgrund der großen Streuung ließen sich keine signifikanten Konzentrationsunterschiede für Fibronectin zwischen bereits manifestem AS und gesunder Kontrollgruppe bzw. zwischen manifestem AS und anderen Nephropathien nachweisen (Pohl et al. 2013).

In der vorliegenden Untersuchung fanden sich über mehrere Fibronectinfraktionen Cluster erhöhter Ratios. Dies bestätigt die Ergebnisse des Mausmodells (Muckova et al. 2015) und früherer Patientenstudien (Baum et al. 2008, Pohl 2008). Es wäre somit möglich, dass einzelne Proteoformen tatsächlich spezifisch für das AS sind. Da jedoch auch zahlreiche Cluster erniedrigter Ratios mit vielen Hits, sowie unveränderte Ratios gefunden wurden, muss eine Unterscheidung einzelner Proteoformen erfolgen, bevor Fibronectin als Marker für das präklinische AS genutzt werden kann.

Sulhydryloxidasen: Sulhydryloxidasen (SOX) sind membranassoziierte Glykoproteine (Schmelzer et al. 1985), welche extrazellulär und intrazellulär vorkommen (Faccio et al. 2011). Allen gemeinsam ist das einheitliche Motiv, bestehend aus Cystein-x-x-Cystein, wobei das x für jede beliebige Aminosäure steht (Faccio et al. 2011). Abb. 13 zeigt die durch die SOX katalysierte Reaktion.

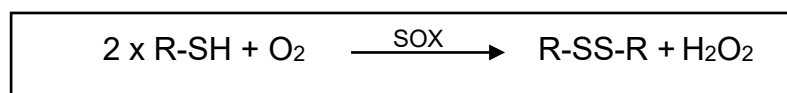


Abb. 13 allgemeines Reaktionsschema der Sulhydryloxidasen

Dargestellt ist die Verbindung freier SH-Gruppen zu Disulfidbrücken durch die SOX (Faccio et al. 2011).

Die sogenannten ER-Oxidasen sind an der korrekten Proteinfaltung neu synthetisierter Proteine im ER beteiligt (Faccio et al. 2011, Janolino und Swaisgood 1987). Auch die Quiascin-SOX kommen typischerweise im ER vor (Thorpe et al. 2002). Die gesteigerte Aktivität der SOX im ER könnte zu einem vermehrten Anfall von H₂O₂ führen (Kodali und Thorpe 2010), was wiederum den Grad des oxidativen Stresses im ER steigert (Haynes et al. 2004, Tu und Weissman 2004), Apoptose induziert und letztlich eine Aggravation der Nephrosklerose bedingen könnte.

Das Vorkommen der SOX im Nierengewebe konnte u.a. für die Quiascin-SOX belegt werden (Clare et al. 1984).

Die im Mausmodell von Muckova et al. nachgewiesene SOX 1 Isoform 3 gehört zur Gruppe der Quiascin-SOX. Im Serum von COL4A3^{-/-} Mäusen findet sich ab einem Alter von 4,5 Wochen eine Konzentrationserhöhung (Muckova et al. 2015), welche in Woche 6 nicht mehr nachweisbar ist. Die knockout-Mäuse zeigten jedoch in Woche 7,5 einen erneuten Anstieg der Konzentration und sogar die höchste Ratio aller Erhebungszeitpunkte im Vergleich zum Kontrollkollektiv (Alert 2018).

In dieser Promotionsarbeit konnten die Ergebnisse des Mausmodells bestätigt werden. Eine Erhöhung der SOX-Plasmakonzentration kann sowohl durch eine erhöhte Syntheserate als auch durch den Untergang von Nierengewebe erklärt werden und sollte zukünftig mittels Immuntestevaluierung überprüft werden.

Thrombospondine: Die u.a. von MC gebildeten Thrombospondine (TSP) gehören zu den ECM-Bestandteilen (Ishimura et al. 1989). In Vertebraten unterscheidet man fünf Subtypen, welche wiederum hinsichtlich ihres Aufbaus zwei Gruppen zugeordnet werden können (Stenina et al. 2007).

Nach Gewebsschädigung werden alle TSP-Subtypen verstärkt exprimiert (Hugo 2003). TSP-1 ist ein wichtiger Aktivator des TGF-β1-Smad-Signalwegs (Ponticelli und Anders 2017, Kim et al. 2003), worüber es sich auf die glomeruläre Fibrosierung auswirkt (McGregor et al. 1994, Kim et al. 2003). Die Unterdrückung der Interaktion zwischen TSP-1 und TGF-β1 reduziert die Progression interstitieller Fibrose und den Grad der Tubulusatrophie im Mausmodell (Ponticelli und Anders 2017). TSP-2 hingegen ist beteiligt am Remodeling der ECM und wirkt pro-inflammatorisch (Hugo und Daniel 2009).

Die TSP-4-Konzentration steigt nach Stimulation von EC mit TGF- β 1 an. Dabei vermittelt TSP-4 pro-angiogenetische Effekte *in vitro* und *in vivo* (Muppala et al. 2017). Bei Ratten konnte eine vermehrte Expression von TSP-4 in hypertropher Herzmuskulatur nachgewiesen werden (Mustonen et al. 2008), wo es das Ausmaß der Fibrosierung im Rahmen des myokardialen Remodelings reduziert (Frolova et al. 2012). Im Rahmen dieser Remodeling-Prozesse interagiert TSP-4 innerhalb des ER mit Atf6 α und könnte damit das Gewebe schützen (Lynch et al. 2012). Ein Anstieg von TSP-4 im Gewebe kann daher als zellulärer Schutzmechanismus interpretiert werden. Die dargelegten Effekte sind jedoch bisher nur für Herz- und Skelettmuskulatur beschrieben worden (Tan et al. 2002, Lynch et al. 2012).

Die hier nachgewiesenen TSP-4 Ratios zeigen eindeutig niedrigere Konzentrationen im Plasma von Merkmalsträgern als in der gesunden Vergleichsgruppe. Dies könnte auf eine Schädigung der MC, verstärkten Verbrauch oder eine veränderte Metabolisierung zurückzuführen sein. Es bleibt jedoch unklar, inwieweit der Abfall von TSP-4 im Plasma spezifisch für das AS ist und nicht auch durch anderweitigen Gewebsuntergang bedingt sein könnte.

6.1.4 Zytoskelett

Talin 1: Talin 1 ist ein dimeres Adaptermolekül mit einem Mr von 280 kDa, über das Integrine an das Aktinzytoskelett der PZ binden (Tian et al. 2014). Zellen ohne Talin 1 weisen eine gestörte Zelladhäsion und - Migration auf (Zhang et al. 2008).

Eine Schädigung der PZ im Rahmen glomerulärer Erkrankungen bei Mäusen führt zu einer verstärkten Aktivität des Talin1-abbauenden Enzyms Calpain (Tian et al. 2014). Fehlt dieses Talin 1 in PZ, kommt es zur Fehlorganisation des Aktinzytoskeletts, einer reduzierten Expression fokaler Adhäsionsmoleküle und einer gestörten glomerulären Filtrationsbarriere. Dies resultiert in globaler Glomerulosklerose, tubulointerstitieller Fibrose, Proteinurie und ESRD. Eine erhöhte Calpain-Aktivität ist auch im Urin von FSGS-Patienten nachweisbar (Tian et al. 2014). Diskutiert wird zudem die Rolle von Talin 1 als Mechanosensor in der Wahrnehmung und Übertragung mechanischen Drucks des Glomerulus (Endlich et al. 2017).

Die in dieser Untersuchung gefundenen Fraktionen erniedrigter, sowie erhöhter Ratios wären ein möglicher Hinweis auf eine Störung der Podozytenintegrität und könnten somit als erster Anhaltspunkt für die Diagnose des präklinischen AS dienen. Talin 1 wird hier

jedoch erstmals als Markerkandidat des AS diskutiert. Es bleibt daher die Frage, ob Veränderungen der Talin 1 Konzentration spezifisch für das Hundemodell sind oder ob der bisher ausgebliebene Nachweis im Mausmodell durch dessen geringere Probenmengen bedingt sein kann. Des Weiteren gibt es nach aktuellem Kenntnisstand keinen Immuntest, der zwischen den einzelnen Isoformen des Talins unterscheidet. Bevor Talin 1 als valider Diagnosemarker eingesetzt werden kann, braucht es demnach die Validierung der gefundenen Ergebnisse in weiteren und größeren, sowie letztlich auch humanen, Plasmaproben.

Osteomodulin: Osteomodulin (OMD) gehört zur Gruppe II der sogenannten *small leucine-rich proteoglycans*. Durch schwache elektrostatische Wechselwirkungen interagiert OMD mit Kollagenfibrillen (Tashima et al. 2018), reduziert den Durchmesser der Kollagenfibrillen und ist durch direkte Bindung an Kollagen in der Lage, Interaktionen zwischen einzelnen Fibrillen zu unterdrücken und somit die laterale Anlagerung weiterer Kollagenfibrillen zu hemmen (Tashima et al. 2015). Auf diese Weise kann OMD die Assemblierung von Kollagen verlangsamen und damit aberranter Fibrillenbildung vorbeugen (Tashima et al. 2018). OMD interagiert zudem mit $\alpha_v\beta_3$ -Integrin (Wendel et al. 1998), dessen Aktivierung durch PZ zur Ausbildung einer FSGS führen kann (Wei et al. 2011).

OMD wird nach aktuellem Erkenntnisstand hier erstmals im Rahmen des präklinischen AS besprochen. In dieser Untersuchung fanden sich Proteinanteile mit unveränderten und erniedrigten Ratios. Dies könnte auf ein verändertes ECM-Remodeling bzw. OMD-Metabolisierung hindeuten.

Hyaluronan binding protein 2: Das Hyaluronan binding protein 2 (HABP2), auch Faktor-VII-aktivierende Protease (FSAP) genannt (Römisch 2002), ist eine extrazellulär zirkulierende Serinprotease (Mambetsariev et al. 2009). Die genetische Information des HABP2 liegt auf dem Chromosom 10q25-q26 (Sumiya et al. 1997). In der Vergangenheit gelang der Nachweis von plasmatischem HABP im Nierengewebe (Choi-Miura et al. 1996). In humanem Plasma kommt HABP2 als *single-chain* Zymogen (Mr: 65 kDa) vor (Kress et al. 2006), welches u.a. durch Bindung von Polykationen und - anionen, wie RNA oder Heparin, eine (Auto -) Aktivierung erfährt (Kanse und Etscheid 2010). Durch Gewebsuntergang aktiviertes HABP2 kann über Protease-aktivierende Signalkaskaden die Aktin-regulierenden Moleküle RhoA und ROCK stimulieren und darüber eine gestörte Endothelbarriere bedingen (Mambetsariev et al. 2009). Weiterhin beeinflusst HABP2 die Regulation von Wachstumsfaktoren (Kress et al. 2006, Kannemeier et al. 2004) und

Zelluntergang (Joshi et al. 2015). HABP2 stimuliert über eine Aktivierung von Nf- κ B (Parahuleva et al. 2013) die Genexpression pro-inflammatorischer Substanzen in EC und Myozyten der glatten Gefäßmuskulatur (Byskov et al. 2017). *In vitro* spaltet HABP Kininogen und setzt dabei Bradykinin frei (Etscheid et al. 2002). Zudem wird eine Aktivierung der MAPK-Kaskade durch HABP diskutiert (Etscheid et al. 2005). Jedoch scheint FSAP gewebsspezifisch auch anti-inflammatorisch wirken zu können (Byskov et al. 2017, Daniel et al. 2016).

In der vorliegenden Untersuchung zeigt HABP2 (ID J9NV47) tendenziell erhöhte Ratios in Merkmalsträgern. Interessant ist dabei vor allem, dass die Protein-ID F1Q1K9 keine einzige erniedrigte Ratio aufweist. Schädigungen des Nierengewebes im Rahmen des AS könnten zu einer überschießenden Produktion von HABP2 führen und somit das physiologische Gleichgewicht aus pro- und anti-inflammatorischen Effekten zugunsten renaler Fibrosierung verschieben. Vermehrt synthetisiertes HABP2 könnte dann zunehmend im Plasma auftauchen. Dies erfordert weitere Evaluation an größeren Probenmengen, einer größeren Stichprobe und letztlich an humanen Plasmaproben. Zudem muss erwähnt werden, dass HABP2 hier erstmals im Rahmen des AS auftaucht. Aktuell fehlen damit vergleichbare Studienergebnisse. Somit bleibt zunächst ungeklärt, ob HABP2 auch in anderen Spezies mit AS eine Rolle spielt bzw. inwiefern die hier gefundenen Konzentrationsänderungen allein auf das AS zurückgeführt werden können.

6.1.5 Signaltransduktion

Clusterin: Clusterin ist ein Glykoprotein, welches ubiquitär in den meisten menschlichen Geweben produziert wird (Jung et al. 2014) und auch Teil des physiologischen Proteoms von Hunden ist (Brandt et al. 2014). Man unterscheidet eine nukleäre und eine sekretorische Form (Calero et al. 2005, Trougakos und Gonos 2002). Clusterin ist beteiligt an der Regulation von Apoptose, Inflammation, Zell-Zell-Interaktionen und Lipidtransport (Jung et al. 2014). Frühere Studien zeigten einen protektiven Effekt von Clusterin im Rahmen der Nephropathogenese (Rosenberg et al. 2002, Yamada et al. 2001). Dabei mindert Clusterin die über Angiotensin 2 (AT2) vermittelten pro-fibrotischen Effekte, indem es die Translokation von NF- κ B in den Nucleus inhibiert (Jung et al. 2014). Über die Inhibierung des TGF- β /Smad-3-Signalwegs reduziert Clusterin u.a. die Synthese von Kol 1 und Fibronectin (Jung et al. 2012).

Für pädiatrische Patienten mit Lupusnephritis lässt sich eine Korrelation zwischen Clusterin-Urinkonzentration und tubulointerstitiellen Läsionen nachweisen. Dabei ist die Clusterin-

Urinkonzentration der beste Prädiktor für das Auftreten einer ESRD (Wu et al. 2018). Im Tiermodell nephrotischer Nierenschädigung wurde Clusterin bisher hauptsächlich in den Tubulusepithelzellen, nicht aber in Glomeruli nachgewiesen (Correa-Rotter et al. 1998). Glomeruläres Clusterin ist hingegen vor allem bei der humanen membranösen Nephritis zu finden (Gall et al. 1997, Rastaldi et al. 2006). So zeigt sich im Serum von Patienten mit FSGS oder membranöser Nephropathie eine reduzierte Clusterinkonzentration. Ein solcher Mangel kann zu einer gesteigerten Proteinurie führen und das klinische Outcome nephrotischer Patienten verschlechtern (Ghiggeri et al. 2002). Durch die Ablagerung von Immunkomplexen im Mesangium entwickeln Clusterin^{-/-} Mäuse eine progressive Glomerulopathie (Rosenberg et al. 2002). COL4A3-knockout-Mäuse zeigen ausschließlich im präklinischen Stadium eine Erhöhung der Clusterin-Serumkonzentration (Alert 2018).

Wir finden Cluster sowohl erniedrigter, als auch unveränderter und erhöhter Ratios. Daher ist eine genauere Identifikation einzelner Proteoformen und deren Validierung entscheidend bevor Clusterin als Marker für das präklinische AS genutzt werden kann.

6.1.6 Sonstige

Angiotensinogen/ Angiotensin 1, 2: Das in der Leber synthetisierte Angiotensinogen wird über Renin zu AT1 (Verdecchia et al. 2008) und weiter mittels ACE zu AT2 gespalten (Crisan und Carr 2000). Als wichtiger Bestandteil des Renin-Angiotension-Aldosteron-Systems wirkt AT2 vasokonstriktorisch und hypertensiv (Wolf et al. 2003). Zusätzlich stimuliert AT2 die Hypertrophie renaler Tubulusepithel- (Wolf et al. 1993) und Mesangiumzellen (Anderson et al. 1993) und fördert die EMT (Chen et al. 2012), wodurch es pro-fibrotisch wirkt (Wolf 1998, Lavozy et al. 2012). In PZ stimuliert AT2 die Reorganisation des Aktinzytoskeletts (Hsu et al. 2008), steigert die intrazelluläre Calciumkonzentration (Gloy et al. 1998) und, über eine vermehrte Synthese von Sauerstoffradikalen, die Apoptoserate der PZ (Durvasula et al. 2004). Dies erklärt auch die positiven Effekte von ACE-Inhibitoren im Rahmen der Alport-Therapie (Gross et al. 2003 B, Lewis et al. 1993, Hill et al. 2001).

In der Vergangenheit gelang der Nachweis erhöhter Angiotensinogenkonzentrationen intrarenal (Bae et al. 2015), sowie im Plasma von AS-Mäusen (Muckova et al. 2015). COL4A3-defiziente Mäuse zeigten in allen Krankheitsstadien erhöhte Konzentrationen, mit der höchsten Ratio in der 7,5. Lebenswoche, dem ersten klinischen Stadium (Alert 2018).

In dieser Untersuchung fanden sich Cluster erhöhter und erniedrigter Konzentrationen. Dies repliziert frühere Untersuchungen am Mausmodell. Dennoch muss auch hier eine weitere Evaluierung der Proteoformen erfolgen.

