

Aus der Abteilung Nephrologie und Rheumatologie  
(Prof. Dr. med. G. A. Müller)  
im Zentrum Innere Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Bestimmung von Prognosemarkern unter nephroprotektiver Therapie mit ACE-Hemmern  
bei chronischer Nierenfibrose am Beispiel des Alport-Syndroms**

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

vorgelegt von  
Lydia Wiemer  
aus Gotha  
Göttingen 2013

**Dekan :**

**I. Berichterstatter:**

**II. Berichterstatter/in:**

**Tag der mündlichen Prüfung:**

Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

Prof. Dr. med. O. Gross

Prof. Dr. phil. nat. B.-C. Burckhardt

25. November 2013

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Einordnung in den wissenschaftlichen und geschichtlichen Kontext	1
1.2 Aufbau und Funktion der Niere und Systematik der Nierenfibrose	3
1.3 Das Alport-Syndrom	5
1.3.1 Klinik	5
1.3.2 Diagnostik	7
1.3.3 Genetischer Hintergrund	8
1.3.4 Pathogenese	9
1.3.5 Therapiemöglichkeiten des Alport-Syndroms	11
1.3.5.1 Wirkmechanismus von ACE-Hemmern	13
1.4 Mausmodell für das autosomal rezessive Alport-Syndrom	14
1.5 Biomarker - Identifizierung durch Proteomik	15
1.6 Zielsetzung	18
2. Materialien und Methoden	19
2.1. Chemikalien und Geräte	19
2.1.1 Chemikalien	19
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	20
2.1.3 Geräte	21
2.1.4 Software	22
2.1.5 Antikörper	22
2.2 Methoden	22
2.2.1 Probengewinnung	22
2.2.2 Fällung der Proteine	23
2.2.3 Proteinbestimmung	23
2.2.4 2D-Gelelektrophorese	24
2.2.5 2D-Differential-Gelelektrophorese (2D DIGE)	25
2.2.6 Digitalisierung der Gele	26
2.2.7 Statistische Auswertung der Gele	26
2.2.8 Trypsinverdau der Gelspots	27
2.2.9 Massenspektrometrie	27
2.2.10 Peptidsequenzanalyse mit ESI-Q-TOF MS	28
2.2.11 1D-Western Blot	29
2.2.12 2D- Westernblot	30
2.3 Methodenkritik	32
3. Ergebnisse	33
3.1 Histologische Darstellung des Nierengewebes	33
3.1.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	33
3.1.2 Periodic acid-Schiff-Färbung	35
3.2 Aufbau und Strukturierung der Versuchsreihe	36
3.3 Proteomische Charakterisierung des Urins der Alport-Syndrom - Mäuse mit resultierender Identifizierung von Proteinen als potentielle Prognosemarker	37
3.3.1 Etablierung zweidimensionaler Proteinprofile von Alport-Mausurin mittels 2D - Gelelektrophorese	37
3.3.1.1 Identifizierung der Proteine aus Mäuse-Urinproteom im 6-Wochen-Placebostadium	38

3.3.1.2 Identifizierung der Proteine aus Mäuse-Urinproteom im 6-Wochen-ACE-Hemmerstadium	40
3.3.1.3 Identifizierung der Proteine aus Mäuse-Urinproteom im 7,5-Wochen-Placebostadium	42
3.3.1.4 Identifizierung der Proteine aus Mäuse-Urinproteom im 7,5 Wochen-ACE-Hemmerstadium	44
3.3.2 Auswertung der 2D-Gel-Elektrophorese	46
3.3.2.1 Vergleich der Proteomprofile im 6-Wochen-Placebostadium mit 6-Wochen-ACE-Hemmerstadium	46
3.3.2.2 Vergleich der Proteomprofile im 7,5-Wochen-Placebostadium mit 7,5-Wochen-ACE-Hemmerstadium	47
3.3.2.3 Vergleich der Proteomprofile im 6-Wochen-Placebostadium mit 7,5-Wochen-Placebostadium	48
3.3.2.4 Vergleich der Proteomprofile im 6-Wochen-ACE-Hemmerstadium mit 7,5-Wochen-ACE-Hemmerstadium	49
3.4 Proteomprofile der DIGE der Urinproben	50
3.4.1 Vergleich der Proteomprofile im 6-Wochen-Placebostadium mit 6-Wochen-ACE-Hemmerstadium	50
3.4.2 Vergleich der Proteomprofile im 7,5-Wochen-Placebostadium mit 7,5-Wochen-ACE-Hemmerstadium	51
3.5 Statistische Auswertung der 2D-Gele	52
3.5.1 Vergleich Placebo und ACE-Hemmer im 6- und 7,5-Wochen-Stadium	53
3.5.2 Vergleich Placebo im 6-Wochen- und 7,5-Wochen-Stadium	55
3.5.3 Vergleich ACE-Hemmer im 6-Wochen- und 7,5-Wochen-Stadium	56
3.6 Verifizierung der Ergebnisse der 2D SDS-PAGE mittels 1D-Westernblot	58
3.6.1 Immunologische Validierung von Antithrombin III als Prognosemarker	59
3.6.2 Immunologische Validierung von Haptoglobin III als Prognosemarker	60
3.6.3 Immunologische Validierung von Parvalbumin III als Prognosemarker	61
3.6.4 Immunologische Validierung von Plasminogen als Prognosemarker	62
3.6.5 Immunologische Validierung von Serpin A3K als Prognosemarker	62
3.7 Statistische Auswertung	64
3.8 2D-Westernblot von Albumin im 4,5-Wochen- und 6-Wochen-Stadium	65
4. Diskussion	67
4.1 Identifizierung von Biomarkern durch die Ergebnisinterpretation	67
4.1.1 Identifizierung von Biomarkerkandidaten zum Krankheitsverlauf	67
4.1.2 Identifizierung von Biomarkerkandidaten für den Therapieerfolg	67
4.1.3 Identifizierung von Biomarkerkandidaten zum Therapieverlauf	69
4.1.4 Auswahl potentieller Markerkandidaten	69
4.1.5 Albumin als weiterer Markerkandidat	69
4.2 Bedeutung und Funktion der möglichen Markerkandidaten	70
4.2.1 Funktion und Bedeutung von Albumin	71
4.2.2 Funktion und Bedeutung von Antithrombin III	71
4.2.3 Funktion und Bedeutung von Haptoglobin	71
4.3 Wirkmodell des ACE-Hemmers beim Alport-Syndrom	72
5. Fazit	75
6. Zusammenfassung	76
7. Publikation zum Thema der Dissertation	78