Lecithin-Cholesterol-Acyltransferase: Die Lecithin-Cholesterol-Acyltransferase (LCAT) gehört zu den Plasmaenzymen, welche von der Leber synthetisiert werden (Hirashio et al. 2014). Abb. 14 zeigt die durch die LCAT katalysierte Esterifizierung freien Cholesterols (Jonas 2000), was den Transport überschüssigen Cholesterins aus der Peripherie zur Leber ermöglicht (Lewis und Rader 2005). Die LCAT setzt bevorzugt an HDL gebundenes Cholesterol um (Glomset 1968). HDL besteht zu ca. 70 % aus Apolipoprotein A-I (Vaziri 2006), welches wiederum den Hauptaktivator der LCAT darstellt (Jonas 1991).

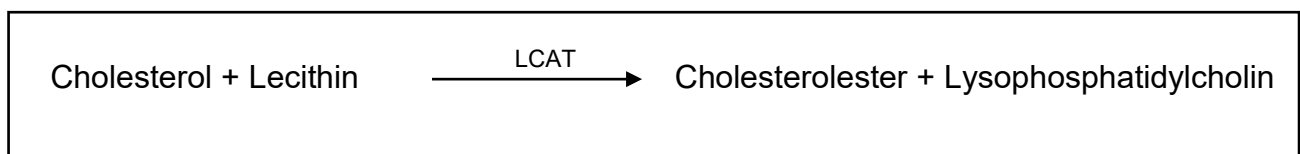


Abb. 14 Esterifizierung freien Cholesterols

Dargestellt ist die durch die LCAT katalysierte Umwandlung von Cholesterol zu Cholesterolester (Jonas 2000).

Chronische Niereninsuffizienzen und nephrotische Syndrome, zu denen auch das manifeste AS gehört, können zu einer erworbenen LCAT-Defizienz führen (Vaziri et al. 2001 A, Vaziri et al. 2001 B). Im Verlauf einer solchen Defizienz kommt es zunächst zur Akkumulation lipidbeladener Makrophagen (sog. *foam cells*) im Interstitium und den Tubuluszellen (Faraggiana und Churg 1987). Es folgen eine Mesangiumexpansion, Verdickung der Basalmembranen, sowie irreguläre Vakuolisierung (Imbasciati et al. 1986). Patienten mit CKD und ESRD zeigen häufig eine Herabregulierung des Apolipoproteins A-I (Attman et al. 1993, Vaziri 2006). Dies führt über die reduzierte LCAT-Aktivität (McLeod et al. 1984, Shoji et al. 1992) zu einer gestörten HDL-Zusammensetzung (Hirashio et al. 2014). Niedrige HDL-Plasmakonzentrationen sind dabei ein eigenständiger Risikofaktor für die Progression von Nierenerkrankungen (Hunsicker et al. 1997, Schaeffner et al. 2003). Ist der HDL-bedingte Cholesterolrücktransport gestört, verstärkt dies die Ablagerung von Lipiden (Hirashio et al. 2014) und *foam cells*. Dies begünstigt u.a. die tubulointerstitielle Inflammation und damit weitere Gewebsschädigung (Brunskill 2004, Magil 1999). Die Ablagerung von Lipoproteinen im Glomerulus verstärkt zudem die Glomerulosklerose (Coritsidis et al. 1991).

Im präklinischen Stadium gelang der Nachweis erhöhter LCAT-Ratios in COL4A3-knockout Mäusen (Alert 2018). In dieser Untersuchung ist die LCAT eher unverändert bis leicht erniedrigt. Es bleibt zu klären, ob dieser Unterschied durch die verschiedenen untersuchten Spezies hervorgerufen wird und inwiefern sich dies auf die Untersuchung humaner Plasmaproben auswirkt.

Kallikrein: Kallikrein ist eine Serinprotease, die sowohl im Plasma als auch in verschiedenen Geweben, u.a. der Niere, vorkommt (Schachter 1979) und dort Bestandteil des sog. Kallikrein-Kinin-Systems ist (Kwak et al. 2011). Unter physiologischen Bedingungen spaltet das Plasma-Kallikrein Bradykinin aus hochmolekularen (HMW) Kininogenen (Hillmeister und Persson 2012), während Gewebs-Kallikrein Bradykinin aus LMW-Kininogen freisetzt (Hillmeister und Persson 2012). Letzteres wirkt über B1-Rezeptoren, welche unter physiologischen Bedingungen kaum vorkommen, jedoch im Rahmen einer Entzündung vermehrt exprimiert werden (Duchene und Ahluwalia 2009). Diese Rezeptoren sorgen über eine Aktivierung von Nf- κ B für eine Verstärkung der proinflammatorischen Immunreaktion (Duchene et al. 2009). Die Bradykininrezeptoren 1 und 2 sind beteiligt an der Proliferation von EC und der Angiogenese (Emanuelli et al. 2002, Kränkel und Madeddu 2009). In MC inhibiert Bradykinin die pro-fibrotischen Effekte von EGF und TGF- β 1 (Blaes et al. 2012), was am ehesten durch Stimulation des gewebspezifischen Plasminogenaktivators erklärbar ist (Pawluczyk et al. 2006). Da das ACE Bradykinin abbauen kann (Hillmeister und Persson 2012), wird darüber ein Teil des nephroprotektiven Effektes von ACE-Inhibitoren erklärbar (Gross et al. 2012). Im AS-Mausmodell konnte gezeigt werden, dass exogen zugeführtes Kallikrein die Dicke der GBM reduziert, PZ und das fenestrierte Endothel vor Degeneration schützt, sowie renale Fibrose, Inflammation und oxidativen Stress reduziert (Kakoki et al. 2010).

Alle Bestandteile des Kallikrein-Kinin-Systems lassen sich physiologisch in PZ nachweisen (Kwak et al. 2011). Bei Nierenversagen fällt die Kallikrein-Produktion jedoch deutlich ab (Naicker et al. 1999). Im Serum von COL4A3-defizienten Mäusen zeigte sich ein Konzentrationsanstieg von Plasmakallikrein in der 7,5. Lebenswoche (Muckova et al. 2015).

In der vorliegenden Untersuchung fanden sich überwiegend erniedrigte, aber auch geringfügig erhöhte Ratios in AS-Merkmalsträgern. Zwar widerspricht dies den Ergebnissen des Mausmodells von Muckova et al., jedoch werden u.a. die Ergebnisse von Kwak et al. gestützt. Zudem steigt die Serumkonzentration im Mausmodell bei beginnendem Nierenschaden. Die hier untersuchten Hunde waren jedoch biologisch jünger und

präklinisch. Bevor Kallikrein als präklinischer Diagnoseparameter genutzt werden kann, muss zudem erst eine Immuntestevaluierung erfolgen.

6.2 selektierte Biomarkerkandidaten

Serum-Amyloid A zeigt ausschließlich erhöhte Ratios (zum Teil 100-fach höhere Konzentration in Merkmalsträgern) in der gesamten 2D-Proteinverteilung. Damit ist es ein besonders interessanter Biomarkerkandidat zur Detektion des präklinischen AS. Die Proteinverteilung des Gelsolin beinhaltet deutlich erhöhte Ratios (teilweise > 90), welche von besonderem Interesse für die spätere Anwendung sind. Zwar zeigt Adiponektin, neben wenigen stark erhöhten, hauptsächlich unveränderte bis erniedrigte Ratios, aufgrund der Auswirkungen einer Adiponektindefizienz auf Glomeruli wird es dennoch als potentieller Markerkandidat behandelt.

6.2.1 Serum-Amyloid A

SAA wird als APP hauptsächlich von Hepatozyten synthetisiert (Cerón et al. 2005). Sowohl das in Mäusen als auch in Hunden gefundene SAA ist dem menschlichen SAA1 in Struktur, Funktion und Verteilung sehr ähnlich (Anderberg et al. 2015). Für alle drei Spezies sind mindestens drei Gene bekannt (Uhlar und Whitehead 1999, Sellar et al. 1991). Die vier humanen Isoformen sind innerhalb von 160 kB auf Chromosom 11p15.1 kodiert (Sack et al. 1989, Sack 2018). Die genetischen Informationen für das SAA1 bei Hund und Mensch sind zu ca. 80 % identisch (Sellar et al. 1991).

Obgleich die physiologische Funktion des SAA noch ungeklärt ist (Kisilevsky und Manley 2012), wird dessen Beteiligung an zahlreichen Prozessen diskutiert. So ist SAA in der Lage, die Synthese ECM-degradierender Enzyme, wie Collagenasen, MMP 2 und 3, Stromelysin (Kisilevsky und Manley 2012) und pro-inflammatorischer Cytokine (Uhlar und Whitehead 1999) zu induzieren. SAA1 führt als Opsonin zur Degranulation von Mastzellen (Sun und Ye 2016) und wirkt chemotaktisch (Sack 2018, Anderberg et al. 2015), antibakteriell und anti-aggregatorisch (Marhaug und Dowton 1994, Uhlar und Whitehead 1999). SAA ist ein hydrophobes Apolipoprotein, welches hauptsächlich an HDL₃ gebunden vorkommt (Cerón et al. 2005, Uhlar und Whitehead 1999). Es schwächt die LCAT in ihrer Funktion und stimuliert die Cholesterolhydrolase (Sack 2018, Uhlar und Whitehead 1999). Dies erleichtert die zelluläre Aufnahme von freiem Cholesterin am Entzündungsort (Uhlar und Whitehead 1999). Extrahepatisch konnte die SAA-Synthese im Darm, Knochenmark, in der Niere und

bei hyperglykämischen Patienten in Adipozyten nachgewiesen werden (Cerón et al. 2005, Sack 2018).

SAA kommt bei Gesunden in einer Plasmakonzentration von 20 - 50 µg/ml vor (Sack 2018). Während einer Inflammation kommt es Zytokin-vermittelt innerhalb von 24 - 36 Stunden zu einem Anstieg der Serumkonzentration von SAA-Proteinen auf das 100 - 1000-fache (Sack 2018). Beim Hund wie auch beim Menschen gehört SAA zur *Major-response*-Kategorie. Vertreter dieser Gruppe werden während einer APR früher und vermehrt von (extra -) hepatischem Gewebe synthetisiert. Nach Abklingen der Entzündung fällt zudem ihre Konzentration rascher wieder ab (Cerón et al. 2005).

Bei Mäusen mit diabetischer Nierenkrankheit zeigte sich eine deutliche Ablagerung von SAA3 an glomeruläres Laminin und Kollagen 4, sowie an Tubulusepithelzellen. Mit exogenem SAA konfrontiert, steigerten Maus-PZ die endogene Synthese von SAA, sowie die Aktivität von Nf-κB und darüber die Synthese pro-inflammatorischer Zytokine und die Apoptoserate. Eine inverse Korrelation zwischen SAA-Konzentration und geschätzter GFR wurde ebenfalls beschrieben (Anderberg et al. 2015).

In dieser Untersuchung zeigt das gefundene SAA ausschließlich erhöhte Ratios (Vgl. Abb. 10). Dies entspricht den Ergebnissen von Untersuchungen an Patienten mit diabetischer Nierenkrankheit (Anderberg et al. 2015, Pichler et al. 2017). Ein vermehrtes Auftauchen von SAA im Plasma kann dabei sowohl durch inflammatorische Vorgänge als auch durch einen vermehrten Podozytenuntergang bzw. gesteigerte renale Syntheseraten erklärt werden. Nach vorliegendem Kenntnisstand gibt es bisher keine weiteren Untersuchungen des SAA beim AS.

SAA kann daher als sehr vielversprechender Markerkandidat interpretiert werden. Allerdings war es in dieser Promotionsarbeit nicht möglich, das Protein mittels ELISA zu quantifizieren. Die massenspektrometrisch nachgewiesenen Peptidfragmente konnten mittels der Datenbank UniProtKB (www.expasy.org) und der Software Proteome Discoverer™ 1.3 zwar eindeutig dem SAA zugeordnet werden (Vgl. Abb. 15), jedoch sind diese durch Proteome Discoverer™ 1.3 identifizierten Peptidfragmente in drei Isoformen des Hunde-SAA identisch. Für einzelne SAA-Isoformen spezifische („unique“) Peptidfragmente konnten nicht nachgewiesen werden (Vgl. Abb. 16). Proteinmodifikationen, welche das hohe Mr (zwischen 200 - 360 kDa je nach Cluster) erklären könnten, waren bisher nicht nachweisbar. Somit kann davon ausgegangen werden, dass das verwendete

Testkit zwar mit den Eichproben funktioniert, jedoch für die Messung unserer SAA-Proteiformen offenbar ungeeignet ist. In Zukunft benötigt es somit eine erneute Evaluation der Plasmaproben mit anderen Testbedingungen, die in der Lage sind, die SAA-Fragmente spezifisch zu detektieren.

	1	11	21	31	41	51	61	71		
J9NVE9	1	MKLLVGI	LLCSVL	GVSSQR	WLTFLKEAGQ	GTRDMWRAYS	DMREANYKNS	DKYFHARGNY	DAAQRGPGGA	WAAKVISDAR
J9NVE9	101	DSKADQAANE	WGRSGKDPNH	FRPAGLPDKY						

Abb. 15 Auszug aus Sequenzanalyse Serum-Amyloid A

Die in dieser Untersuchung massenspektrometrisch nachgewiesenen Peptidfragmente sind grün hinterlegt.

P19708	SAA_CANLF	1	MKLLFPGLLFC	SLVLGVSG	-QWYSEVSEAA	OGAWDMWRAYS	DMREANYKNS
J9NVE9	J9NVE9_CANLF	1	MKLLVGI	LLCSVL	GVSSQR	WLTFLKEAGQ	GTRDMWRAYS
			:	***:**	. :*	:*:*:*:*:	*****
P19708	SAA_CANLF	60	DAAQRGPGGAWAAKVISDARENSQRITDLLRFGDSGHGAEDSKADQAANE				
J9NVE9	J9NVE9_CANLF	61	DAAQRGPGGAWAAKVISDAREKSQRITDLFKFGDSGHGVEDSKADQAANE				
			*****:*****:*****.*****				
P19708	SAA_CANLF	120	FRPAGLPDKY				
J9NVE9	J9NVE9_CANLF	121	FRPAGLPDKY				

Abb. 16 Auszug aus Sequenzvergleich Serum-Amyloid A Isoformen

Verglichen wird die Aminosäureabfolge der Serum-Amyloid A Protein-IDs P19708 und J9NVE9; * markiert identische Aminosäuren; abweichende Aminosäuren sind mit : markiert; große Teile der Aminosäuresequenz sind für beide Isoformen identisch, darunter auch die in Abb. 15 grün hinterlegten Peptidfragmente.

6.2.2 Gelsolin

GSN ist ein aktin-depolymerisierendes Protein (1979 durch Yin & Stossel entdeckt, Spinardi und Witke 2007), welches beim Menschen sowohl in zytoplasmatischer (cGSN), als auch als extrazellulärer Form (pGSN) vorkommt. Anders als das nahezu ubiquitär synthetisierte cGSN ist die Produktion von pGSN offenbar auf Zellen der Herz-, Skelett- und glatten Muskulatur beschränkt (Piktel et al. 2018, Wittmann et al. 2018), von wo es an Blut, Urin und die meisten anderen Körperflüssigkeiten abgegeben wird (Piktel et al. 2018, Bucki et al. 2008). Beide Isoformen des GSN werden beim Menschen durch das selbe Gen auf Chromosom 9 kodiert (bestehend aus mindestens 14 Exons, Bucki et al. 2008). Das Mr beträgt 80 kDa (cGSN) bzw. 83 kDa (pGSN) (Li GH et al. 2012). Abb. 17 gibt einen detaillierten Überblick über die biologischen Funktionen der einzelnen Gelsolin-Subtypen.

Eine dritte Isoform, Gelsolin-3, kommt hauptsächlich in Oligodendrozyten vor, ist an der Myelinummantelung zentralnervöser Axone beteiligt (Piktel et al. 2018) und soll hier nicht weiter besprochen werden.

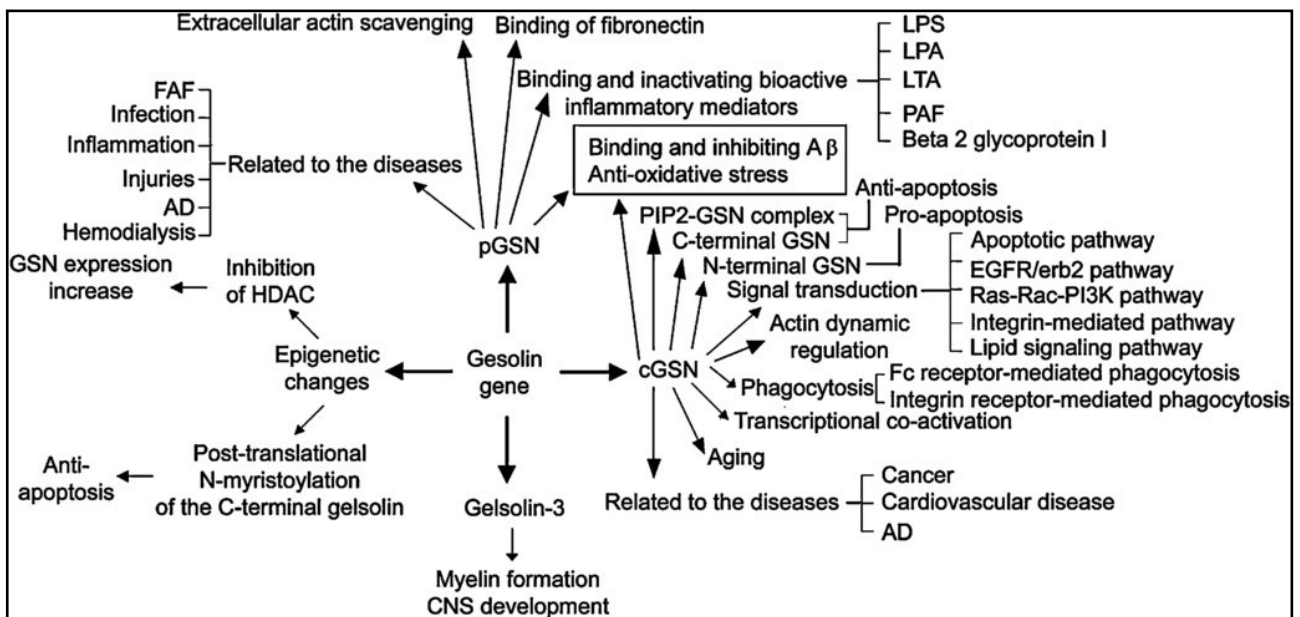


Abb. 17 Übersicht über biologische Funktionen der verschiedenen Gelsolin-Isoformen *pGSN* spielt eine bedeutende Rolle in der Chemotaxis und vermittelt anti-inflammatorische Effekte, während *cGSN* wichtig in Bezug auf Apoptose und Aktinregulation ist; Gelsolin 3 nimmt eine gesonderte Rolle in der Entwicklung der Myelinscheiden ein (Li GH et al. 2012).

Über die Regulation der Zusammenlagerung und Degradierung intrazellulärer Aktinfilamente (Capping, Teilung, Nukleation) nimmt *cGSN* Einfluss auf die Zell-Lokomotion und -Morphogenese. *pGSN* ist Bestandteil des sog. *extracellular actin scavenger system* (Peddada et al. 2012). Durch Zelluntergang freiwerdendes Aktin kann auf diese Weise gebunden und abtransportiert werden, wodurch dessen potentielle zytotoxische Effekte, z.B. gestörte Mikrozirkulation, gesteigerte Thrombozytenaggregation, Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine oder sekundäre Gewebsschäden, vermieden werden können (Piktel et al. 2018, Wittmann et al. 2018, Peddada et al. 2012, Bucki et al. 2008). *GSN*^{-/-} Mäuse zeigen dementsprechend eine verspätete Extravasation neutrophiler Granulozyten, eine verzögerte Wundheilung, sowie eine verlängerte Blutungsdauer (Piktel et al. 2018, Spinardi und Witke 2007). Durch Caspase-3 proteolytisch prozessiertes Gelsolin (sog. N-Gelsolin) bindet Aktin, löst es dadurch aus seiner Interaktion mit der DNase I und wirkt darüber pro-apoptotisch (Li GH et al. 2012). Unverdautes Gelsolin wirkt hingegen anti-apoptotisch (Li GH et al. 2012). *GSN* moduliert über die Syntheseregulation von glattmuskulärem Aktin die EMT (Wittmann et al. 2018). Des Weiteren ist *pGSN* in der Lage,

LPS gramnegativer Bakterien und Lipoteichonsäure grampositiver Bakterien zu binden und zu inaktivieren (Wittmann et al. 2018, Li GH et al. 2012). In den glomerulären Epithelzellen wird durch GSN die Synthese von TGF- β 2 und - β 3, sowie TGF- β -Rezeptoren gesteigert. Dies führt zu einer Überproduktion von ECM-Komponenten, welche sich als subepitheliale Spikes ablagern und zu einer Verdickung der GBM führen (Couser 1998). Über den TGF- β / Smad-Signalweg kommt es zur gesteigerten mRNA-Expression von z.B. Fibronectin und Kol 1, was schließlich zur Fibrose und Glomerulosklerose führen kann (Zhang et al. 2017, Zhang et al. 2016, Bonnans et al. 2014). *In vitro* erleichtert pGSN über Cyclin A und CDK2 die Proliferation der MC (Zhang et al. 2016), was zu einer gesteigerten Synthese extrazellulärer Matrixbestandteile führt (Couser 1998). Aus MC freigesetzte Proteasen können vor allem im Bereich geschädigter Basalmembran nachgewiesen werden (Couser 1998). Über die Assoziation mit β ₁-Integrin und Rac ist Gelsolin zudem an der Phagozytose von Kollagen beteiligt (Arora et al. 2004).

Der Serum-Normwert des pGSN beläuft sich je nach Messmethode auf 190 - 300 mg/l (Li GH et al. 2012), wobei die Serumkonzentration aufgrund einer Interaktion zwischen pGSN und Fibronectin bzw. Fibrin niedriger ist als die Plasmakonzentration (Piktel et al. 2018). GSN ist bereits in humanen fetalen Nieren nachweisbar, jedoch unterscheidet sich seine Verteilung je nach Entwicklungsstadium (Lueck et al. 1998). In humanen fetalen Nieren findet sich GSN in den PZ der Glomeruli des inneren, nicht jedoch des äußeren Nierenkortex. In adultem humanen Nierengewebe ist GSN nicht mehr in den Glomeruli, jedoch im distalen Tubulus und dem Sammelrohr nachweisbar. Sowohl fetales als auch adultes murines Nierengewebe weisen GSN in den EC der Glomeruli auf (Lueck et al. 1998).

Patienten mit einer IgA-Nephropathie zeigen reduzierte Serum-pGSN-Konzentrationen, sowie starke Ablagerungen des pGSN in den Glomeruli (Han et al. 2013), hauptsächlich im Bereich der MC (Zhang et al. 2016). Die Serum-pGSN-Konzentration in dieser Patientengruppe korreliert dabei positiv mit der GFR, sowie negativ mit der Fibronectin- und TGF- β 1-Konzentration (Zhang et al. 2016). Muckova et al. konnten erhöhte Serum-Gelsolin-Konzentrationen vor allem in der 4,5. Lebenswoche der COL4A3^{-/-} Mäuse nachweisen. Im weiteren Entwicklungsverlauf der Mäuse glich sich die Plasmakonzentration allerdings immer mehr der Kontrollgruppe an, während die Urinkonzentration in den Merkmalsträgern weiter anstieg (Muckova et al. 2015). Zusätzlich konnte die Gelsolin-Plasmakonzentration in AS-Tieren durch Ramiprilgabe gesenkt werden (Muckova et al. 2015).

In dieser Untersuchung ließen sich sowohl Fraktionen stark erhöhter (> 90), als auch erniedrigter Ratios ($< 0,012$) finden (Vgl. Abb. 10). Eine reduzierte Gelsolinkonzentration im Serum stimmt dabei mit Untersuchungen an IgA-Nephropathie-Patienten überein. Es wäre denkbar, dass ein verstärkter glomerulärer Einbau des GSN, ähnlich den Vorgängen bei der IgA-Nephropathie, auch zu einem Konzentrationsabfall im Serum führt. Die stark erhöhten Fraktionen, die die Ergebnisse des COL4A3-Mausmodells bestätigen, könnten eine AS-spezifische Proteoform repräsentieren, bedingt durch definierte posttranslationale Modifikationen. Wie eingangs erwähnt, steigert GSN auch die Konzentration von Fibronectin und Kol 1. Dies lässt sich in den hier gefundenen Ergebnissen replizieren und untermauert die pathophysiologische Bedeutung des GSN im Rahmen der Nephrosklerose. Eine Konzentrationserhöhung kann dabei durch eine vermehrte Sekretion des pGSN entstehen, aber auch Zeichen eines vermehrten Zelluntergangs und damit dem Verlust von cGSN sein. Erwähnenswert sind zudem die zahlreichen Fraktionen unveränderter Ratios. Der durchgeführte Immuntest ermöglichte eine erste Bestätigung der gefundenen Konzentrationsunterschiede zwischen Merkmalsträgern und Wildtyp-Kontrolle. Zukünftig muss eine weiterführende Untersuchung insbesondere der Proteoformen mit erhöhten Ratios erfolgen. Des Weiteren braucht es eine klare Detektion der nachgewiesenen GSN-Isoform. Durch Identifikation einzelner spezifischer Proteoformen könnte es so möglich werden, einen für das AS spezifischen Biomarker zu etablieren.

6.2.3 Adiponektin

Das 1995 erstmals beschriebene Adiponektin (Scherer et al. 1995) ist als ein von Adipozyten sezerniertes Hormon bekannt, welches u.a. Einfluss auf die Niere nimmt (Wang und Scherer 2016). In der Vergangenheit konnten zwei Rezeptorsubtypen des Adiponektins isoliert werden (Yamauchi et al. 2003). PZ exprimieren vor allem den Adiponektin-Rezeptor 1 (Sharma et al. 2008, Cammisotto und Bendayan 2008), während in humanen renalen MC beide Subtypen nachweisbar sind (Tan et al. 2015). Über beide Rezeptoren vermittelt Adiponektin die Aktivierung der AMP-aktivierten Proteinkinase (Sharma et al. 2008, Sweiss und Sharma 2014), welche verstärkt in Nierengewebe exprimiert wird und die Podozytenfunktion beeinflusst (Hallows et al. 2010). Adiponektin wirkt sich darüber indirekt auf die Reduktion von oxidativem Stress, Podozytenschädigung und Albuminurie aus (Sharma et al. 2008, Sweiss und Sharma 2014). Zusätzlich ist Adiponektin in der Lage, die Proteinlevel der NADPH-Oxidase Nox4 in PZ zu reduzieren (Sweiss und Sharma 2014). Ohne diesen Einfluss würde die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zur Apoptose der PZ führen (Sweiss und Sharma 2014). Zudem hemmt Adiponektin die AT2-vermittelte

Produktion von TGF- β 1 und Fibronectin (Tan et al. 2015, Guo et al. 2014). Nephroprotektive Effekte des Adiponektins werden immer wieder im Zusammenhang mit Proteinurie diskutiert (Sharma et al. 2008, Ohashi et al. 2007, Nakamaki et al. 2011).

Adiponektin zirkuliert in Form verschiedener Multimere von LMW bis HMW (Chudek et al. 2006) in einer physiologischen Plasmakonzentration von 3 - 30 μ g/ml (Ouchi et al. 1999). Obgleich die Adiponektin-clearance vorwiegend über die Leber erfolgt, wird ein gewisser Anteil auch bei Gesunden (Sethna et al. 2015) über die Niere degradiert und im Urin ausgeschieden (Tacke et al. 2005, Halberg et al. 2009). Zudem müssen geschlechtsspezifische Konzentrationsunterschiede beachtet werden. Frühere Untersuchungen belegten eine höhere Adiponektin-Konzentration in weiblichen Mäusen (Coombs et al. 2003) und bei Frauen (Boyne et al. 2010). Die Einnahme von ACE-Inhibitoren oder AT-Antagonisten erhöht die Serum-Adiponektin-Konzentration zusätzlich (Furahashi et al. 2003, Yilmaz et al. 2007). Des Weiteren wäre es denkbar, dass sich die Verteilung zwischen LMW- und HMW-Adiponektin zwischen Plasma und Urin unterscheidet (Sethna et al. 2015).

Adiponektin^{-/-} Mäuse zeigen eine verstärkte glomeruläre Hypertrophie, tubulointerstitielle Fibrose, Rarefizierung der PZ-Fußfortsätze und Albuminurie. All diese Effekte konnten durch Gabe von Adiponektin rückgängig gemacht werden (Sharma et al. 2008). Für Kinder mit FSGS gibt es eine direkte Korrelation zwischen Serum-Adiponektin-Konzentration und dem Grad der Proteinurie (Sethna et al. 2015). Andere Studien zeigten erhöhte Serumwerte für Adiponektin in Patienten mit CKD bzw. ESRD (Menon et al. 2006, Drechsler et al. 2009). Eine Erhöhung der Serumkonzentration wird dabei als eigenständiger Risikofaktor für das Auftreten einer Albuminurie, die Progression der CKD und Overall-Mortalität postuliert (Menon et al. 2006, Drechsler et al. 2009, Kollerits et al. 2007). Im Rahmen nephrotischer Syndrome ist die Serum-Adiponektin-Konzentration der Betroffenen bis zu dreimal höher als in gesunden Vergleichsgruppen (Bakkaloglu et al. 2005, Zoccali et al. 2003). Es bleibt zu klären, ob Adiponektin in proteinurischen Erkrankungen vermehrt synthetisiert wird, um die PZ vor Schädigung zu schützen oder ob die Proteinurie als Trigger einer Dyslipidämie zur vermehrten Synthese von Adiponektin führt (Sethna et al. 2015, Zoccali et al. 2003).

In der zugrundeliegenden Proteinverteilung zeigt sich neben unveränderten und erniedrigten Ratios auch ein eindeutiges Cluster erhöhter Ratios. Die nachgewiesenen Erniedrigungen sind widersprüchlich zu früheren Untersuchungen an CKD- und nephrotischen Patienten. Es wäre denkbar, dass Adiponektin zwar in anderen

Nephropathien ansteigt, nicht aber im präklinischen AS. Zudem untersuchten wir das Plasma männlicher Hunde. Es wäre möglich, dass die Adiponektin-Konzentration zwar in weiblichen AS-Merkmalsträgern, nicht aber in den männlichen ansteigt. Der in dieser Promotion durchgeführte Immuntest war zudem nicht in der Lage, deutliche Konzentrationsunterschiede zwischen AS-Merkmalsträgern und Wildtyp-Kontrolle nachzuweisen. Der ELISA kann jedoch keine proteom-spezifischen Aussagen treffen, sondern letztendlich nur eine Mittelung über alle veränderten Varianten widerspiegeln. Damit bleibt Adiponektin auch weiterhin ein interessanter Biomarkerkandidat. Dies wird durch das deutliche Cluster ausschließlicher Erhöhung in Merkmalsträgern gestützt und bestätigt frühere Untersuchungen im Rahmen von CKD und ESRD. Vor dem Einsatz von Adiponektin als Marker bei präklinischem AS müssen daher größere Probenmengen mit Unterscheidung der möglichen Proteoformen, sowie beide Geschlechter gesondert untersucht werden.

6.3 Vergleich mit dem Mausmodell

In der Vergangenheit wurden bereits einige Biomarkerkandidaten am Mausmodell vorgeschlagen (Muckova et al. 2015). Je nach Alter und Erkrankungsstadium der Mäuse fanden sich dabei unterschiedliche veränderte Proteine. Tabelle 4 fasst die von Muckova et al. vorgeschlagenen Biomarkerkandidaten und die Ergebnisse des vorliegenden Hundemodells zusammen. Die Tabelle unterscheidet die Serumkonzentration nach Alter und Erkrankungsstadium der Mäuse (4,5 Wochen: präklinisches Erkrankungsstadium; 6,0 Wochen: AS-Stadium I; 7,5 Wochen: AS-Stadium II). Grün hinterlegt sind gleichsinnige Konzentrationsveränderungen in Maus- und Hundemodell. Zellen ohne Inhalt sind gleichbedeutend mit dem fehlenden Nachweis des jeweiligen Proteins in der untersuchten Probe.

Tab. 4: Vergleich der Biomarkerkandidaten aus dem Maus- und Hundemodell

Bedeutung der Pfeile: ↑ = Konzentrationserhöhung in AS-Merkmalsträgern; ↗ = Konzentrationserhöhung in einigen Subfraktionen der AS-Merkmalsträger; ↓ = Konzentrationsabfall in AS-Merkmalsträgern; ↘ = Konzentrationsabfall in einigen Subfraktionen der AS-Merkmalsträger; ↔ = unveränderte Konzentrationen in AS-Merkmalsträgern; die gleichzeitige Darstellung verschiedener Pfeilrichtungen ergibt sich, wenn verschiedene Cluster mit deutlichen Veränderungen jedoch in unterschiedlichen Richtungen vorhanden sind.

Biomarkerkandidaten aus Mausmodell	Maus präklinisch	Hund präklinisch	AS I	AS II
Kollagen 1 alpha 1	↑	↗		
Gelsolin	↑	↑		
Transferrin	↑	↕	↗	↗
Retinol-bindendes Protein 4	↑	↘↔		
SOX	↑	↑		↑
Serpin family A member 3 K	↑		↓	↓
Serpin family A member 3 C	↑		↓	↓
Serpin family A member 3 M	↑		↓	↓
Serpin family A member 3 F	↑		↓	
Hemopexin	↗	↘↔	↗	↗
Kininogen III	↑	Kininogen I ↓	↑	
Beta-2-Glykoprotein	↑		↑	↑
Vomeronasal 2. Receptor 67	↑		↑	
Superoxide dismutase (Cu-Zn)	↑			
Betaine Homocysteine S Methyltransferase 1	↑			

Eine Vielzahl an potentiellen Biomarkern konnte in beiden Spezies nachgewiesen werden. Dies betrifft synergistische Konzentrationserhöhungen von Gelsolin, Fibronectin und SOX, sowie ein Konzentrationsabfall von Coeruloplasmin. Für weitere Proteine gelang im Hundemodell zumindest fraktionsweise die Bestätigung des Mausmodells (erhöhte Ratios von Transferrin, Angiotensinogen, Afamin, alpha-2-Makroglobulin, sowie Konzentrationsabfall von Transthyretin in Merkmalsträgern).