8. Abkürzungsverzeichnis	79
9. Abbildungsverzeichnis	80
10. Tabellenverzeichnis	82
11. Literaturverzeichnis	83
12. Anhang: Tabellen	90

## 1. Einleitung

### 1.1 Einordnung in den wissenschaftlichen und geschichtlichen Kontext

Die Erforschung erblicher Nierenerkrankungen ist einer der Forschungsschwerpunkte der Abteilung Nephrologie und Rheumatologie der Georg-August-Universität Göttingen. Ein Beispiel für die Interaktion zwischen klinischer und zell- bzw. molekularbiologischer Forschung ist die Erforschung des Alport-Syndroms. Zur Zeit stehen die Erforschung von zukünftigen Therapieprinzipien zur Organprotektion bei fibrosierenden Nierenerkrankungen am Alport-Tiermodell und die Wirksamkeitsprüfung der ACE-Hemmer-Therapie anhand des Europäischen Patientenregisters im Vordergrund. Ziel ist die zeitnahe Zulassung und Anwendung der ACE-Hemmer Therapie zum Nutzen nierenkranker Kinder mit Alport-Syndrom. Um ein Medikament im Rahmen einer Therapie für eine Erkrankung zulassen zu können, bedarf es vieler einzelner Schritte. Vor der klinischen Erprobung eines Medikamentes werden in Tierversuchen vorklinische Studien durchgeführt, die dazu dienen, Wirkungen, Nebenwirkungen und Toxizität des Medikamentes zu untersuchen. Lassen die Ergebnisse der vorklinischen Phase einen Nutzen des neuen Medikamentes, der die Risiken übersteigt, erwarten, kann eine Übertragung auf den Menschen ermöglicht werden. Dazu ist die Zustimmung einer Ethikkommission notwendig. Die Erprobung des Medikamentes am Menschen ist in fünf klinische Phasen unterteilt, die auf den *Code of Federal Regulations* der US-amerikanischen Gesundheitsbehörde FDA (*US Food and Drug Administration*) zurückgehen.

Diese fünf Phasen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Phase	Dauer	Ziel
0	Wochen	Pharmakokinetik, Pharmakodynamik, Dosierung im subtherapeutischen Bereich Testung auf Verträglichkeit
I	Wochen bis Monate	Pharmakokinetik, Pharmakodynamik, Dosierung im therapeutischen Bereich Testung auf Verträglichkeit
II	Monate	Bestimmung geeigneter Therapiedosis (Wirkung/Nebenwirkung)
III	Monate bis Jahre	signifikanter Wirkungsnachweis gegenüber Placebo Zulassung des Medikamentes
IV	Jahre	Feststellung sehr seltener Nebenwirkungen nach Zulassung des Medikamentes

Tabelle 1 Phasen einer klinischen Studie

In der vorliegenden Arbeit kann auf zahlreiche wissenschaftliche Erkenntnisse als Vorleistungen bei der Erforschung des Alport-Syndroms (AS) zurückgegriffen werden, deren geschichtlicher Abriss nachfolgend kurz als Übersicht dargestellt ist.

1927-1980er Beschreibung der Erbkrankheit und ihrer Symptome u.a.:

- 1927 Erstbeschreibung der hereditären Nephritis (Alport 1927)
- 1961 Krankheitsbild als Alport-Syndrom gekennzeichnet (Williamson 1961)
- 1966 Beschreibung charakteristischer Augenveränderungen (Arnott et al. 1966)
- 1981 Beschreibung eines progressiven Hörverlustes (Gubler et al. 1981)

1980er-1990er Aufklärung der genetischen Ursachen des Alport-Syndroms u.a.:

- 1988 Entdeckung der Lokalisation der Gene des AS (Flinter et al. 1988)
- 1990 Identifikation der Mutation COL4A5 (Barker et al. 1990)
- 1995 Proteom-Forschung wird begründet (Wasinger et al. 1995)

1990er-2000er Tiermodell-Entwicklung als Voraussetzung für vorklinische Studien u.a.:

- 1996 Mausmodell für das autosomal rezessive AS (Cosgrove et al. 1996)
- 1998 Hundemodell für das autosomal rezessive AS (Lees et al. 1998)
- 2006 Hundemodell für X-chromosomale AS (Greer et al. 2006)

2000er-2010er Erforschung von Pathogenese und pharmakologischen

Interventionsmöglichkeiten u.a.:

- 1998 REIN-Studie: ACE-Hemmer Ramipril verzögert Progredienz der Nierenerkrankungen (Ruggenenti et al. 1998)
- 1999 Identifikation der Genmutation durch Immunhistochemie (Kashtan 1999a)
- 2001 Gründung der Deutschen Gesellschaft für Proteomforschung in Martinsried
- 2003 protektive Ramipril Therapie im Mausmodell (Gross et al. 2003)
- 2003 Cyclosporin A verbessert vorübergehend die Proteinurie (Chen et al. 2003)
- 2003 Erforschung der Genotyp-Phänotyp Korrelation (Jais et al. 2003)
- 2004 AT1 Rezeptorantagonisten wirken nephroprotektiv und antifibrotisch (Gross et al. 2004a)
- 2006 Beginn einer Europäischen Registerdatenbank von Familien mit AS
- 2006 Erforschung der Stammzelltransplantation am Mausmodell (Sugimoto et al. 2006)
- 2006 Erforschung der Nierentransplantation am Mausmodell (Kashtan 2006)
- 2007 HMG-CoA-Reductase-Inhibitor wirken nephroprotektiv und antifibrotisch (Koepke et al. 2007)

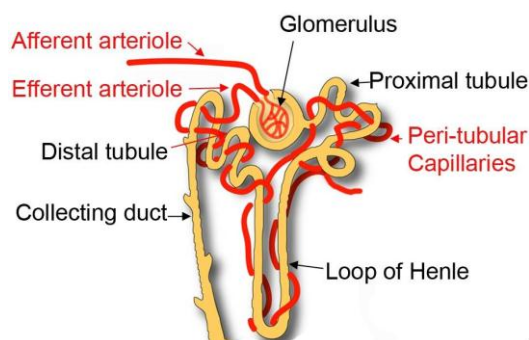
seit 2010 Erprobung von Medikamenten zur Behandlung des Alport-Syndroms u.a.:

- 2012 ACE-Hemmer-Therapie im frühen Krankheitsstadium verlangsamt Progredienz der Nierenschädigung signifikant und verbessert die Lebenserwartung der Patienten (Gross et al. 2012b)
- 2012 Beginn der EARLY PRO-TECT Alport Zulassungsstudie Phase III Ramipril für Kinder mit AS (Gross et al. 2012a)

Am Modell des Alport-Syndroms wurde unter nephroprotektiver Therapie der ACE-Hemmer mit dem Handelsnamen *Ramipril* ausgewählt, da es sich um ein für Bluthochdruck-Patienten zugelassenes Arzneimittel handelt, das auch bei anderen Nierenerkrankungen seit vielen Jahren erfolgreich angewendet wird. Für die Behandlung des Alport-Syndroms ist *Ramipril* bislang nicht zugelassen, jedoch ist die Erprobung im Tierversuch abgeschlossen und zum Teil werden bereits Erwachsene „off-label“ behandelt. Eine nephroprotektive Therapie beim Alport-Syndrom erfordert den Zugang zur Therapie schon im Kindesalter. Die geeignete Therapiedosis bei Kindern und der Wirkungsnachweis schon bei frühestmöglicher Anwendung sollen in einer neuen, weltweit ersten Studie mit dem Titel „EARLY PRO-TECT Alport - optimaler früher Therapiebeginn zur Verzögerung der Niereninsuffizienz und Medikamentensicherheit bei Kindern mit der erblichen Nierenerkrankung Alport-Syndrom: ACE-Hemmer *Ramipril* versus Placebo“ gezeigt werden. Diese Studie ist eine Phase-III-Studie, die prospektiv, randomisiert und Placebo-kontrolliert ist. Das primäre Ziel ist es, Nutzen und Risiko eines frühen Therapiebeginns bei noch oligosymptomatischen Kindern gegen die Medikamentensicherheit abzuwägen. Die Studie soll aufklären, wie gut und sicher *Ramipril* bei Kindern und Jugendlichen die Nierenkrankheit verlangsamt. Grundlage der Studienplanung sind retrospektive Registerdaten, in denen gezeigt werden kann, dass ACE-Hemmer die Progredienz der Nierenschädigung signifikant verzögern und die Lebenserwartung der Patienten verbessern (Gross et al. 2012a).

## 1.2 Aufbau und Funktion der Niere und Systematik der Nierenfibrose

Die Niere mit ihren verschiedenen Funktionen ist ein wichtiges Organ im Körper. Zu ihren Funktionen zählen die Entgiftung und Reinigung, die Regulation des Elektrolyt-, Mineral-, Säure-Base-Haushalts und des Stickstoffstoffwechsels sowie eine endokrine Funktion, indem sie Hormone wie Angiotensin, Erythropoietin und 1,25-Dihydroxycholecalciferol produziert. Eine Kapsel aus Bindegewebe umschließt die Niere. Im Inneren gliedert sich die Niere in Mark und Rinde. Die Markpyramiden gehen an der Papille in das Kelchsystem über, welches in den Harnleiter mündet. Über den Harnleiter wird der Urin in die Blase geleitet und dort bis zur Miktion gespeichert. Das Nephron ist die kleinste Funktionseinheit der Niere und besteht aus einem Glomerulus und dem dazugehörigen Tubulussystem aus auf- und absteigenden Tubuli, Henleschleife und dem Sammelrohr.

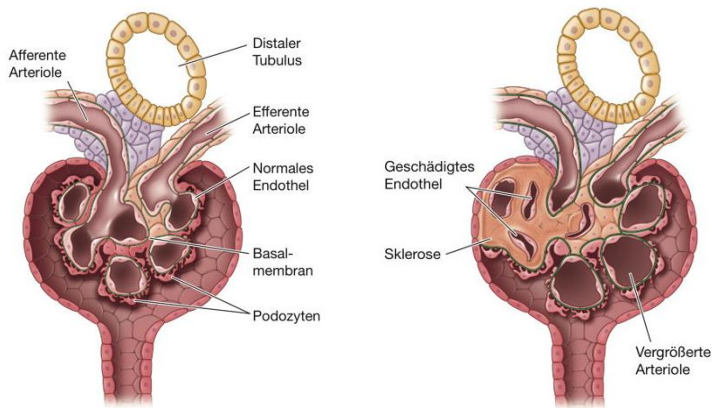


**Abbildung 1 Aufbau eines Nephrons**  
aus Melican et al. (2011 S.e1001298)

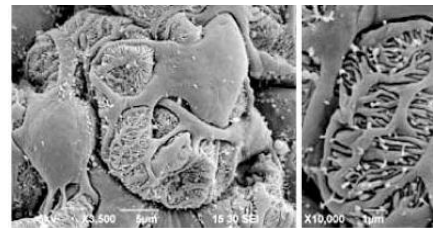
In den Nierenkörperchen erfolgt die Ultrafiltration des Blutes. Proteine und Blutzellen werden hier zurückgehalten, Wasser und gelöste Stoffe können somit frei filtriert werden. Die Filtrationschranke der Niere wird gebildet vom Endothel der Glomeruluskapillare, der



glomerulären Basalmembran, den Podozyten als viszerales Blatt der Bowmankapsel und den Mesangiumszellen. Die Podozyten umgreifen mit ihren primären Fortsätzen die Glomeruluskapillare. An den primären Fortsätzen sind kleine sekundäre Fortsätze, mit denen sich die Podozyten untereinander zu einem Netzwerk zusammenschließen. Dieses Netzwerk bildet die Filtrationsschlitze. Die Filtrationsschlitze mit einer Breite von 20 bis 30 nm werden von einem Diaphragma überdeckt.



**Abbildung 2 Aufbau Filtrationsschranke (li) und sklerotisiertes Gomerulum (re) nach Ingelfinger (2003 S.99)**



**Abbildung 3 Podozyt mit Fortsätzen aus Wagner (2008 S.35584) (Wagner et al. 2008)**

Die 200 nm dicke glomeruläre Basallamina besteht aus Lamina rara externa, Lamina densa und Lamina rara interna. Sie wird aus den Bestandteilen Kollagen Typ IV, Laminin, Heparansulfat und Fibronectin gebildet. Die Basallamina übernimmt die Funktion der Filtration. Der Raum zwischen den Kapillaren wird vom Mesangium eingenommen. Das Mesangium enthält Mikrofibrillen, Kollagen Typ IV, V, VI, Proteoglykane, Fibronectin und besitzt kontraktile als auch phagozytäre Eigenschaften. Des Weiteren sezernieren sie Hormone, wie z. B. Prostaglandin, wodurch die Podozyten den Blutfluss durch das Glomerulus beeinflussen können. Bei Glomerulonephritiden können die Mesangiumszellen stark proliferieren (Welsch 2006).