Ein Teil der nachweisbaren Biomarker ist jedoch bei Maus und Hund gegenläufig. So gelang zwar der Nachweis von RBP4 auch beim Hund, allerdings sind die Ratios vorwiegend erniedrigt. Im Plasma von 4,5 Wochen alten COL4A3^{-/-} Mäusen ist das RBP 4 hingegen eines der am stärksten erhöhten Proteine. Dieser Effekt schwindet allerdings mit Progredienz der Erkrankung. Ähnliche Ergebnisse finden sich für Hemopexin, das Vitamin D-bindende Protein und eine Vielzahl an Apolipoproteinen, sowie Komplementfaktoren.

Andere im Mausmodell vorgeschlagene Biomarker konnten nicht in den Hundeproben nachgewiesen werden. Dies betrifft u.a. die Superoxid Dismutase und Mitglieder der Serpin A Familie. Für einzelne im Mausmodell vorgeschlagene Biomarker lassen sich nur andere Isoformen beim Hund nachweisen. So zeigten präklinische Mäuse einen Konzentrationsanstieg von Kininogen III. Im vorliegenden präklinischen Hundemodell hingegen war lediglich ein Abfall der Kininogen I Konzentration nachweisbar. Somit muss künftig geprüft werden, ob die gefundenen Konzentrationsunterschiede Stadien- bzw. Spezies-spezifisch sind. Wäre Letzteres der Fall, muss dies in der Evaluation humaner Plasmaproben beachtet werden.

Zudem untersuchten Muckova et al. ARAS-Mäuse, während die untersuchten Hunde in dieser Promotionsarbeit XLAS-Merkmalsträger waren. Obwohl die Pathomechanismen vergleichbar sind, kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich die Proteinmarker zwischen den einzelnen Formen des AS, sowie zwischen den Spezies unterscheiden.

6.4 Methodenkritik

In einem hypothesenfreien Ansatz zur Biomarkersuche wurden die Proben von der AG Proteomics in einer zweidimensionalen, chromatographischen Proteinseparation automatisiert parallel aufgearbeitet. Dies gewährleistet die Vergleichbarkeit zwischen den Kollektiven.

In dieser Untersuchung wurde nur jede zweite Fraktion innerhalb der 2D-Proteinverteilung analysiert. Aufgrund der chromatographischen Verteilung über mehrere Fraktionen kann zwar davon ausgegangen werden, dass auf diese Weise der Großteil der bedeutenden Proteinabweichungen abgebildet wurde. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei einer solchen Eingrenzung einige sehr niedrig konzentrierte Proteine nicht erkannt wurden.

Je nach posttranslationaler Modifikation zeigen verschiedene Proteoformen eine andere Verteilung nach der Chromatographie. Die so entstehenden Cluster führen mitunter auch zu gegenläufigem Verhalten der Ratios in der 2D-Proteinverteilung. Dies erschwert die stringente Beurteilung und Evaluation der Konzentrationsunterschiede in Plasmaproben mit kommerziellen Testen. Gleichzeitig liegt in dieser Unterscheidung einzelner Proteoformen eine methodische Stärke. So wäre es denkbar, zukünftig nach eben diesen spezifischen Proteinalterationen im Plasma von Patienten zu suchen und damit Spezifität und Sensitivität der Nachweisverfahren deutlich zu erhöhen.

Die verwendete Massenspektrometrie-Methode ist ein semiquantitatives Verfahren, bei dem nur grobe und relative Abweichungen zwischen den Vergleichskollektiven, nicht aber absolute Werte abgebildet werden. Für eine klinische Anwendung fehlt die Übersetzung der Ratios in absolute Konzentrationswerte mit entsprechenden *Cut-off*-Grenzen und für die klinische Chemie praktikable Analyseverfahren. Zudem müssen die Grenzen des Nachweisverfahrens (Messungenauigkeiten, Störanfälligkeit) erwähnt werden.

In dieser Untersuchung wurden sehr strenge Einschlusskriterien definiert (Vgl. 4.4.5). Die genutzte Methodik gewährleistet hingegen, dass bereits zweifach veränderte Ratios „vom Zufall sicher unterscheidbar“ sind. Daher ist davon auszugehen, dass bereits eine Ratio $> 2,0$ bzw. $< 0,5$ die gefundenen Konzentrationsänderungen deutlich und signifikant abbilden kann. In der vorliegenden Studie könnten Ratios in dem Bereich daher als „unverändert“ eingestuft worden sein, die bei Anwendung weniger strikter Kriterien bereits verlässlich Unterschiede zwischen Merkmalsträgern und Vergleichskollektiv abbilden könnten.

Die Validität und Spezifität der kommerziell erworbenen ELISA-Kits wird durch die Hersteller definiert. Allerdings werden die exakte Epitop-Spezifität, sowie mögliche Kreuzreaktivitäten der Kits vom Hersteller nicht eindeutig offengelegt. Vor allem Ersteres könnte für posttranslational veränderte Proteine eine Schwäche der Immuntestevaluierung darstellen. So misslang der Nachweis des SAA mittels Immuntest. Da das Massenspektrometer jedoch hauptsächlich höher konzentrierte Proteine ($> 0,1$ nM) nachweist, kann davon ausgegangen werden, dass die vorgeschlagenen Proteine tatsächlich in den Proben in ausreichender Konzentration auftauchen. Daher liegt die Vermutung nahe, dass der genutzte Immuntest zwar mit den vom Hersteller gelieferten Standards, nicht jedoch mit den nativen Proben funktioniert hat. Somit muss zukünftig eine erneute Immuntestevaluierung mithilfe anderer Testbedingungen erfolgen.

Zudem muss angemerkt werden, dass viele der Grundlagenuntersuchungen bisher nicht an präklinischen AS-Merkmalsträgern, sondern an klinisch manifesten Stadien durchgeführt worden sind. Für einige der hier vorgeschlagenen Plasmaproteine, z.B. HABP2, bleibt nur der Vergleich mit anderen Nephropathien. Ein Großteil der Studien untersucht zudem die Urinkonzentrationen der einzelnen Stoffe. Dies ermöglicht zwar eine Aussage über den Zustand der Nierenfiltrationsbarriere und Tubulusfunktion, ist aber zur präklinischen Diagnostik einer Glomerulopathie ungeeignet, da mit Auftauchen dieser Marker im Urin bereits das symptomatische Stadium des AS erreicht ist und die Patienten nicht mehr in vollem Umfang von den Therapieoptionen profitieren. Die Einordnung der von uns gefundenen Proteinaberrationen im Plasma der Merkmalsträger ist somit erschwert, da vergleichbare Studien rar sind. Einige Proteine (z.B. Talin 1) werden nach vorliegendem Kenntnisstand in dieser Arbeit erstmals als mögliche Biomarker vorgeschlagen.

Zukünftige retro- und prospektive Untersuchungen potentieller Biomarker benötigen daher größere Probenzahlen und vor allem humane Proben, sowie Detektionsverfahren, die die spezifischen posttranslationalen Modifikationen der entdeckten Proteine erfassen. Zudem muss ein möglicher geschlechtsspezifischer Konzentrationsunterschied einzelner Proteine (z.B. Adiponektin) untersucht und gegebenenfalls auch zwischen den einzelnen Varianten des AS unterschieden werden.

7 Schlussfolgerung

Mithilfe massenspektrometrischer Analyseverfahren ist es gelungen, im Plasma männlicher Hundewelpen, die den genetischen Defekt des AS tragen, Proteine zu identifizieren, welche sich in ihrer Konzentration deutlich von gesunden männlichen Geschwistertieren unterscheiden und diese teilweise mittels Immuntest zu überprüfen.

Einige Ergebnisse früherer Studien wurden dabei bestätigt. So konnten erhöhte Plasmakonzentrationen von Pentraxin und SAA, sowie ein Abfall der Kallikreinkonzentration im Rahmen von Nephropathien auch beim präklinischen AS dargestellt werden. Zudem gelang die Bestätigung einiger im Mausmodell von Muckova et al. vorgeschlagener Biomarker. Dies betrifft insbesondere den Anstieg der Plasmakonzentration von Proteoformen des Gelsolin und SOX in AS-Merkmalsträgern.

Ein Teil der Proteine wird zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit erstmalig als Markerkandidaten zur Detektion des AS vorgeschlagen (z.B. Talin 1, HABP2). Andere nachgewiesene Alterationen stehen hingegen im Widerspruch zu früheren Ergebnissen. Im Vergleich zum Mausmodell fällt zudem auf, dass ein Teil der vorgeschlagenen Biomarker zwar auch in dieser Untersuchung nachgewiesen werden konnten. Allerdings zeigen diese oftmals zum Mausmodell gegenläufige Konzentrationsveränderungen. So ließ sich die Erhöhung der RBP-Konzentration, sowie der Anstieg diverser Komplementfaktoren beim präklinischen AS-Hund nicht bestätigen.

Für die Anwendung der Biomarker zur Diagnostik des präklinischen AS empfehlen sich insbesondere jene Marker, die einen deutlichen bzw. ausschließlichen Konzentrationsanstieg in der Gruppe der Merkmalsträger aufweisen. Diesbezüglich werden in dieser Promotionsarbeit folgende Proteine als Markerkandidaten vorgeschlagen: Serum-Amyloid A, Gelsolin und Adiponektin.

SAA ist ein besonders vielversprechender Markerkandidat, da ausschließlich Konzentrationserhöhungen in Merkmalsträgern nachgewiesen wurden. Zukünftig braucht es allerdings eine erneute Immuntestevaluierung mithilfe anderer Testbedingungen als die hier erprobten. Ein weiterer aussichtsreicher potentieller Biomarker ist Gelsolin. Da sich allerdings neben Clustern stark erhöhter Ratios auch Cluster deutlicher Erniedrigungen in Merkmalsträgern finden, muss eine Differenzierung einzelner Proteoformen erfolgen, um die diagnostische Spezifität dieses Biomarkers zu steigern. In der 2D-Proteinverteilung des Adiponektins findet sich ein eindeutiges Cluster, welches nur in AS-Merkmalsträgern, nicht

aber in der Wildtyp-Kontrolle nachweisbar ist. Gelingt es, diese Proteoform zu identifizieren und zu spezifizieren, kann daraus ein valider Biomarker abgeleitet werden, der zwischen präklinischen Merkmalsträgern und Gesunden unterscheidet.

Das wichtigste Ergebnis dieser Arbeit ist, dass eine eindeutige Charakterisierung einzelner Proteoformen erforderlich ist, um Proteoform-selektive ELISA für die klinische Anwendung auszuwählen bzw. zu entwickeln. Zudem bedarf es der Ermittlung der Sensitivität und Spezifität einzelner Marker anhand größerer Probenmengen und unter Umständen empfindlicherer Messmethoden in letztlich humanen Plasmaproben. Ist dies erfolgt, kann ein daraus resultierender Test zur Diagnostik des präklinischen Alportsyndroms realisiert werden. Auf diese Weise kann eine Vielzahl von Patienten rechtzeitig der geeigneten Therapie zugeführt und deren Überleben bedeutend verlängert werden.

8 Literaturverzeichnis

- Abbate M, Zoja C, Corna D, Capitaine M, Bertani T, Remuzzi G. 1998. In progressive nephropathies, overload of tubular cells with filtered proteins translates glomerular permeability dysfunction into cellular signals of interstitial inflammation. *Journal of the American Society of Nephrology*, 9(7):1213-1224.
- Abrahamson DR, Hudson BG, Stroganova L, Borza DB, St John PL. 2009. Cellular origins of type IV collagen networks in developing glomeruli. *Journal of the American Society of Nephrology*, 20(7):1471-1479.
- Alert M. 2018. Suche nach präklinischen Biomarkern bei Alport Syndrom im Mausmodell [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Alport AC. 1927. Hereditary Familial Congenital Haemorrhagic Nephritis. *The BMJ*, 1(3454):504-506.
- Anderberg RJ, Meek RL, Hudkins KL, Cooney SK, Alpers CE, Leboeuf RC, Tuttle KR. 2015. Serum amyloid A and inflammation in diabetic kidney disease and podocytes. *Laboratory Investigation*, 95(3):250-262.
- Anderson PW, Do YS, Hsueh WA. 1993. Angiotensin II causes mesangial cell hypertrophy. *Hypertension*, 21(1):29-35.
- Arora PD, Glogauer M, Kapus A, Kwiatkowski DJ, McCulloch CA. 2004. Gelsolin Mediates Collagen Phagocytosis through a Rac-dependent Step. *Molecular Biology of the Cell*, 15(2):588-599.
- Assmann KJ, Koene RA, Wetzels JF. 1995. Familial glomerulonephritis characterized by massive deposits of fibronectin. *American Journal of Kidney Disease*, 25(5): 781-791.
- Attman PO, Samuelsson O, Alaupovic P. 1993. Lipoprotein metabolism and renal failure. *American Journal of Kidney Diseases*, 21(6):573-592.
- Bae EH, Konvalinka A, Fang F, Zhou X, Williams V, Maksimowski N, Song X, Zhang SI, John R, Oudit GY, Pei Y, Scholey JW. 2015. Characterization of the intrarenal renin-angiotensin system in experimental Alport syndrome. *The American Journal of Pathology*: 185(5):1423-1435.

- Bakkaloglu SA, Soylemezoglu O, Buyan N, Funahashi T, Ethan AH, Peru H, Fudan K, Yilmaz S, Hasanoglu E. 2005. High serum adiponectin levels during steroid-responsive nephrotic syndrome relapse. *Pediatric Nephrology*, 20(4):474-477.
- Bakker WW, Borghuis T, Harmsen MC, van den Berg A, Kema IP, Niezen KE, Kapojos JJ. 2005. Protease activity of plasma hemopexin. *Kidney International*, 68(2):603-610.
- Baum A, Pohl M, Kreuzsch S, Cumme GA, Ditze G, Misselwitz J, Kiehntopf M, Udby L, Meier-Hellmann A, Rhode H. 2008. Searching biomarker candidates in serum using multidimensional native chromatography. II Method evaluation with Alport syndrome and severe inflammation. *Journal of Chromatography B*, 876(1):31-40.
- Bernard AM, Amor AA, Goemaere-Vanneste J, Antoine JL, Lauwerys RR, Lambert A, Vandeleene B. 1988. Microtransferrinuria is a more sensitive indicator of early glomerular damage in diabetes than microalbuminuria. *Clinical Chemistry*, 34(9):1920-1921.
- Bharadwaj D, Mold C, Markham E, Du Clos TW. 2001. Serum Amyloid P Component Binds to Fcγ Receptors and Opsonizes Particles for Phagocytosis. *The Journal of Immunology*, 166(11):6735-6741.
- Biomarkers Definition Working Group. 2001. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 69(3):89-95.
- Blaes N, Pécher C, Mehrenberger M, Cellier E, Praddaude F, Chevalier J, Tack I, Couturem R, Girolami JP. 2012. Bradykinin inhibits high glucose- and growth factor-induced collagen synthesis in mesangial cells through the B2-kinin receptor. *American Journal of Physiology*, 303(2):F293-F303
- Bonnans C, Chou J, Werb Z. 2014. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(12):786-801.
- Boyne MS, Bennett NR, Cooper RS, Royal-Thomas TY, Bennett FI, Luke A, Wilks RJ, Forrester TE. 2010. Sex-differences in adiponectin levels and body fat distribution: longitudinal observations in Afro-Jamaicans. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 90(2):e33-36.

- Brandt LE, Ehrhart EJ, Scherman H, Olver CS, Bohn AA, Prenni JE. 2014. Characterization of the canine urinary proteome. *Veterinary Clinical Pathology*, 43(2):193-205.
- Brooimans RA, Stegmann APA, van Dorp WT, van der Ark AA, van der Woude FJ, van Es LA, Daha MR. 1991. Interleukin 2 mediates stimulation of complement C3 biosynthesis in human proximal tubular epithelial cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 88(2):379-384.
- Brunskill NJ. 2004. Albumin signals the Coming of Age of Proteinuric Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 15(2):504-505.
- Bucki R, Levental I, Kulakowska A, Janney PA. 2008. Plasma Gelsolin: Function, Prognostic Value, and Potential Therapeutic Use. *Current Protein and Peptide Science*, 9(6):541-551.
- Bykov K, Boettger T, Ruehle PF, Nielsen NV, Etscheid M, Kanse SM. 2017. Factor VII activating protease (FSAP) regulates the expression of inflammatory genes in vascular smooth muscle and endothelial cells. *Atherosclerosis*, 265:133-139.
- Calero M, Rostagno A, Frangione B, Ghiso J. 2005. Clusterin and Alzheimer's disease. *Subcellular Biochemistry*, 38: 273-298.
- Cammisotto PG, Bendayan M. 2008. Adiponectin stimulates phosphorylation of AMP-activated protein kinase alpha in renal glomeruli. *Journal of Molecular Histology*, 39(6):579-584.
- Castaño AP, Lin SL, Surowy T, Nowlin BT, Turlapati SA, Patel T, Singh A, Li S, Lupher Jr ML, Duffield JS. 2009. Serum Amyloid P Inhibits Fibrosis Through FcγR-Dependent Monocyte-Macrophage Regulation in Vivo. *Science Translational Medicine*, 1(5):5ra13.
- Castelletti F, Donadelli R, Banterla F, Hildebrandt F, Zipfel PF, Bresin E, Otto E, Skerka C, Renieri A, Todeschini M, Caprioli J, Caruso RM, Arturo R, Remuzzi G, Noris M. 2008. Mutations in FN1 cause glomerulopathy with fibronectin deposits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(7):2538-2543.
- Cerón JJ, Eckersall PD, Martínez-Subiela S. 2005. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Veterinary Clinical Pathology*, 34(2):85-99.

- Chacar F, Kogika M, Sanches TR, Caragelasco D, Martorelli C, Rodrigues C, Capcha JMC, Chew D, Andrade L. 2017. Urinary Tamm-Horsfall protein, albumin, vitamin D-binding protein, and retinol-binding protein as early biomarkers of chronic kidney disease in dogs. *Physiological Reports*, 5(11):e13262.
- Charbit M, Gubler MC, Dechaux M, Gagnadoux MF, Grünfeld JP, Niaudet P. 2007. Cyclosporin therapy in patients with Alport syndrome. *Pediatric Nephrology*, 22(1):57-63.
- Chen J, Chen JK, Harris RC. 2012. Angiotensin II Induces Epithelial-Mesenchymal Transition in Renal Epithelial Cells through Reactive Oxygen Species/Src/Caveolin-Mediated Activation of an Epidermal Growth Factor Receptor-Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling Pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 32(5):981-991.
- Chudek J, Adamczak M, Nieszporek T, Wiecek A. 2006. The adipose tissue as an endocrine organ - a nephrologists' perspective. *Contributions to Nephrology*, 151:70-90.
- Choi-Miura NH, Tobe T, Sumiya J, Nakano Y, Sano Y, Mazda T, Tomita M. 1996. Purification and characterization of a novel hyaluronan-binding protein (PHBP) from human plasma: it has three EGF, a kringle and a serine protease domain, similar to hepatocyte growth factor activator. *The Journal of Biochemistry*, 119(6):1157-1165.
- Chugh KS, Sakhuja V, Agarwal A, Jha V, Joshi K, Datta BN, Gupta A, Gupta KL. 1993. Hereditary nephritis (Alport's syndrome) - clinical profile and inheritance in 28 kindreds. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 8(8):690-695.
- Clare DA, Horton HR, Stabel TJ, Swaisgood HE, Lecce JG. 1984. Tissue Distribution of Mammalian Sulfhydryl Oxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 230(1):138-145.
- Coombs TP, Berg AH, Rajala MW, Klebanov S, Iyengar P, Jimenez-Chillaron JC, Patti ME, Klein SL, Weinstein RS, Scherer PE. 2003. Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. *Diabetes*, 52(2):268-276.
- Coritsidis G, Rifici V, Gupta S, Rie J, Shan Z, Neugarten J, Schlondorff D. 1991. Preferential binding of oxidized LDL to rat glomeruli in vivo and cultured mesangial cells in vitro. *Kidney International*, 39(5):858-866.

- Correa-Rotter R, Ibarra-Rubio ME, Schwochau G, Cruz C, Silkensen JR, Pedraza-Chaverri J, Chmielewski D, Rosenberg ME. 1998. Induction of clusterin in tubules of nephrotic rats. *Journal of the American Society of Nephrology*, 9(1):33-37.
- Cosgrove D, Liu S. 2017. Collagen IV diseases: A focus on the glomerular basement membrane in Alport syndrome. *Matrix Biology*, 57-58:45-54.
- Cosgrove D, Rodgers K, Meehan D, Miller C, Bovard K, Gilroy A, Gardner H, Kotelianskyy V, Gotwals P, Amatucci A, Kalluri R. 2000. Integrin $\alpha 1\beta 1$ and transforming growth factor- $\beta 1$ play distinct roles in Alport glomerular pathogenesis and serve as dual targets for metabolic therapy. *The American Journal of Pathology*, 157(5):1649-1659.
- Couchman JR, Beavan LA, McCarthy KJ. 1994. Glomerular matrix: synthesis, turnover and role in mesangial expansion. *Kidney International*, 45(2):328-335.
- Couser WG. 1998. Pathogenesis of glomerular damage in glomerulonephritis. *Nephrology Dialysis Transplant*, 13(Suppl. 1):10-15.
- Cray C, Zaias J, Altman NH. 2009. Acute Phase Response in Animals: A Review. *Comparative Medicine*, 59(6):517-526.
- Crisan D, Carr J. 2000. Angiotensin I-Converting Enzyme: genotype and Disease Associations. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 2(3):105-115.
- D'Amico G, Bazzi C. 2003. Pathophysiology of proteinuria. *Kidney International*, 63(3):809-825.
- Daniel JM, Reichel CA, Schmidt-Woell T, Lutzmann J, Zuchriegel G, Krombach F, Herold J, Bauersachs J, Sedding DG, Kanse SM. 2016. Factor vii-activating protease deficiency promotes neointima formation by enhancing leukocyte accumulation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 14(10):2058-2067.
- DeLoor J, Daminet S, Smets P, Maddens B, Meyer E. 2013. Urinary biomarkers for acute kidney injury in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(5):998-1010.
- Dennis J, Meehan DT, Delimont D, Zallocchi M, Perry GA, O'Brien S, Tu H, Pihlajaniemi T, Cosgrove D. 2010. Collagen XIII Induced in Vascular Endothelium Mediates $\alpha 1\beta 1$

Integrin-Dependent Transmigration of Monocytes in Renal Fibrosis. *The American Journal of Pathology*, 177(5):2527-2540.

Donadio C, Lucchesi A, Ardini M, Giordani R. 2001. Cystatin C, β 2-microglobulin, and retinol-binding protein as indicators of glomerular filtration rate: comparison with plasma creatinine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24(5-6):835-842.

Drechsler C, Krane V, Winkler K, Dekker FW, Wanner C. 2009. Changes in adiponectin and the risk of sudden death, stroke, myocardial infarction, and mortality in hemodialysis patients. *Kidney International*, 76(5):567-575.

Duchene J, Ahluwalia A. 2009. The kinin B(1) receptor and inflammation: new therapeutic target for cardiovascular disease. *Current Opinion in Pharmacology*, 9(2):125-131.

Duchene J, Cayla C, Vessillier S, Scotland R, Yamashiro K, Lecomte F, Syed I, Vo P, Marrelli A, Pitzalis C, Cipollone F, Schanstra J, Bascands JL, Jobbs AJ, Perretti M, Ahluwalia A. 2009. Laminar shear stress regulates endothelial kinin B1 receptor expression and function: potential implication in atherogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29(11):1757-1763.

Durvasula RV, Petermann AT, Hiromura K, Blonski M, Pippin J, Mundel P, Pichler R, Griffin S, Houser WG, Shankland SJ. 2004. Activation of a local tissue angiotensin system in podocytes by mechanical strain. *Kidney International*, 65(1):30-39.

Eddy AA, Symons JM. 2003. Nephrotic syndrome in childhood. *Lancet*, 362(9384):629-639.

Emanuelli C, Bonaria Salis M, Stacca T, Pintus G, Kirchmair R, Isner JM, Pinna A, Gaspa L, Regoli D, Cayla C, Pesquero JB, Bader M, Madeddu P. 2002. Targeting kinin B(1) receptor for therapeutic neovascularization. *Circulation*, 105(3):360-366.

Endlich K, Kliewe F, Endlich N. 2017. Stressed podocytes - mechanical forces, sensors, signaling and response. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 469(7-8): 937-949.

Etscheid M, Beer N, Dodt J. 2005. The hyaluronan-binding protease up regulates ERK1/2 and PI3K/Akt signaling pathways in fibroblasts and stimulates cell proliferation and migration. *Cellular Signalling*, 17(12):1486-1494.

- Etscheid M, Beer N, Fink E, Seitz R, Johannes D. 2002. The hyaluronan-binding serine protease from human plasma cleaves HMW and LMW kininogen and releases bradykinin. *Journal of Biological Chemistry*, 383(10):1633-1643.
- Faccio G, Nivala O, Kruus K, Buchert J, Saloheimo M. 2011 A. Sulfhydryl oxidases: sources, properties, production and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(4):957-966.
- Faraggiana T, Churg J. 1987. Renal Lipidoses: A Review. *Human Pathology*, 18(7):661-679.
- Feingold J, Bois E, Chompert A, Broyer M, Gubler MC, Grünfeld JP. 1985. Genetic heterogeneity of Alport syndrome. *Kidney International*, 27(4):672-677.
- Ferlizza E, Campos A, Neagu A, Cuoghi A, Bellen E, Monari E, Dondi F, Almeida AM, Isani G. 2015. The effect of chronic kidney disease on the urine proteome in the domestic cat (*Felis catus*). *The Veterinary Journal*, 204(1):73-81.
- Flaig MJ, Krieg RC. 2005. Proteomics: Die Zukunft hat schon begonnen. In: Plewig G, Kaudewitz P, Sander CA, Hrsg. *Fortschritte der praktischen Dermatologie und Venerologie*. Heidelberg: Springer Verlag, 19:90-95.
- Fleck A. 1989. Clinical and nutritional aspects of changes in acute-phase proteins during inflammation. *Proceedings of the Nutrition Society*, 48(3):347-354.
- Flinter FA, Cameron JS, Chantler C, Houston I, Bobrow M. 1988. Genetics of classic Alports syndrome. *Lancet*, 2(8618):1005-1007.
- Fogo AB. 2007. Mechanisms of progression of chronic kidney disease. *Pediatric Nephrology*, 22(12):2011-2022.
- Forterre S, Raila J, Schweigert FJ. 2004. Protein profiling of urine from dogs with renal disease using ProteinChip analysis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 16(4):271-277.
- Frolova EG, Sopko N, Blech L, Popović ZB, Li J, Vasanji A, Drumm C, Krukovets I, Jain MK, Penn MS, Plow EF, Stenina OI. 2012. Thrombospondin-4 regulates fibrosis and remodeling of the myocardium in response to pressure overload. *The FASEB Journal*, 26(6):2363-2373.

- Gabbay C, Kushner I. 1999. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *The New England Journal of Medicine*, 340(6):448-454.
- Gall MA, Hougaard P, Borch-Johnsen K, Parving HH. 1997. Risk factors for development of incipient and overt diabetic nephropathy in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus: prospective, observational study. *British Medical Journal*, 314(7083): 783-788.
- Gardner H, Kreidberg J, Kotelianksy V, Jaenisch R. 1996. Deletion of integrin $\alpha 1$ by homologous recombination permits normal murine development but gives rise to a specific deficit in cell adhesion. *Developmental Biology*, 175(2):301-313.
- Garlanda C, Bottazzi B, Bastone A, Mantovani A. 2005. Pentraxins at the Crossroads between Innate Immunity, Inflammation, Matrix Deposition, and Female Fertility. *Annual Review of Immunology*, 23:337-366.
- Gaweda AE. 2017. Markers of Iron Status in Chronic Kidney Disease Diagnosing Iron Deficiency. *Hemodialysis International*, 21(Suppl. 1):21-27.
- Gekle D, Merker HJ. 1966. Neue Vorstellungen über Struktur und Funktion der glomerulären Basalmembran der Niere. *Klinische Wochenschrift*, 44(21):1217-1224.
- Gelse K, Pöschl E, Aigner T. 2003. Collagens - structure, function and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(12):1531-1546.
- Ghiggeri GM, Bruschi M, Candiano G, Rastaldi MP, Scolari F, Passerini P, Musante L, Pertica N, Caridi G, Ferrario F, Perfumo F, Ponticelli C. 2002. Depletion of clusterin in renal diseases causing nephrotic syndrome. *Kidney International*, 62(6):2184-2194.
- Gleeson MJ. 1984. Alport's syndrome: audiological manifestations and implications. *The Journal of Laryngology and Otology*, 98(5):449-465.
- Glomset JA. 1968. The plasma lecithin:cholesterol acyltransferase reaction. *The Journal of Lipid Research*, 9(2):155-167.
- Gloy J, Henger A, Fischer KG, Nitschke R, Bleich M, Mundel P, Schollmeyer P, Greger R, Pavenstädt H. 1998. Angiotensin II modulates cellular functions of podocytes. *Kidney International*, 67(Suppl. 67):168-170.

- Greenberg JH, Kakajiwala A, Parikh CR, Furth S. 2018. Emerging biomarkers of chronic kidney disease in children. *Pediatric Nephrology*, 33(6):925-933.
- Gross O, Beirowski B, Koepke M-L, Kuck J, Reiner M, Addicks K, Smyth N, Schulze-Lohoff E, Weber M. 2003 A. Preemptive ramipril therapy delays renal failure and reduces renal fibrosis in COL4A3-knockout mice with Alport syndrome. *Kidney International*, 63(2):438-446.
- Gross O, Borza DB, Anders HJ, Licht C, Weber M, Segerer S, Tore R, Gabler MC, Heidet L, Harvey S, Cosgrove D, Lees G, Kashtan C, Gregory M, Savige J, Ding J, Thorner P, Abrahamson DR, Antignac C, Tryggvason K, Hudson B, Miner JH. 2009. Stem cell therapy for Alport syndrome: the hope beyond the hype. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 24(3):731-734.
- Gross O, Hoefele J. 2018. Genetische Ursachen und Therapie beim Alport-Syndrom. *Medizinische Genetik*, 30(4):429-437.
- Gross O, Koepke ML, Weber M. 2004 A. Alport Syndrom und familiäre benigne Hämaturie: Eine Übersicht über hereditäre Erkrankungen des Typ IV Kollagens der Gefäßbasalmembranen. *Nieren- und Hochdruckkrankheiten*, 33(7):348-356.
- Gross O, Licht C, Anders HJ, Hoppe B, Beck B, Tönshoff B, Höcker B, Wygoda S, Ehrich JH, Pape L, Konrad M, Rascher W, Deutsch J, Müller-Wiefel DE, Hoyer P, Study Group Members of the Gesellschaft für Pädiatrische Nephrologie, Knebelmann B, Person Y, Grunfeld JP, Niaudet P, Cochat P, Heidet L, Lebahn S, Torra R, Friede T, Lange K, Müller GA, Weber M. 2012. Early angiotensin-converting enzyme inhibition in Alport syndrome delays renal failure and improves life expectancy. *Kidney International*, 81(5):494-501.
- Gross O, Netzer KO, Lambrecht R, Seibold S, Weber M. 2002. Meta-analysis of genotype–phenotype correlation in X-linked Alport syndrome: impact on clinical counselling. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 17(7):1218-1227.
- Gross O, Netzer KO, Lambrecht R, Seibold S, Weber M. 2003 B. Novel COL4A4 splice defect and in-frame deletion in a large consanguine family as a genetic link between benign familial haematuria and autosomal Alport syndrome. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 18(6):1122-1127.

- Gross O, Perin L, Deltas C. 2014. Alport syndrome from bench to bedside: the potential of current treatment beyond RAAS blockade and the horizon of future therapies. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 29(Suppl. 4): iv124-iv130.
- Gross O, Schulze-Lohoff E, Koepke ML, Beirowski B, Addicks K, Block W, Smyth N, Weber M. 2004 B. Antifibrotic, nephroprotective potential of ACE-inhibitor vs. AT1-antagonist in a murine model of renal fibrosis. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 9(7):1716-1723.
- Grünfeld JP, Joly D. 1997. Hereditary kidney diseases in adults [Abstract]. *La Revue du Praticien*, 47(14):1566-1569.
- Gubler MC. 2008. Inherited diseases of the glomerular basement membrane. *Nature Clinical Practice Nephrology*, 4(1):24-37.
- Gubler MC, Levy M, Broyer M, Naizot C, Gonzales G, Perrin D, Habib R. 1981. Alport's syndrome: A report of 58 cases and a review of the literature. *The American Journal of Medicine*, 70(3):493-505.
- Gunwar S, Ballester F, Noelken ME, Sado Y, Ninomiya Y, Hudson BG. 1998. Glomerular basement membrane. Identification of a novel disulfide-cross-linked network of alpha3, alpha4, and alpha5 chains of type IV collagen and its implications for the pathogenesis of Alport syndrome. *Journal of Biological Chemistry*, 273(15):8767-8775.
- Guo X, Zhou G, Guo M, Cheung AK, Huang Y, Beddhu S. 2014. Adiponectin retards the progression of diabetic nephropathy in db/db mice by counteracting angiotensin II. *Physiological Reports*, 2(2):e00230.
- Halberg N, Schraw TD, Wang ZV, Kim JY, Yi J, Hamilton MP, Luby-Phelps K, Scherer PE. 2009. Systemic fate of the adipocyte-derived factor adiponectin. *Diabetes*, 58(9):1961-1970.
- Hallows KR, Mount PF, Pastor-Soler NM, Power DA. 2010. Role of the energy sensor AMP-activated protein kinase in renal physiology and disease. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 298(5):F1067-F1077.
- Han C, Zhang L, Zhu X, Tang J, Jin X. 2013. Plasma gelsolin levels are decreased and correlate with fibrosis in IgA nephropathy. *Experimental Biology and Medicine*, 238(11):1318-1327.