Kommt es durch eine Erkrankung zum Funktionsverlust der Niere, wird dies mit einer gesteigerten Akkumulation extrazellulärer Matrixproteine im Nierengewebe assoziiert. Die Ablagerung von extrazellulärer Matrix im Nierengewebe wird als Fibrose bezeichnet. Die Fibrose, eine Vernarbung des Gewebes, ist die gemeinsame Endstrecke fast aller chronischen Nierenerkrankungen. Das Alport-Syndrom, als erbliche Typ-IV-Kollagen-Erkrankung, kann als Modell für chronische Nierenerkrankung dienen (Gross und Weber 2005).

Wie sich das Alport-Syndrom in die chronischen Nierenerkrankungen einordnen lässt, zeigt die Abbildung 4. Das Alport-Syndrom als familiäre Glomerulonephritis ist neben chronisch tubulo-interstitiellen Erkrankungen, polyzystischen Nierenerkrankungen, vaskulärer und diabetischer Nephropathie eine mögliche Ursache für eine chronische Niereninsuffizienz.

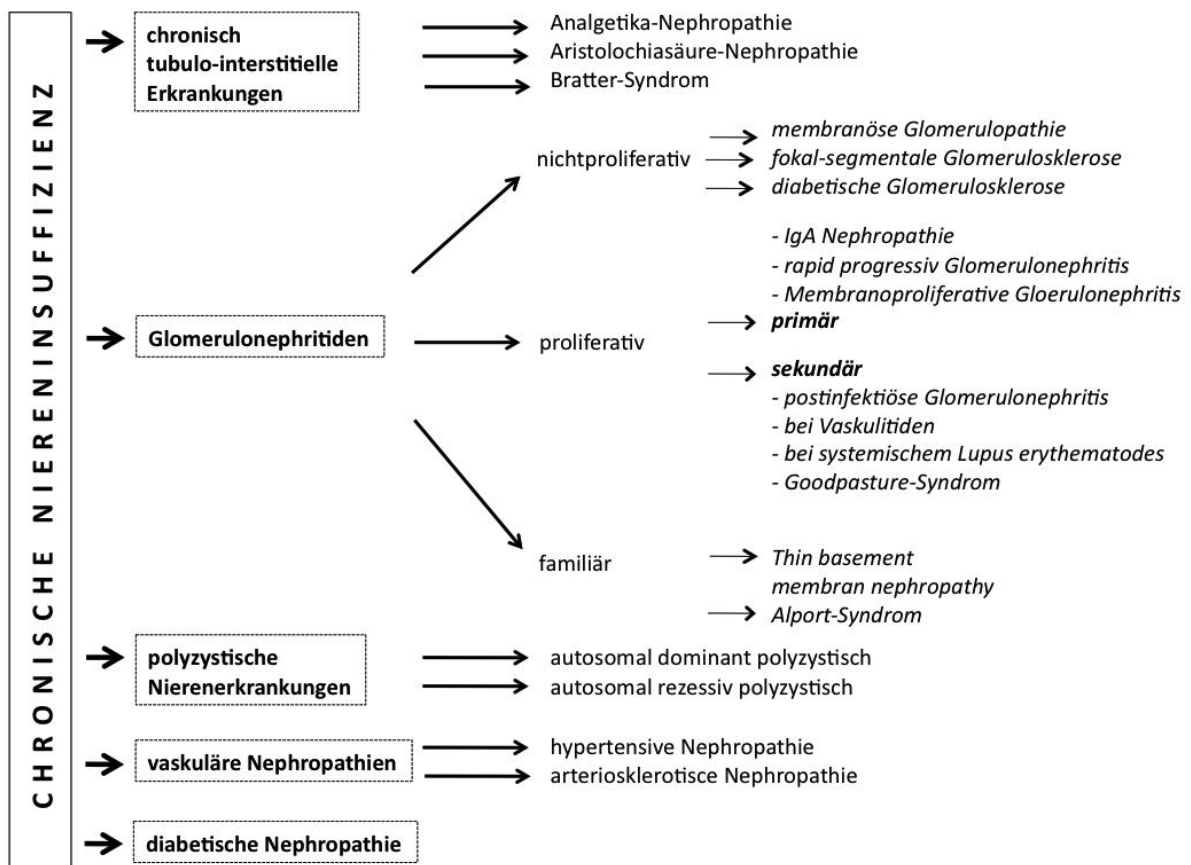


Abbildung 4 Systematik der Glomerulonephritiden

### 1.3 Das Alport-Syndrom

Das Alport-Syndrom ist eine progressive hereditäre Nephropathie, die familiär gehäuft auftritt. Es wurde erstmals 1927 von Arthur Cecil Alport beschrieben (Alport 1927) und tritt mit einer geschätzten Prävalenz von 1:5 000 bis 1:10 000 auf (Gubler 2008). Es geht einher mit Hämaturie und Proteinurie, Innenohrschwerhörigkeit, typischen Augenveränderungen sowie charakteristischen Veränderungen der glomerulären Basalmembran, die im weiteren Verlauf zu einer chronisch progredienten Niereninsuffizienz führen. Die terminale Niereninsuffizienz entwickelt sich ohne Behandlung innerhalb von 20 Jahren (Gross und Kashtan 2009).

#### 1.3.1 Klinik

Das Alport-Syndrom zeigt sich klinisch als progrediente Nephropathie und Glomerulopathie. Das äußert sich unter anderem in den zwei wichtigen renalen Symptomen Hämaturie und Proteinurie. Hämaturie ist definiert als die Ausscheidung von mehr als 5 Erythrozyten pro  $\mu\text{l}$  Urin. Beim Alport-Syndrom handelt es sich um eine glomeruläre Hämaturie. Es werden Erythrozyten durch die geschädigte Basalmembran gepresst und dadurch beschädigt. Im Urin finden sich deshalb Akanthozyten, die dysmorphen Erythrozyten. Eine Proteinurie ist definiert als eine Eiweißausscheidung von mindestens 150 mg pro Tag. Sie kann unterteilt werden in prärenal, renal und postrenal (siehe Abbildung 5).

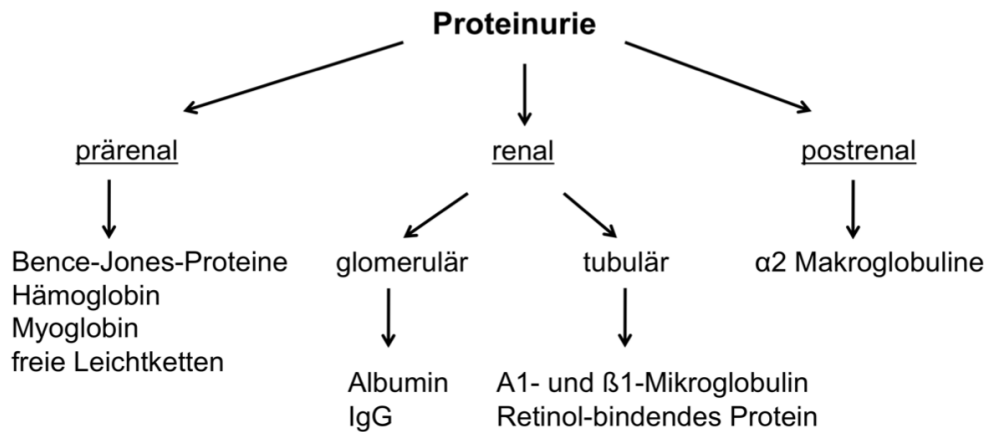


Abbildung 5 Systematik der Proteinurien

Die beim Alport-Syndrom auftretende Proteinurie kann in ein nephrotisches Syndrom übergehen. Dies ist gekennzeichnet durch eine große glomeruläre Proteinurie mit mehr als  $1 \text{ g} / (\text{m}^2/24\text{h})$ , eine Hypalbuminämie mit weniger als  $2,5 \text{ g/dl}$ , eine Hypercholesterinämie und Ödemen. Die extrarenalen Symptome manifestieren sich vor allem im Innenohr und im Auge. Am Innenohr zeigt sich ein progressiver Hörverlust (Gubler et al. 1981), der bei 55 % aller Männer und 45 % aller Frauen mit Alport-Syndrom zu finden ist (Wester et al. 1995). Zwischen 15 % und 30 % der Alport-Syndrom-Patienten haben Augenveränderungen (Kashtan und Michael 1996). Pathognomonisch ist der Lenticonus anterior, eine Vorwölbung der Linse in die vordere Augenkammer (Arnott et al. 1966).

Chronische Nierenerkrankungen verlaufen typischerweise in fünf Stadien ab.

Stadium	Beschreibung	GFR (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )
1	Nierenschädigung mit normaler GRF	> 90
2	Nierenschädigung mit leicht verminderter GFR	60 - 89
3	moderate Verminderung der GFR	30 - 59
4	massive Verminderung der GFR	15 - 29
5	Nierenversagen	< 15 oder Dialyse

Tabelle 2 Chronic Kidney Disease Stadien aus Kasiske (2003 S.10)

Der Verlauf des Alport-Syndroms lässt sich in vier Phasen einteilen. Die Phase 1 kennzeichnet eine Hämaturie und eine leichte Proliferation der mesangialen Zellen. Die glomeruläre Filtrationsrate ist normal. Mikroskopisch zeigt sich eine dünne Glomeruläre Basalmembran (GBM). Dieses Stadium setzt in der frühen Kindheit ein (Kashtan 1999b). Die 2. Phase beginnt ebenfalls im Kindesalter und ist durch eine zusätzliche Proteinurie charakterisiert. Die glomeruläre Filtrationsrate ist noch nicht verändert. Mikroskopisch sind die vermehrte Proliferation von mesangialen Zellen und eine Verdickung der GBM erkennbar. Im Glomerulus ist eine fokale Sklerose sichtbar. In der Phase 3 nimmt erstmals die glomeruläre Filtrationsrate ab. Die fokale glomeruläre Sklerose wird stärker und im Tubulointerstitium beginnt ein fibrotischer Umbau. In Phase 4 zeigt sich das Vollbild des Alport-Syndroms. Folglich kommt es zur Niereninsuffizienz mit einer Globalsklerose im Glomerulus und einem fibrotischen Interstitium (Kashtan 2005). Diese Patienten müssen sich einer Nierenersatztherapie unterziehen.

### 1.3.2 Diagnostik

Nierenerkrankungen spiegeln sich oft im Urin wider, deshalb zählt die Urinuntersuchung zu den wichtigsten Diagnostiken in der Nephrologie. Sogar Frühformen bestimmter Erkrankungen lassen sich im Urin diagnostizieren, bevor erste klinische Symptome auftreten. Es werden Parameter wie Farbe, Geruch und pH-Wert, aber auch der Gehalt von Glucose, Ketonen, Proteinen und Zellbestandteilen bestimmt. Bei vielen Erkrankungen spielt vor allem die Proteinausscheidung eine große Rolle. Die normale Proteinausscheidung beträgt weniger als 150 mg pro Tag. Bei Erkrankungen der Niere steigt diese an. Der Grad der Proteinurie zählt beim Alport-Syndrom zu den wichtigsten biologischen Prognosemakern.

Die Diagnose des Alport-Syndroms kann anhand von sechs Diagnosekriterien mit Hilfe von invasiven und nichtinvasiven Verfahren gestellt werden (siehe Abbildung 6).