- Hashimura Y, Nozu K, Kaito H, Nakanishi K, Fu XJ, Ohtsubo H, Hashimoto F, Oka M, Ninchoji T, Ishimori S, Morisada N, Matsunoshita, N, Kamiyoshi N, Yoshikawa N, Iijima K. 2014. Milder clinical aspects of X-linked Alport syndrome in men positive for the collagen IV $\alpha 5$ chain. *Kidney International*, 85(5):1208-1213.
- Haynes CM, Titus EA, Cooper AA. 2004. Degradation of misfolded proteins prevents ER-derived oxidative stress and cell death. *Molecular Cell*, 15(5):767-776.
- Heidet L, Dahan K, Zhou J, Xu Z, Cochat P, Gould JDM, Deppig KA, Proesmans W, Guyot C, Guillot M, Roussel B, Tryggvason K, Grünfeld JP, Gabler MC, Antignas C. 1995. Deletions of both $\alpha 5(\text{IV})$ and $\alpha 6(\text{IV})$ collagen genes in Alport syndrome and in Alport syndrome associated with smooth muscle tumours. *Human Molecular Genetics*, 4(1):99-108.
- Heidet L, Gubler M-C. 2009. The Renal Lesions of Alport Syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology*, 20(6):1210-1215.
- Hill C, Logan A, Smith C, Grønbaek H, Flyvbjerg A. 2001. Angiotensin converting enzyme inhibitor suppresses glomerular transforming growth factor beta receptor expression in experimental diabetes in rats. *Diabetologia*, 44(4):495-500.
- Hillmeister P, Persson PB. 2012. The Kallikrein-Kinin system. *Acta Physiologica*, 206(4):215-219.
- Hirashio S, Ueno T, Naito T, Masaki T. 2014. Characteristic kidney pathology, gene abnormality and treatments in LCAT deficiency. *Clinical and Experimental Nephrology*, 18(2):189-193.
- Hokamp JA, Nabity MB. 2016. Renal biomarkers in domestic species. *Veterinary Clinical Pathology*, 45(1):28-56.
- Hornigold N, Johnson TS, Huang L, Haylor JL, Griffin M, Mooney A. 2013. Inhibition of collagen I accumulation reduces glomerulosclerosis by a Hic-5-dependent mechanism in experimental diabetic nephropathy. *Laboratory Investigation*, 93(5):553-565.
- Hsu HH, Hoffmann S, Endlich N, Velic A, Schwab A, Weide T, Schalter E, Pavenstädt H. 2008. Mechanisms of angiotensin II signaling on cytoskeleton of podocytes. *Journal of Molecular Medicine*, 86(12):1379-1394.

- Hugo C. 2003. The thrombospondin 1-TGF- β axis in fibrotic renal disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 18(7):1241-1245.
- Hugo C, Daniel C. 2009. Thrombospondin in renal disease. *Nephron Experimental Nephrology*, 111(3):e61-e66.
- Humphreys BD. 2018. Mechanisms of Renal Fibrosis. *Annual Review of Physiology*, 80:309-326.
- Hunsicker LG, Adler S, Caggiula A, England BK, Greene T, Kusek JW, Rogers NL, Teschan PE. 1997. Predictors of the progression of renal disease in the Modification of Diet in Renal Disease Study. *Kidney International*, 51(6):1908-1919.
- Hutchinson WL, Hohenester E, Pepys MB. 2000. Human Serum Amyloid P Component is a Single Uncomplexed Pentamer in Whole Serum. *Molecular Medicine*, 6(6): 482-493.
- Imbasciati E, Paties C, Scarpioni L, Mihatsch MJ. 1986. Renal lesions in familial lecithin-cholesterol acyltransferase deficiency. Ultrastructural heterogeneity of glomerular changes. *American Journal of Nephrology*, 6(1):66-70.
- Ishimura E, Sterzel RB, Budde K, Kashgarian M. 1989. Formation of Extracellular Matrix by Cultured Rat Mesangial Cells. *American Journal of Pathology*, 134(4):843-855.
- Jais JP, Knebelmann B, Giatras I, DeMarchi M, Rizzoni G, Renieri A, Weber M, Gross O, Netzer KO, Flinter F, Pirson Y, Verellen C, Wieslander J, Persson U, Tryggvason K, Martin P, Hertz JM, Schröder C, Sanak M, Krejcova S, Carvalho MF, Saus J, Antignac C, Smeets H, Gubler MC. 2000. X-linked Alport syndrome: natural history in 195 families and genotype- phenotype correlations in males. *Journal of the American Society of Nephrology*, 11(4):649-657.
- Jais JP, Knebelmann B, Giatras I, DeMarchi M, Rizzoni G, Renieri A, Weber M, Gross O, Netzer KO, Flinter F, Pirson Y, Dahan K, Wieslander J, Persson U, Tryggvason K, Martin P, Hertz JM, Schröder C, Sanak M, Carvalho MF, Saus J, Antignac C, Gubler MC. 2003. X-Linked Alport Syndrome: Natural History and Genotype-Phenotype Correlations in Girls and Women Belonging to 195 Families: A “European Community Alport Syndrome Concerted Action” Study. *Journal of the American Society of Nephrology*, 14(10):2603-2610.

- Janolino VG, Swaisgood HE. 1987. Sulfhydryl Oxidase-Catalyzed Formation of Disulfide Bonds in Reduced Ribonuclease. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 258(1):265-271.
- Jonas A. 1991. Lecithin-cholesterol acyltransferase in the metabolism of high-density lipoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1084(3):205-220.
- Jonas A. 2000. Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1529(1-3):245-256.
- Joshi AU, Orset C, Engelhardt B, Baumgart-Vogt E, Gerriets T, Vivien D, Kanse SM. 2015. Deficiency of Factor VII activating protease alters the outcome of ischemic stroke in mice. *European Journal of Neuroscience*, 41(7):965-975.
- Jung GS, Jeon JH, Jung YA, Choi YK, Kim HS, Kim JG, Park KG, Kim MK, Lee IK. 2014. Clusterin/ apolipoprotein J attenuates angiotensin II-induced renal fibrosis. *PLoS ONE*, 9(8):e105635.
- Jung GS, Kim MK, Jung YA, Kim HS, Park IS, Min BH, Lee KU, Kim JG, Park KG, Lee IK. 2012. Clusterin Attenuates the Development of Renal Fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 23(1):73-85.
- Kakoki M, Sullivan KA, Backus C, Hayes JM, Oh SS, Hua K, Gasim AM, Tomita H, Grant R, Nossov SB, Kim HS, Jennette JC, Feldman EL, Smithies O. 2010. Lack of both bradykinin B1 and B2 receptors enhances nephropathy, neuropathy, and bone mineral loss in Akita diabetic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(22):10190-10195.
- Kalluri R, Shield CF, Todd P, Hudson BG, Neilson EG. 1997. Isoform switching of type IV collagen is developmentally arrested in X-linked Alport syndrome leading to increased susceptibility of renal basement membranes to endoproteolysis. *The Journal of Clinical Investigation*, 99(10):2470-2478.
- Kannemeier C, Al-Fakhri N, Preissner KT, Kanse SM. 2004. Factor VII-activating protease (FSAP) inhibits growth factor-mediated cell proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *The FASEB Journal*, 18(6):728-730.

- Kanse SM, Etscheid M. 2010. Factor VII activating protease (FSAP): caught in the crossfire between polycations and polyanions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 8(3):556-558.
- Kapojos JJ, van den Berg A, van Goor H, te Loo MW, Poelstra K, Borghuis T, Bakker, WW. 2003. Production of hemopexin by TNF-alpha stimulated human mesangial cells. *Kidney International*, 63(5):1681-1686.
- Kashtan CE. 2005. Familial hematurias: what we know and what we don't. *Pediatric Nephrology*, 20(8):1027-1035.
- Kashtan CE. 2018. Renal transplantation in patients with Alport syndrome: patient selection, outcomes and donor evaluation. *International Journal of Nephrology and Renovascular Disease*, 11:267-270.
- Kashtan CE, Ding J, Gregory M, Gross O, Heidet L, Knebelmann B, Rheault M, Licht C. 2013. Clinical practice recommendations for the treatment of Alport syndrome: a statement of the Alport Syndrome Research Collaborative. *Pediatric Nephrology*, 28(1):5-11.
- Kashtan CE, Michael AF. 1996. Alport syndrome. *Kidney International*, 50(5):1445-1463.
- Kim JH, Kim BK, Moon KC, Hong HK, Lee HS. 2003. Activation of the TGF- β /Smad signaling pathway in focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney International*, 64(5):1715-1721.
- Kisilevsky R, Manley PN. 2012. Acute-phase serum amyloid A: perspectives on its physiological and pathological roles. *The Journal of Protein Folding Disorders*, 19(1):5-14.
- Kleman JP, Aeschlimann D, Paulsson M, van der Rest M. 1995. Transglutaminase-catalyzed cross-linking of fibrils of collagen V/XI in A204 rhabdomyosarcoma cells. *Biochemistry*, 34(42):13768-13775.
- Kodali VK, Thorpe C. 2010. Oxidative Protein Folding and the Quiescin-Sulfhydryl Oxidase Family of Flavoproteins. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13(8):1217-1230.

- Kollerits B, Fliser D, Heid IM, Ritz E, Kronenberg F. 2007. Gender-specific association of adiponectin as a predictor of progression of chronic kidney disease: the Mild to Moderate Kidney Disease Study. *Kidney International*, 71(12):1279-1286.
- Kränkel N, Madeddu P. 2009. Helping the circulatory system heal itself: manipulating kinin signaling to promote neovascularization. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 7(3):215-219.
- Kreidberg JA, Donovan MJ, Goldstein SL, Rennke H, Shepherd K, Jones RC, Jenisch R. 1996. Alpha3beta1 integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis. *Development*, 122(11):3537-3547.
- Kress JA, Seitz R, Dodt J, Etscheid M. 2006. Induction of intracellular signaling in human endothelial cells by the hyaluronan-binding protease involves two distinct pathways. *Biological Chemistry*, 387(9):1275-1283.
- Kriz W. 2006. Biologie des Podozyten. *Der Nephrologe*, 1(3):144-152.
- Kriz W. 2013. The pathogenesis of 'classic' focal segmental glomerulosclerosis-lessons from rat models. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 18(Suppl. 6):vi39-44.
- Kriz W, Gretz N, Lemley KV. 1998. Progression of glomerular diseases: is the podocyte the culprit? *Kidney International*, 54(3):687-697.
- Kruegel J, Rubel D, Gross O. 2013. Alport syndrome - insights from basic and clinical research. *Nature Reviews Nephrology*, 9(3):170-178.
- Kwak SJ, Paeng J, Kim DH, Lee SH, Nam BY, Kann HY, Li JJ, Jung DS, Han SH, Ryu DR, Park JT, Chang TI, Yoo TH, Han DS, Kang SW. 2011. Local kallikrein-kinin system is involved in podocyte apoptosis under diabetic conditions. *Apoptosis*, 16(5):478-490.
- Lavoz C, Rodrigues-Diez R, Benito-Martin A, Rayego-Mateos S, Rodrigues-Diez RR, Alique M, Ortiz A, Mezzano S, Egido J, Ruiz-Ortega M. 2012. Angiotensin II contributes to renal fibrosis independently of Notch pathway activation. *PLoS ONE*, 7(7):e40490.
- Lawler J, Duquette M, Whittaker CA, Adams JC, McHenry K, DeSimone DW. 1993. Identification and Characterization of Thrombospondin-4, a New Member of the Thrombospondin Gene Family. *The Journal of Cell Biology*. 120(4):1059-1067.

- LeBlond CP, Inoue S. 1989. Structure, Composition, and Assembly of Basement Membrane. *The American Journal of Anatomy*, 185(4):367-369.
- Lech M, Rommele C, Anders HJ. 2013. Pentraxins in nephrology: C-reactive protein, serum amyloid P and pentraxin-3. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 28(4):803-811.
- Lennon R, Byron A, Humphries JD, Randles MJ, Carisey A, Murphy S, Knight D, Brenchley PE, Zent R, Humphries MJ. 2014. Global Analysis Reveals the Complexity of the Human Glomerular Extracellular Matrix. *Journal of the American Society of Nephrology*, 25(5):939-951.
- Lennon R, Singh A, Welsh GI, Coward RJ, Satchell S, Ni L, Mathieson PW, Bakker WW, Saleem MA. 2008. Hemopexin induces nephrin-dependent reorganization of the actin cytoskeleton in podocytes. *Journal of the American Society of Nephrology*, 19(11):2140-2149.
- Lenz O, Striker LJ, Jacot TA, Elliot SJ, Killen PD, Striker GE. 1998. Glomerular Endothelial Cells Synthesize Collagens but Little Gelatinase A and B. *Journal of the American Society of Nephrology*, 9(11):2040-2047.
- Levey AS, Coresh J, Balk E, Kausz AT, Levin A, Steffes MW, Hogg RJ, Perrone RD, Lau J, Eknoyan G. 2003. National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Annals of Internal Medicine*, 139(2):137-147.
- Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD. 1993. The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The collaborative study group. *The New England Journal of Medicine*, 329(20):1456-1462.
- Lewis GF, Rader DJ. 2005. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circulation Research*, 96(12):1221-1232.
- Li GH, Arora PD, Chen Y, McCulloch CA, Liu P. 2012. Multifunctional roles of gelsolin in health and diseases. *Medical Research Reviews*, 32(5):999-1025.
- Li Y, Wang J, Zhu X, Feng Q, Li X, Feng X. 2012. Urinary protein markers predict the severity of renal histological lesions in children with mesangial proliferative glomerulonephritis. *BMC Nephrology*, 3:29.

- Liu DJX, Meyer E, Broeckx BJB, Daminet S, Delanghe JR, Stock E, Bogaerts E, Hesta M, Vanderperren K. 2018. Variability of serum concentrations of cystatin C and urinary retinol-binding protein, neutrophil gelatinase-associated lipocalin, immunoglobulin G, and c-reactive protein in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32(5):1659-1664.
- Liu SH, Yang CC, Chan DC, Wu CT, Chen LP, Huang JW, Hung KY, Chiang CK. 2016. Chemical chaperon 4-phenylbutyrate protects against the endoplasmic reticulum stress-mediated renal fibrosis *in vivo* and *in vitro*. *Oncotarget*, 7(16):22116-22126.
- Lueck A, Brown D, Kwiatkowski DJ. 1998. The actin-binding proteins adseverin and gelsolin are both highly expressed but differentially localized in kidney and intestine. *Journal of Cell Science*, 111(24):3633-3643.
- Lynch JM, Maillet M, Vanhoutte D, Schloemer A, Sargent MA, Scott Blair N, Lynch KA, Okada T, Aronow BJ, Osinska H, Prywes R, Lorenz JN, Mori K, Lawler J, Robbins J, Molkentin JD. 2012. A thrombospondin-dependent pathway for a protective ER stress response. *Cell*, 149(6):1257-1268.
- Magil AB. 1999. Interstitial foam cells and oxidized lipoprotein in human glomerular disease. *Modern Pathology*, 12(1):33-40.
- Mambetsariev N, Mirzapozazova T, Mambetsariev B, Sammani S, Lennon FE, Garcia JGN, Singleton PA. 2009. Hyaluronic Acid Binding Protein 2 Is a Novel Regulator of Vascular Integrity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(3):483-490.
- Marhaug G, Dowton SB. 1994. Serum amyloid A: An acute phase apolipoprotein and precursor of AA amyloid. *Baillière's Clinical Rheumatology*, 8(3):553-573.
- McGregor B, Colon S, Mutin M, Chignier E, Zech P, McGregor J. 1994. Thrombospondin in human glomerulopathies. A marker of inflammation and early fibrosis. *The American Journal of Pathology*, 144(6):1281-1287.
- McLeod R, Reeve CE, Frohlich J. 1984. Plasma lipoproteins and lecithin: cholesterol acyltransferase distribution in patients on dialysis. *Kidney International*, 25 (4):683- 688.
- Menon V, Li L, Wang X, Greene T, Balakrishnan V, Madero M, Pereira AA, Beck GJ, Kusek JW, Collins AJ, Levey AS, Sarnak MJ. 2006. Adiponectin and mortality in

patients with chronic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 17(9):2599-2606.

Miner JH. 2011. Organogenesis of the kidney glomerulus: focus on the glomerular basement membrane. *Organogenesis*, 7(2):75-82.

Miner JH, Biagent C, Flinter F, Gross O, Judge P, Kashtan CE, Lagas S, Savige J, Blatt D, Ding J, Gale DP, Midgley JP, Povey S, Prunotto, M, Renault D, Skelding J, Turner AN, Gear S. 2014. The 2014 International Workshop on Alport Syndrome. *Kidney International*, 86(4):679-684.