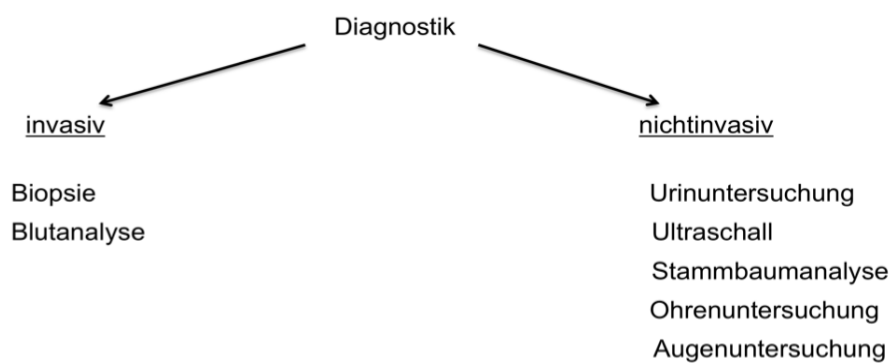
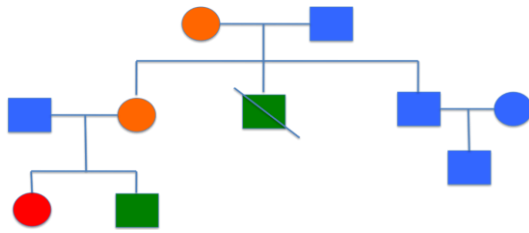


Abbildung 6 Diagnostik des Alport-Syndroms

Diagnosekriterien Alport-Syndrom		Symptommhäufigkeit	
1	positive Familienanamnese (Hämaturie) mit/ohne Progression zum terminalen Nierenversagen	Familienanamnese	85 %
		Hämaturie	100 %
2	progrediente Innenohrschwerhörigkeit		75 %
3	Augenveränderungen (Lenticonus, Fundus albipunctatus)		20 – 45 %
4	charakteristische ultrastrukturelle Veränderungen der GBM (Aufsplitterung / Lamellierung, Verdickung, Verdünnung)		100 %
5	diffuse Leiomyomatose		1 – 2 %
6	COL4A5, COL4A3,4-Mutationen	nachweisbar in	40 – 70 %

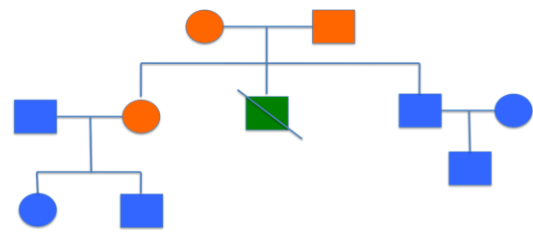
Tabelle 3 Diagnosekriterien Alport-Syndrom aus (Gross et al. 2004a)

Die Stammbaumanalyse hat bei genetisch bedingten Erkrankungen immer einen besonderen Stellenwert und sollte beim ersten Patientenkontakt erstellt werden. Die Abbildung 7 und die Abbildung 8 zeigen einen Beispielstammbaum des X-chromosomalen und des autosomal rezessiven Alport-Syndroms.



**Abbildung 7** Beispielstammbaum für das X-chromosomale Alport-Syndrom

Blau = gesund, Orange = Konduktor,  
Grün = krank,  
Rot = gesund, aber kann Konduktorin sein



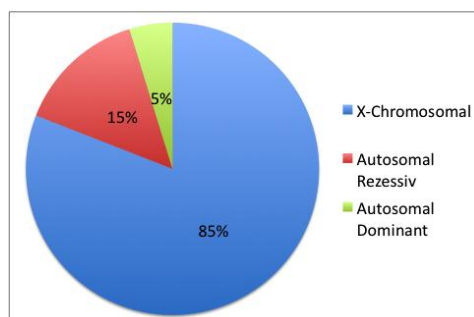
**Abbildung 8** Beispielstammbaum für das autosomal rezessive Alport-Syndrom

Blau = gesund, Orange = Konduktor,  
Grün = krank

### 1.3.3 Genetischer Hintergrund

Das Alport-Syndrom ist eine Erbkrankheit und wird durch eine Mutation in den  $\alpha$ -Ketten des Kollagen Typ IV hervorgerufen. Dadurch kommt es zu Veränderungen der glomerulären Basalmembran. Derzeit sind sechs verschiedene  $\alpha$ -Ketten des Kollagen Typ IV bekannt, die mit  $\alpha 1$  bis  $\alpha 6$  benannt werden (Gross und Weber 2005). Die  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ - Typ-IV-Ketten kommen ubiquitär vor, die  $\alpha 3$ - bis  $\alpha 6$ - Typ-IV-Ketten findet man in Lunge, Niere, Innenohr und Auge (Hudson et al. 2003).

Die Vererbung der Mutation nach Gubler (Gubler 2008) ist wie folgt verteilt:



**Abbildung 9** Häufigkeit der Vererbungsmodi beim Alport-Syndrom

Die Mutation kann in den Genen COL 4A3, COL 4A4 oder COL 4A5 auftreten. Diese Mutationen führen zum fehlenden Einbau der  $\alpha 3$ - bis  $\alpha 5$ - Typ IV- Ketten (Heidet et al. 2003). Das COL4A5-Gen liegt auf dem X-Chromosom. Die autosomal rezessive und autosomal dominante Form des Alport-Syndroms resultieren aus Mutationen des COL4A3- oder COL4A4-Gens des Chromosom 2. Fast 1 % der Bevölkerung ist heterozygot für die Mutation in dem COL4A3-Gen oder COL4A4-Gen (Gubler 2008).

Das X-chromosomale Alport-Syndrom gibt es in zwei unterschiedlichen Verlaufsformen. Beim „juvenilen“ Typ erleiden die jungen Männer schon mit circa 20 Jahren ein terminales Nierenversagen. Beim „adulten“ Typ ist der Verlauf der Krankheit sehr viel variabler und das terminale Nierenversagen tritt im Alter von circa 40 Jahren auf. Bei einigen der heterozygoten Konduktorinnen lässt sich eine intermittierende Hämaturie nachweisen, wobei sie aber oft asymptomatisch sind. Die Mutationen, die zum X-chromosomalen Alport-Syndrom führen können, lassen sich in drei Typen einteilen. Bei diesen drei Typen besteht

jeweils eine andere Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp (siehe Tabelle 4). Aus den unterschiedlichen Korrelationen entstehen der juvenile und der adulte Typ (Jais et al. 2003).

Typ	Charakteristikum	Genotyp	Phänotyp
schwer	verkürztes Protein Veränderung an NC1-Domäne des Kollagens	large rear- rangements, premature stop codon, frameshift, donor splice site	Niereninsuffizienz mit < 20 Jahren, 80 % Hörverlust, 40 % Augenveränderungen
intermediär	veränderte Proteinstruktur	missense mutation, inframe mutation, acceptor splice site mutation	Niereninsuffizienz mit ca. 26 Jahren, 65 % Hörverlust, 30 % Augenveränderungen
moderat	Glycinveränderungen	Glycinmutationen in den Exons 1–20	Nierenversagen mit > 30 Jahren, 70 % Hörverlust, 30 % Augenveränderungen

Tabelle 4 Typen des X-chromosomalen Alport-Syndroms (Gross et al. 2002, Jais et al. 2003)

Bei der autosomal-rezessiven Form des Alport-Syndroms sind die klinischen Symptome fast identisch der X-chromosomalen Form. Hierbei sind Frauen und Männer gleich häufig betroffen (Gubler 2008).