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

Miner JH, Sanes JR. 1996. Molecular and functional defects in kidneys of mice lacking collagen alpha 3(IV): implications for Alport syndrome. *The Journal of Cell Biology*, 135(5):1403-1413.

Morgan BP, Gasque P. 1997. Extrahepatic complement biosynthesis: Where, when and why? *Clinical & Experimental Immunology*, 107(1):1-7.

Muckova P, Wendler S, Rubel D, Bücher R, Alert M, Gross O, Rhode H. 2015. Pre-clinical alterations in the serum of COL4A3^{-/-} mice as early biomarkers of Alport syndrome. *Journal of Proteomic Research*, 14(12):5202-5214.

Muppala S, Xiao R, Krukovets I, Verbovetsky D, Yendamuri R, Habib N, Raman P, Plow E, Stenina-Adognravi O. 2017. Thrombospondin-4 mediates TGF- β -induced angiogenesis. *Oncogene*, 36(36):5189-5198.

Mustonen E, Aro J, Puhakka J, Ilves M, Soini Y, Leskinen H, Ruskoaho H, Rysä J. 2008. Thrombospondin-4 expression is rapidly upregulated by cardiac overload. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 373(2):186-191.

Naicker S, Naidoo S, Ramsaroop R, Moodley D, Bhoola K. 1999. Tissue kallikrein and kinins in renal disease. *Immunopharmacology*, 44(1-2):183-192.

- Nakagawa N, Barron L, Gomez IG, Johnson BG, Roach AM, Kameoka S, Jack RM, Luper Jr ML, Gharib SA, Duffield JS. 2016. Pentraxin-2 suppresses c-Jun/AP-1 signaling to inhibit progressive fibrotic disease. *JCI Insight*, 1(20):e87446.
- Nakamaki S, Satoh H, Kudoh A, Hayashi Y, Hirai H, Watanabe T. 2011. Adiponectin reduces proteinuria in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*, 236(5):614-620.
- Naughton MA, Botto M, Carter MJ, Alexander GJ, Goldman JM, Walport MJ. 1996. Extrahepatic secreted complement C3 contributes to circulating C3 levels in humans. *The Journal of Immunology*, 156(8):3051-3056.
- Neilson EG. 2006. Mechanisms of disease: fibroblasts - a new look at an old problem. *Nature Clinical Practice Nephrology*, 2(2):101-108.
- Noris M, Remuzzi G. 2013. Overview of complement activation and regulation. *Seminars in Nephrology*, 33(6):479-492.
- Nykvist P, Tu H, Ivaska J, Käpylä J, Pihlajaniemi T, Heino J. 2000. Distinct recognition of collagen subtypes by alpha(1)beta(1) and alpha(2)beta(1) integrins. Alpha(1)beta(1) mediates cell adhesion to type XIII collagen. *Journal of Biological Chemistry*, 275(11):8255-8261.
- Ohashi K, Iwatani H, Kihara S, Nakagawa Y, Komura N, Fujita K, Maeda N, Nishida M, Katsube F, Shimomura I, Ito T, Funahashi T. 2007. Exacerbation of albuminuria and renal fibrosis in subtotal renal ablation model of adiponectin-knockout mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 27(9):1910-1917.
- Oka M, Nozu K, Kaito H, Fu XJ, Nakanishi K, Hashimura Y, Morisada N, Yan K, Matsuo M, Yoshikawa N, Vorechovsky I, Iijima K. 2014. Natural history of genetically proven autosomal recessive Alport syndrome. *Pediatric Nephrology*, 29(9):1535-1544.
- Onogi H, Inagi R, Miyata T, Nangaku M, Kurokawa K. 2004. Proteomics and Mesangial Cell: Serpin, Megsin and Plasmin. *Proteomics in Nephrology*, 141:212-220.
- Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y. 1999. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation*, 100(25):2473-2476.

- Pallet N, Chauvet S, Chassé JF, Vincent M, Villach P, Levi C, Meas-Yedid V, Olivo-Marin JC, Nga-Matsogo D, Beaune P, Thervet E, Karras A. 2014. Urinary Retinol Binding Protein Is a Marker of the Extent of Interstitial Kidney Fibrosis. *PLoS ONE*, 9(1):e84708.
- Parahuleva MS, Maj R, Hölschermann H, Parviz B, Abdallah Y, Erdogan A, Tillmanns H, Kanse SM. 2013. Regulation of monocyte/ macrophage function by factor VII activating protease (FSAP). *Atherosclerosis*, 230(2):365-372.
- Pavlou MP, Diamandis EP, Blasutig IM. 2013. The Long Journey of Cancer Biomarkers from the Bench to the Clinic. *Clinical Chemistry*, 59(1):147-157.
- Pawluczyk IZA, Patel SR, Harris KPG. 2006. Pharmacological Enhancement of the Kallikrein-Kinin System Promotes Anti-Fibrotic Responses in Human Mesangial Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 18(6):327-336.
- Peddada N, Sagar A, Ashish, Garg R. 2012. Plasma gelsolin: A general prognostic marker of health. *Medical Hypotheses*, 78(2):203-210.
- Pichler R, Afkarian M, Dieter BP, Tuttle KR. 2017. Immunity and inflammation in diabetic kidney disease: translating mechanisms to biomarkers and treatment targets. *American journal of Physiology - Renal Physiology*, 312(4):716-731.
- Piktel E, Levental I, Durnás B, Janney PA, Bucki R. 2018. Plasma Gelsolin: Indicator of Inflammation and Its Potential as a Diagnostic Tool and Therapeutic Target. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9):2516.
- Pirson Y. 1999. Making the diagnosis of Alport's syndrome. *Kidney International*, 56(2):760-775.
- Pohl M. 2008. Das Alportsyndrom - proteomicsbasierte Suche nach Biomarkern im Serum [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Pohl M, Danz K, Gross O, John U, Urban J, Patzer L, Habbig S, Feldkötter M, Witzke O, Walther M, Rhode H. 2013. Diagnosis of Alport syndrome - search for proteomic biomarkers in body fluids. *Pediatric Nephrology*, 28(11):2117-2123.
- Ponticelli C, Anders HJ. 2017. Thrombospondin immune regulation and the kidney. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 32(7):1084-1089.

- Pozzi A, Wary KK, Giancotti FG, Gardner HA. 1998. Integrin $\alpha 1\beta 1$ mediates a unique collagen-dependent proliferation pathway in vivo. *Journal of Cell Biology*, 142(2):587-594.
- Prodinger WM, Stoiber H, Dietrich MP. 2003. Complement. In: Paul WE, Hrsg. *Fundamental immunology*. 5. Auflage, Volume 1. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 1077-1103.
- Rastaldi MP, Candiano G, Musante L, Bruch M, Armelloni S, Rimoldi L, Tardanico R, Sanna-Cherchi S, Ferrario F, Montinaro V, Haupt R, Parodi S, Carnevalli ML, Allegri L, Camussi G, Gesualdo L, Scolari F, Ghiggeri GM. 2006. Glomerular clusterin is associated with PKC-alpha/beta regulation and good outcome of membranous glomerulonephritis in humans. *Kidney International*, 70(3):477-485.
- Reindl J. 2016. *Proteomics-basierte Biomarkersuche bei Psoriasis [Dissertation]*. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Remuzzi G, Bertani T. 1998. Pathophysiology of progressive nephropathies. *The New England Journal of Medicine*, 339(20):1448-1456.
- Ricklin D, Hajishengallis, G, Yang K, Lambris JD. 2010. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature Immunology*, 11(9):785-797.
- Ricklin D, Lambris DJ. 2013. Complement in immune and inflammatory disorders: therapeutic interventions. *The Journal of Immunology*, 190(8):3839-3847.
- Ricklin D, Reis ES, Lambris JD. 2016. Complement in disease: a defence system turning offensive. *Nature Reviews Nephrology*, 12(7):383-401.
- Rifai N, Gillette MA, Carr SA. 2006. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nature Biotechnology*, 24(8):971-983.
- Römisch J. 2002. Factor VII Activating Protease (FSAP): A Novel Protease in Hemostasis. *Journal of Biological Chemistry*, 383(7-8):1119-1124.
- Rosenberg ME, Girton R, Finkel D, Chmielewski D, Barrie A 3rd, Witte DP, Zhu D, Bissler JJ, Harmony JA, Aronow BJ. 2002. Apolipoprotein J/ clusterin prevents a progressive glomerulopathy of aging. *Molecular and Cellular Biology*, 22(6):1893-1902.

- Sack GH Jr. 2018. Serum amyloid A - a review. *Journal of Molecular Medicine*, 24(1):46.
- Sack GH Jr, Talbot CC, Seunanez H, O'Brien SJ. 1989. Molecular Analysis of the Human Serum Amyloid A (SAA) Gene Family. *Scandinavian Journal of Immunology*, 29(1):113-119.
- Sacks S, Zhou W, Campbell RD, Martin J. 1993 A. C3 and C4 expression and interferon-gamma-mediated regulation in human glomerular mesangial cells. *Clinical & Experimental Immunology*, 93(3):411-417.
- Sacks SH, Zhou W, Pani A, Campbell RD, Martin J. 1993 B. Complement C3 expression and regulation in human glomerular epithelial cells. *Immunology*, 79(3):348-354.
- Sampson NS, Ryan ST, Enke DA, Cosgrove D, Kotelianksy V, Gotwals P. 2001. Global Gene Expression Analysis Reveals a Role for the α 1 Integrin in Renal Pathogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 276(36):34182-34188.
- Savige J, Ariani F, Mari F, Bruttini M, Renieri A, Gross O, Deltas C, Flinter F, Ding J, Gale DP, Nagel M, Yau M, Shagam L, Torra R, Ars E, Hoefele J, Garosi G, Storey H. 2019. Expert consensus guidelines for the genetic diagnosis of Alport syndrome. *Pediatric Nephrology*, 34(7):1175-1189.
- Savige J, Colville D. 2009. Ocular features aid the diagnosis of Alport syndrome. *Nature Reviews Nephrology*, 5(6):356-360.
- Savige J, Storey H, Cheong HI, Kang HG, Park E, Hilbert P, Persikov A, Torres-Fernandez C, Ars E, Torra R, Hertz JM, Thomassen M, Shagam L, Wang D, Wang Y, Flinter F, Nagel M. 2016. X-Linked and Autosomal Recessive Alport Syndrome: Pathogenic Variant Features and Further Genotype-Phenotype Correlations. *PLoS ONE*, 11(9):e0161802.
- Schachter M. 1979. Kallikreins (kininogenases)-a group of serine proteases with bioregulatory actions. *Pharmacological Reviews*, 31(1):1-17.
- Schaeffner ES, Kurth T, Curhan GC, Glynn RJ, Rexrode KM, Baigent C, Buring JE, Gaziano JM. 2003. Cholesterol and the risk of renal dysfunction in apparently healthy men. *Journal of the American Society of Nephrology*, 14(8):2084-2091.

- Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. 1995. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 270(45):26746-26749.
- Schmelzer CH, Swaisgood HE, Horton HR. 1985. Glycylglycyl-L-cysteine as a substrate for renal sulfhydryl oxidase (glutathion oxidase). *Biochimica et Biophysica Acta*, 827(2):140-143.
- Schrödl W, Bücher R, Wendler S, Reinhold P, Muckova P, Reindl J, Rhode H. 2016. Acute phase proteins as promising biomarkers: Perspectives and limitations for human and veterinary medicine. *Proteomics Clinical Applications*, 10(11):1077-1092.
- Sedrakyan S, Da Sacco S, Milanese A, Shiri L, Petrosyan A, Varimezova R, Wartburton D, Lemley KV, De Filippo RE, Perin L. 2012. Injection of amniotic fluid stem cells delays progression of renal fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 23(4):661-673.
- Seelen MAJ, Brooimans RA, van der Woude FJ, van Es LA, Data MR. 1993. IFN-gamma mediates stimulation of complement C4 biosynthesis in human proximal tubular epithelial cells. *Kidney International*, 44(1):50-57.
- Sellar GC, DeBeer MC, Lelias JM, Snyder PW, Glickman LT, Felsburg PJ, Whitehead AS. 1991. Dog Serum Amyloid A Protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(6): 3505-3510.
- Sethna CB, Boone V, Kwok J, Jun D, Trachtman H. 2015. Adiponectin in children and young adults with focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatric Nephrology*, 30(11):1977-1985.
- Sharma K, Ramachandrarao S, Qiu G, Usui HK, Zhu Y, Dunn SR, Ouedraogo R, Hough K, McCue P, Chan L, Falkner B, Goldstein BJ. 2008. Adiponectin regulates albuminuria and podocyte function in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(5):1645-1656.
- Shaw EA, Colville D, Wang YY, Zhang KW, Dagher H, Falset R, Guymer R, Savige J. 2007. Characterization of the peripheral retinopathy in X-linked and autosomal recessive Alport syndrome. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 22(1):104-108.
- Sim RB, Schwäble W, Fujita T. 2016. Complement research in the 18th - 21st centuries: progress comes with new technology. *Immunobiology*, 221(10):1037-1045.

- Shoji T, Nishizawa Y, Nishitani H, Yamakawa M, Moria H. 1992. Impaired metabolism of high density lipoprotein in uremic patients. *Kidney International*, 41(6):1653-1661.
- Skill NJ, Johnson TS, Coutts IG, Saint RE, Fisher M, Huang L, El Nahas AM, Collighan RJ, Griffin M. 2004. Inhibition of transglutaminase activity reduces extracellular matrix accumulation induced by high glucose levels in proximal tubular epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(46):47754-47762.
- Smets PM, Meyer E, Maddens BE, Duchateau L, Daminet S. 2010. Urinary markers in healthy young and aged dogs and dogs with chronic kidney disease. *Journal of veterinary Internal Medicine*, 24(1):65-72.
- Song D, Zhou W, Sheerin SH, Sacks SH. 1998. Compartmental localization of complement component transcripts in the normal human kidney. *Nephron*, 78(1):15-22.
- Spinardi L, Witke W. 2007. Gelsolin and Diseases. In: Carafoli E, Brini M, Hrsg. *Calcium Signalling and Disease: Molecular Pathology of Calcium*. Vol. 45. Dordrecht: Springer Verlag. 55-69.
- Stenina OI, Topol EJ, Plow EF. 2007. Thrombospondins, Their Polymorphism, and Cardiovascular Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(9):1886-1894.
- Stock J, Kuenanz J, Glonke N, Sonntag J, Frese J, Tönshoff B, Höcker B, Hoppe B, Feldkötter M, Pape L, Lerch C, Wygoda S, Weber M, Müller GA, Gross O. 2017. Prospective study on the potential of RAAS blockade to halt renal disease in Alport Syndrome patients with heterozygous mutations. *Journal of Pediatric Nephrology*, 32(1):131-137.
- Storey H, Savige J, Sivakumar V, Abbs S, Flinter FA. 2013. COL4A3/COL4A4 Mutations and Features in Individuals with Autosomal Recessive Alport Syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology*, 24(12):1945-1954.
- Strimbu K, Tavel JA. 2010. What are Biomarkers? *Current Opinion in HIV and AIDS*, 5(6):463-466.
- Sweiss N, Sharma K. 2014. Adiponectin effects on the kidney. *Best Practice & Research: Clinical Endocrinology & Metabolism*, 28(1):71-79.

- Sumiya J, Asakawa S, Tobe T, Hashimoto K, Saguchi K, Choi-Miura NH, Shimizu Y, Minoshima S, Shimizu N, Tomita M. 1997. Isolation and Characterization of the Plasma Hyaluronan-Binding Protein (PHBP) Gene (HABP2). *The Journal of Biochemistry*, 122(5):983-990.
- Sun L, Ye RD. 2016. Serum amyloid A1: Structure, function and gene polymorphism. *Gene*, 583(1):48-57.
- Tacke F, Wustefeld T, Hom R, Luedde T, Srinivas Rao A, Manns MP, Trautheit C, Brabant G. 2005. High adiponectin in chronic liver disease and cholestasis suggests biliary route of adiponectin excretion in vivo. *Journal of Hepatology*, 42(5):666-673.
- Tan FL, Moravec CS, Li J, Apperson-Hansen C, McCarthy PM, Young JB, Bond M. 2002. The gene expression fingerprint of human heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(17):11387-11392.
- Tan M, Tang G, Rui H. 2015. Adiponectin attenuates Ang II-induced TGF β 1 production in human mesangial cells via an AMPK-dependent pathway. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 62(6):848-854.
- Tashima T, Nagatoishi S, Caaveiro JMM, Nakakido M, Sagara H, Kusano-Arai O, Iwanari H, Mimuro H, Hamakubo T, Ohnuma SI, Tsumoto K. 2018. Molecular basis for governing the morphology of type-I collagen fibrils by Osteomodulin. *Communications Biology*, 1:33.
- Tashima T, Nagatoishi S, Sagara H, Ohnuma S, Tsumoto K. 2015. Osteomodulin regulates diameter and alters shape of collagen fibrils. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 463(3):292-296.
- Temme J, Kramer A, Jager KJ, Lange K, Peters F, Müller GA, Kramar R, Heaf JG, Finne P, Palsson R, Reisæter AV, Hoitsma AJ, Metcalfe W, Postorino M, Zurriaga O, Santos JP, Ravani P, Jarraya F, Verrina E, Dekker FW, Gross O. 2012. Outcomes of male patients with Alport syndrome undergoing renal replacement therapy. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 7(12):1969-1976.
- Thorpe C, Hooper KL, Raje S, Glynn NM, Burnside J, Turi GK, Coppock DL. 2002. Sulfhydryl oxidases: emerging catalysts of protein disulfide bond formation in eukaryotes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 405(1):1-12.