Die autosomal dominante Form des Alport-Syndroms ist sehr selten. Da die terminale Niereninsuffizienz oft erst im Alter von über 50 Jahren auftritt, gilt diese als mildeste Form des Alport-Syndroms (Pescucci et al. 2004, Van Der Loop et al. 2000).

### 1.3.4 Pathogenese

Für das Alport-Syndrom lassen sich sechs entscheidende Schritte in der Pathogenese der progredienten Nierenfibrose definieren (Gross und Weber 2005). Diese Schritte sind in der Abbildung 10 veranschaulicht.

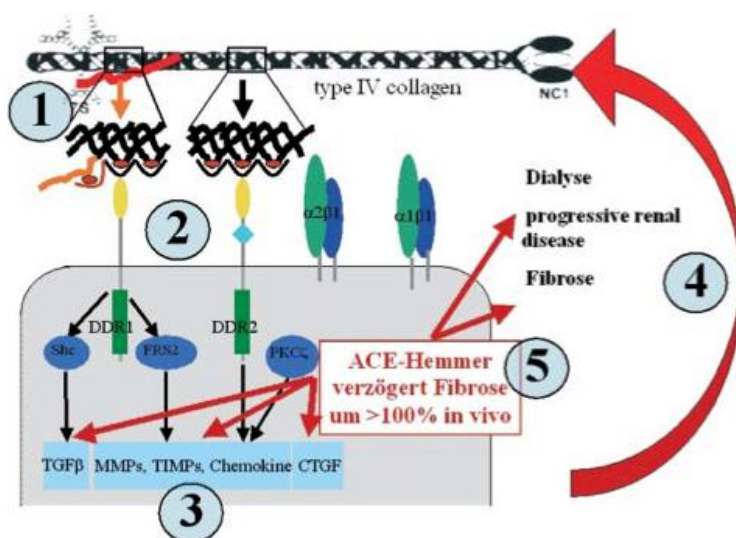
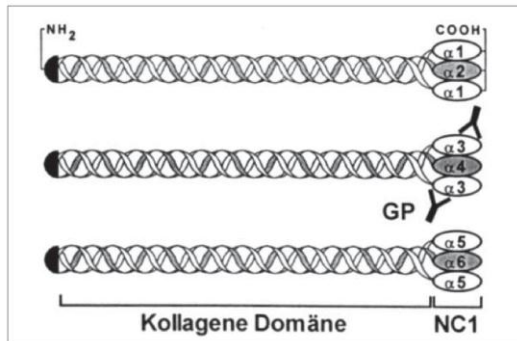


Abbildung 10 Pathogenese der Nierenfibrose beim Alport-Syndrom und daraus resultierende Ansatzpunkte zur Nephroprotektion aus Gross und Weber (2005 S.830)

Der erste Schritt ist der fehlende Einbau der α3-, α4- und α5- Kette des Typ-IV-Kollagens. Die durch die Mutation hervorgerufene Veränderung der glomerulären Basalmembran zeigt sich

in einem veränderten Strukturaufbau des Kollagens. Jede  $\alpha$ -Kette eines Typ IV Kollagens besteht aus einer langen Tripelhelix mit über 1 000 Glycin-X-Y repeats, der kollagenen Domäne und einer NC1-Domäne, der nicht kollagenen Domäne, an ihrem C-terminalen Ende (siehe Abbildung 11).



**Abbildung 11 Aufbau und Organisation eines Typ IV Kollagens des glomerulären Basalmembran aus Gross und Weber (2005 S.828)**

Im zweiten Schritt zeigt sich eine Aufspaltung und Verbreiterung der GBM. Immer drei  $\alpha$ -Ketten winden sich eng und gleichsinnig umeinander (Hudson et al. 2003). Nur der Einbau von Glycin, als kleinste Aminosäure, ermöglicht eine enge Windung der Helixstruktur. Durch den Gendefekt kommt es zum Beispiel zu einer Mutation in Glycin. Da aber nur das Glycin als kleinste Aminosäure in die Windung der Tripelhelixstruktur passt, kommt es zum Abknicken der Helixstruktur oder zum frühzeitigen Abbruch der Proteinkette. Folglich kann sich die dreidimensionale Struktur der Basalmembran nur fehlerhaft aufbauen und es kommt zur Aufspaltung und Lamellierung (Hudson et al. 2003). Beim Alport-Syndrom können die  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$  Typ IV Ketten nicht richtig eingebaut werden, stattdessen kommt es ersatzweise zum Einbau der embryonalen  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  Typ IV Kollagen Ketten. Da die embryonalen Kollagenketten mit weniger Disulfidbrücken verbunden sind als die  $\alpha 3$ -  $\alpha 5$  Typ IV Ketten, entstehen größere Lücken in der Basalmembran (Kashtan und Kim 1992, Miner und Sanes 1994). Durch den Einbau der embryonalen  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  Typ IV Kollagen Ketten wird die eigentliche Struktur der GBM zerstört. Die trilaminäre Struktur, aus Lamina rara externa, Lamina densa und Lamina rara interna, geht verloren. (Gubler 2008). Die Lamina densa zeigt Aufspaltungen und Lamellierungen. Die GBM zeigt sich dabei verdickt, was durch die netzartige bis korbgeflechtartige Strukturveränderung zu erklären ist (Flinter et al. 1988).

Im dritten Schritt folgt die Podozytenaktivierung. Vergrößerte Podozyten lassen an den dünnen, rupturierten oder verdickten Abschnitten der GBM ihre Fortsätze verschmelzen (Gubler et al. 1981).

Außerdem folgt eine vermehrte Proliferation von Mesangialzellen, die zu einer vermehrten Akkumulation von extrazellulärer Matrix führt, verdeutlicht im vierten Schritt der Pathogenese.

Der fünfte Schritt zeigt die Akkumulation und Aktivierung von Fibroblasten. Daraus resultiert eine verstärkte glomeruläre und tubulointerstitielle Fibrose.