- Tian X, Kim JJ, Monkley SM, Gotoh N, Nandez R, Soda K, Inoue K, Balkin DM, Hassan H, Son SH, Lee Y, Moeckel G, Calderwood DA, Holzman LB, Critchley DR, Zent R, Reiser J, Ishibe S. 2014. Podocyte-associated talin 1 is critical for glomerular filtration barrier maintenance. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(3):1098-1113.
- Tolosano E, Fagoonee S, Morello N, Vinchi F, Fiorito V. 2010. Heme scavenging and the other facets of hemopexin. *Antioxidants and Redox Signaling*, 12(2):305-320.
- Trougakos IP, Gonos ES. 2002. Clusterin/ apolipoprotein J in human aging and cancer. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34(11):1430-1448.
- Tu BP, Weissman JS. 2004. Oxidative protein folding in eukaryotes: Mechanisms and consequences. *Journal of Cell Biology*, 164(3):341-346.
- Tu H, Sasaki T, Snellman A, Göhring W, Pirilä P, Timpl R, Pihlajaniemi T. 2002. The type XIII collagen ectodomain is a 150-nm rod and capable of binding fibronectin, nidogen-2, perlecan, and heparin. *Journal of Biological Chemistry*, 277(25):23092-23099.
- Uhlar CM, Whitehead AS. 1999. Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *European Journal of Biochemistry*, 265(2):501-523.
- van den Dobbelen ME, Verhasselt V, Kaashoek JG, Timmerman JJ, Schroeijers WE, Verweij CL, van der Woude FJ, van Es LA, Daha MR. 1994. Regulation of C3 and factor H synthesis of human glomerular mesangial cells by IL-1 and interferon-gamma. *Clinical & Experimental Immunology*, 95(1):173-180.
- Vaziri ND. 2006. Dyslipidemia of chronic renal failure: the nature, mechanisms, and potential consequences. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 290(2):F262-F272.
- Vaziri ND, Liang K, Park JS. 2001 A. Acquired lecithin-cholesterol acyltransferase deficiency in nephrotic syndrome. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 280(5):F823-F828.
- Vaziri ND, Liang K, Parks JS. 2001 B. Down-regulation of hepatic lecithin: cholesterol acyltransferase gene expression in chronic renal failure. *Kidney International*, 59(6): 2192-2196.

- Verdecchia P, Angeli F, Mazzotta G, Gentile G, Reboldi G. 2008. The renin angiotensin system in the development of cardiovascular disease: role of aliskiren in risk reduction. *Vascular Health and Risk Management*, 4(5):971-981.
- Vilahur G, Badimon L. 2015. Biological actions of pentraxins. *Vascular Pharmacology*, 73:38-44.
- Vlahou A, Fountoulakis M. 2005. Proteomic approaches in the search for disease biomarkers. *Journal of Chromatography B*, 814(1):11-19.
- Wang D, Mohammad M, Wang Y, Tan R, Murray LS, Ricardo S, Dagher H, van Agtmael T, Savige J. 2017. The Chemical Chaperone, PBA, Reduces ER Stress and Autophagy and Increases Collagen IV $\alpha 5$ Expression in Cultured Fibroblasts From men With X-Linked Alport Syndrome and Missense Mutations. *Kidney International Reports*, 2(4):739-748.
- Wang ZV, Scherer PE. 2016. Adiponectin, the past two decades. *Journal of Molecular Cell Biology*, 8(2):93-100.
- Wei C, El Hindi S, Li J, Fornoni A, Goes N, Sageshima J, Maignel D, Karumanchi SA, Yap HK, Saleem M, Zhang Q, Nikolic B, Chaudhuri A, Daftarian P, Salido E, Torres A, Salifu M, Sarwal MM, Schaefer F, Morath C, Schwenger V, Zeier M, Gupta V, Roth D, Rastaldi MP, Burke G, Ruiz P, Reiser J. 2011. Circulating urokinase receptor as a cause of focal segmental glomerulosclerosis. *Nature Medicine*, 17(8):952-960.
- Wen L, Zhao Z, Wang Z, Xiao J, Birn H, Gregersen JW. 2018. High levels of urinary complement proteins are associated with chronic renal damage and proximal tubule dysfunction in IgA nephropathy. *Nephrology (Carlton)*. doi: 10.1111/nep.13477.
- Wendel M, Sommarin Y, Heinegård D. 1998. Bone matrix proteins: isolation and characterization of a novel cell-binding keratin sulfate proteoglycan (osteoadherin) from bovine bone. *Journal of Cell Biology*, 141(3):839-847.
- Wendler S, Tautkus B, Nemitz S, Pesek J, Krüger T, Opitz S, Bartz M, Richter S, Oehme H, Haenel T, Moore T, Kreuzsch S, Hanf B, Schmidt L, Rhode H. 2013. Automated Native Sample Preparation For Proteome Analysis. In: Arent D, Freebush M, Hrsg. *Automation Systems of the 21st Century: New Technologies, Applications and Impacts*

on the Environment & Industrial Processes. NY: Nova Science Publishers, Kapitel 1:1-50.

- Wickman L, Hodgins JB, Wang SQ, Afshinnia F, Kershaw D, Wiggins RC. 2016. Podocyte Depletion in Thin GBM and Alport Syndrome. *PLoS ONE*, 11(5):e0155255.
- Wittmann J, Dieckow J, Schröder H, Hampel U, Garreis F, Jacobi C, Milczarek A, Hsieh KL, Pulli B, Chen JW, Hoogeboom S, Breuer L, Paulsen FP, Schob S, Schicht M. 2018. Plasma gelsolin promotes re-epithelialization. *Scientific Reports*, 8(1):13140.
- Wolf G. 1998. Link between angiotensin II and TGF-beta in the kidney. *Mineral and Electrolyte Metabolism*, 24(2-3):174-180.
- Wolf G, Butzmann U, Wenzel UO. 2003. The renin-angiotensin system and progression of renal disease: from hemodynamics to cell biology. *Nephron Physiology*, 93(1):3-13.
- Wolf G, Mueller E, Stark RA, Ziyadeh FN. 1993. Angiotensin II-induced hypertrophy of cultured murine proximal tubular cells is mediated by endogenous transforming growth factor-beta. *The Journal of Clinical Investigation*, 92(3):1366-1372.
- World Health Organization & International Programme on Chemical Safety. 2001. Biomarkers in risk assessment: validity and validation. Geneva: World Health Organization.
- Wu CI, Yang HY, Chien HP, Tseng MH, Huang JL. 2018. Urinary clusterin - a novel urinary biomarker associated with pediatric lupus renal histopathological features and renal survival. *Pediatric Nephrology*, 33(7):1189-1198.
- Xavier S, Sahu RK, Landes SG, Yu J, Taylor RP, Ayyadevara S, Megyesi J, Stallcup WB, Duffield JS, Reis ES, Lambris JD, Portilla D. 2017. Pericytes and immune cells contribute to complement activation in tubulointerstitial fibrosis. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 312(3):F516-F532.
- Yamada K, Hori Y, Hanafusa N, Okuda T, Nagano N, Choi-Miura NH, Couser WG, Miyata T, Kurokawa K, Fujita T, Nangaku M. 2001. Clusterin is up-regulated in glomerular mesangial cells in complement-mediated injury. *Kidney International*, 59(1):137-146.

- Yamaguchi K, Shirakabe K, Shibuya H, Irie K, Oishi I, Ueno N, Taniguchi T, Nishida E, Matsumoto K. 1995. Identification of a Member of the MAPKKK Family as a Potential mediator of TGF- β Signal Transduction. *Science*, 270(5244):2008-2011.
- Yamamura T, Nozu K, Fu XJ, Nozu Y, Ye MJ, Shono A, Yamanouchi S, Minamikawa S, Morisada N, Nakanishi K, Shima Y, Yoshikawa N, Ninchoji T, Morioka I, Kaito H, Iijima K. 2017. Natural History and Genotype–Phenotype Correlation in Female X-Linked Alport Syndrome. *Kidney International Reports*, 2(5):850-855.
- Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T. 2003. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*, 423(6941):762-769.
- Yilmaz MI, Sonmez A, Caglar K, Celik T, Yenicesu M, Eyiletten T, Acikel C, Oguz Y, Yavuz I, Vural A. 2007. Effect of antihypertensive agents on plasma adiponectin levels in hypertensive patients with metabolic syndrome. *Nephrology (Carlton)*, 12(2):147-153.
- Zager RA, Johnson AC, Becker K. 2012. Renal cortical hemopexin accumulation in response to acute kidney injury. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 303(10):F1460-1472.
- Zhang Y, Ding J. 2018. Renal, auricular and ocular outcomes of Alport syndrome and their current management. *Pediatric Nephrology*, 33(8):1309-1316.
- Zhang L, Han C, Ye F, He Y, Jin Y, Wang T, Wu Y, Jiang Y, Zhang F, Jin X. 2017. Plasma Gelsolin Induced Glomerular Fibrosis via the TGF- β 1/Smads Signal Transduction Pathway in IgA Nephropathy. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2):390.
- Zhang X, Jiang G, Cai Y, Monkey SJ, Critchley DR, Sheetz MP. 2008. Talin depletion reveals independence of initial cell spreading from intern activation and traction. *Nature Cell Biology*, 10(9):1062-1068.
- Zhang L, Kong D, Meng H, Han C, Zhu J, Qiao J, He Y, Wang T, Li X, Zhang F, Jin X. 2016. Plasma Gelsolin Promotes Proliferation of Mesangial Cell in IgA Nephropathy. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 40(6):1473-1486.

Zhou W, Campbell RD, Martin J, Sacks SH. 1993. Interferon- γ regulation of C4 gene expression in cultured human glomerular epithelial cells. *European Journal of Immunology*, 23(10):2477-2481.

Zhou W, Marsh JE, Sacks SH. 2001. Intrarenal synthesis of complement. *Kidney International*, 59(4):1227-1235.

Zoccali C, Mallamaci F, Panuccio V, Tripper G, Cutrupi S, Parlongo S, Catalano F, Tanaka S, Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y. 2003. Adiponectin is markedly increased in patients with nephrotic syndrome and is related to metabolic risk factors. *Kidney International*, 63(Suppl. 84):98-102.

9 Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Podozytenfußfortsätze

aus Patrakka J, Tryggvason K. 2010. Molecular make-up of the glomerular filtration barrier. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396(1):164-169.

Abb. 2 Detailansicht Filtrationsschlitz

aus Patrakka J, Tryggvason K. 2010. Molecular make-up of the glomerular filtration barrier. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396(1):164-169.

Abb. 3 Histologie Wildtyp-Kontrolle und AS

aus Kruegel J, Rubel D, Gross O. 2013. Alport syndrome - insights from basic and clinical research. *Nature Reviews Nephrology*, 9(3):170-178.

Abb. 4 Zusammenfassung zwischen Krankheitsstadium, Therapieschema und Dialysepflichtigkeit

aus Gross O, Licht C, Anders HJ, Hoppe B, Beck B, Tönshoff B, Höcker B, Wygoda S, Ehrich JH, Pape L, Konrad M, Rascher W, Deutsch J, Müller-Wiefel DE, Hoyer P, Study Group Members of the Gesellschaft für Pädiatrische Nephrologie, Knebelmann B, Person Y, Grunfeld JP, Niaudet P, Cochat P, Heidet L, Lebahn S, Torra R, Friede T, Lange K, Müller GA, Weber M. 2012. Early angiotensin-converting enzyme inhibition in Alport syndrome delays renal failure and improves life expectancy. *Kidney International*, 81(5) 494-501.

Abb. 5 Geschwistervergleich

aus Gross O, Licht C, Anders HJ, Hoppe B, Beck B, Tönshoff B, Höcker B, Wygoda S, Ehrich JH, Pape L, Konrad M, Rascher W, Deutsch J, Müller-Wiefel DE, Hoyer P, Study Group Members of the Gesellschaft für Pädiatrische Nephrologie, Knebelmann B, Person Y, Grunfeld JP, Niaudet P, Cochat P, Heidet L, Lebahn S, Torra R, Friede T, Lange K, Müller GA, Weber M. 2012. Early angiotensin-converting enzyme inhibition in Alport syndrome delays renal failure and improves life expectancy. *Kidney International*, 81(5) 494-501.

Abb. 6 Übersicht über aktuell genutzte klinische Diagnosemerkmale in Anlehnung an Flinter et al. 1988.

Abb. 7 Prozess der Biomarkeretablierung
in Anlehnung an Pavlou et al. 2013.

Abb. 8 Studienablauf

Abb. 9 Auszug aus 2D-Verteilung für Serum-Amyloid A

Abb. 10 Auszug aus der 2D-Verteilung für Gelsolin

Abb. 11 Auszug aus der 2D-Verteilung für Adiponektin

Abb. 12 Auszug aus der 2D-Verteilung für Haptoglobin

Abb. 13 allgemeines Reaktionsschema der Sulfhydryloxidasen
aus Faccio G, Nivala O, Kruus K, Buchert J, Saloheimo M. 2011. Sulfhydryl oxidases:
sources, properties, production and applications. *Applied Microbiology and
Biotechnology*, 91(4):957-966.

Abb. 14 Esterifizierung freien Cholesterols
aus Jonas A. 2000. Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochimica et Biophysica
Acta*, 1529(1-3):245-256.

Abb. 15 Auszug aus Sequenzanalyse Serum-Amyloid A

Abb. 16 Auszug aus Sequenzvergleich Serum-Amyloid A Isoformen

Abb. 17 Übersicht über biologische Funktionen der verschiedenen Gelsolin-Isoformen
aus Li GH, Arora PD, Chen Y, McCulloch CA, Liu P. 2012. Multifunctional roles of
gelsolin in health and diseases. *Medical Research Reviews*, 32(5):999-1025.

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Übersicht über Symptome und deren Häufigkeit im Rahmen des AS

Tab. 2 Übersicht veränderter Proteinkonzentrationen

Tab. 3 Übersicht potentieller Biomarkerkandidaten

Tab. 4 Vergleich der Biomarkerkandidaten aus dem Maus- und Hundemodell

Tab. 5 Übersicht der veränderten uncharakterisierten Proteine

Tab. 5: Übersicht der veränderten uncharakterisierten Proteine

und deren Auswertung in SIEVE™ 2.0

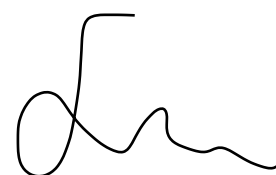
Bedeutung Pfeile: siehe Tab. 2

Protein-ID	Tendenz	Protein-ID	Tendenz	Protein-ID	Tendenz	Protein-ID	Tendenz
J9PAW5	↓	J9P0D4	↓	F1PKL6	↓	J9PAD1	↓
J9PBN6	↓	F1PQU0	↓	J9P6X8	↓	F6V8B5	↓
E2RS80	↓	J9PAX5	↓	F1PF90	↓	J9P1F6	↓
J9P7F7	↓	J9JHF7	↓	F1PDJ7	↓	L7N0E5	↓
L7N0L4	↘	J9NYC7	↘	J9P1M7	↘	J9P7L5	↘
J9P8U3	↘	J9JHK5	↘	F1PDX5	↘	E2RA71	↘
E2RGB0	↘	F1PSJ5	↘	L7N0K2	↔↓	L7N098	↔↓
F1PL50	↔↓	L7N0E7	↔↓	F1Q184	↔↓	F1PWR2	↔↓
J9NTL7	↔↓	F1PYR5	↔↓	J9P6C1	↗	J9NZL0	↗
J9NXL3	↗	J9NUZ7	↗	J9JHN3	↗	F6Y120	↗
J9P488	↗	J9P9Y4	↗	F1Q185	↗	F1PPF3	↗
J9P653	↗						

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: Prof. Dr. Heidrun Rhode, Bärbel Tautkus,
G. Ditze,
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.

Jena, 26.07.2020



Alexandra Lüse

Danksagung

Mein herzlicher Dank geht an Frau Prof. Rhode für ihren Einsatz, den umfangreichen zeitlichen Aufwand und die schnellen Rückmeldungen. Durch die Anregung zur intensiven Auseinandersetzung mit dem Thema ist diese Arbeit erst möglich geworden.

Des Weiteren möchte ich Frau B. Tautkus für die Unterstützung bei methodischen Fragen danken. Mit ihrer Sorgfalt und Geduld war es möglich, zügig in der Probenaufbereitung und der experimentellen Durchführung voranzuschreiten.

Ein weiterer Dank geht an Herrn G. Ditze für die Bereitstellung der In-House-Makros und die Bereitschaft, bei Problemen und Fragen diesbezüglich schnellstmöglich zu helfen.