Im letzten Schritt steht die Regulierung über TGF- $\beta$  und Matrixmetalloproteinasen im Vordergrund. Die Änderung der Zusammensetzung und Struktur der GBM verändert den

Ablauf der Zelladhäsion und Signaltransduktion. Die Zell-Matrix-Interaktion ist gestört. (Meehan et al. 2009)(Gross et al. 2004b). Die beiden Discoidin-Domain-Rezeptoren DDR1 und DDR2, sind als kollagenbindende Tyrosinkinase- Rezeptoren beschrieben worden. Ortsständige Zellen der extrazellulären Matrix treten über Kollagenrezeptoren DDR1 und 2 mit Podozyten und Endothelzellen in Kontakt und erkennen so, dass die Basalmembran nicht intakt ist. Die Bindung von DDR2 an Kollagen stimuliert die Synthese der Matrix-Metalloproteinase (Vogel et al. 1997). Des Weiteren führen sie über ein verändertes Rezeptorpotenzial zu einer reflektorischen Ausschüttung profibrotischer Faktoren, wie TGF- $\beta$ , CTGF, Laminin, Fibronectin, Integrine und Matrix-Metalloproteinasen, wie MMP2 und MMP9 sowie Chemokine (Gross et al. 2004a). Diese haben einen proinflammatorischen Effekt und führen zur Produktion von fibrotischem Gewebe, was dazu dienen soll, die defekte Basalmembran wieder zu reparieren (Abrahamson et al. 2003, Koepke et al. 2007). Die verschiedenen Metalloproteinasen, wie MMP2 und MMP9 und die Chemokine versuchen, die defekte Basalmembran zu reparieren. Da dies leider zu keinem Erfolg führt, kommt es zu einem Fortschreiten der chronischen Nierenschädigung (Gross und Weber 2005). Eine Dysregulation der MMP könnte somit sowohl die verdünnte wie auch die verdickte Basalmembran erklären (Cosgrove et al. 1996, Cosgrove et al. 2000). Die Höhe der Expression der Matrix-Metalloproteinasen MMP2, MMP3, MMP9 und MMP12 korreliert mit der Progression der Glomerulopathie (Rao et al. 2006). Es konnte gezeigt werden, dass eine Blockade der MMPs vor Beginn der Proteinurie die Ultrastruktur der glomerulären Basalmembran bewahren kann. Die Proteinurie wird hinausgezögert und verlangsamt den Progress der Nierenschädigung (Zeisberg et al. 2006). Die Ansammlung von Laminin 111, welches sich bevorzugt an fokal verdickten Regionen der GBM anlagert, ist eines der frühestmöglichen molekularen Zeichen für eine Basalmembranschädigung des Alport-Syndroms (Abrahamson et al. 2003, Cosgrove 2012).

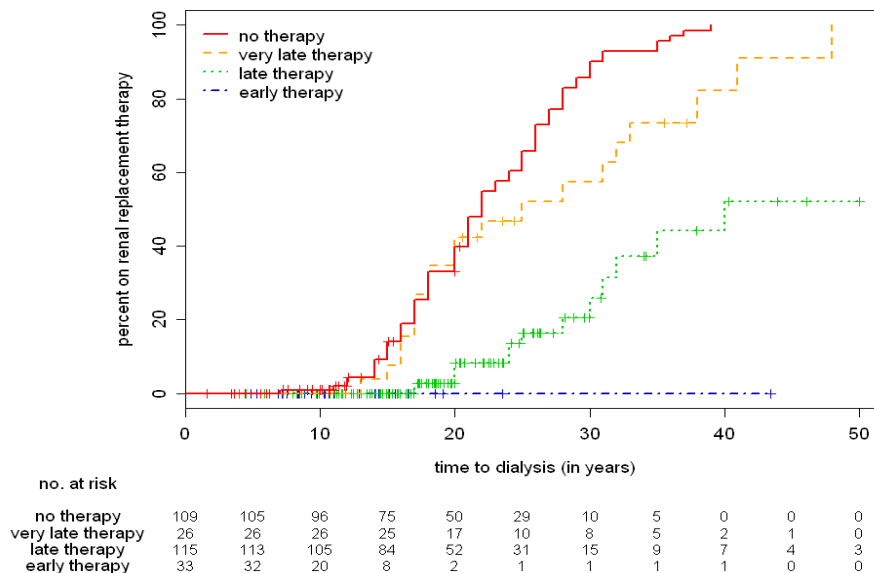
### 1.3.5 Therapiemöglichkeiten des Alport-Syndroms

Das Alport-Syndrom kann nur symptomatisch behandelt werden. Eine kausale Therapiemöglichkeit gibt es bisher nicht. Die pharmakologischen Interventionen zielen alle auf einen verminderten oder verlangsamten fibrotischen Umbau ab. Verschiedene Medikamente zeigen hierbei im Tierversuch gute Erfolge. AT1-Antagonisten wie Candesartan zeigen nephroprotektives Potential (Gross et al. 2004a). Auch der HMG-CoA-Reductase-Inhibitor Cerivastatin zeigt nephroprotektive Wirkung (Koepke 2005). Beide zeigen jedoch nicht die gleichen Effekte, wie eine Therapie mit ACE-Hemmern (Gross und Weber 2005). Der Vasopeptidaseinhibitor AVE7688 zeigt antifibrotische und antiinflammatorische Effekte und hat somit auch nephroprotektive Wirkung (Gross et al. 2005). Chemokinrezeptorantagonisten BX471 hemmen Leukozytenadhäsion und anhand des Mausmodells konnte eine signifikante Verzögerung der Nierenfibrose gezeigt werden (Ninichuk et al. 2005). Neben den pharmakologischen Interventionsmöglichkeiten werden noch andere Therapieoptionen erforscht. Sugimoto et al. zeigten, dass die Knochenmarkstammzelltransplantation am Mausmodell eine Möglichkeit ist, die defekte Basalmembran zu reparieren und somit eine neue Therapieoption für Patienten mit Alport-Syndrom (Sugimoto et al. 2006). Das Nierengewebe der im Tierversuch behandelten Alport-Mäuse konnte zum Teil wiederhergestellt werden, jedoch wurde keine Aussage über die zu erwartende Verzögerung des Nierenversagens getroffen. ACE-Hemmer kamen anfangs hauptsächlich bei der Behandlung von Herzinsuffizienz zum Einsatz, da sie einen blutdrucksenkenden Effekt vorweisen. Dieser Effekt stand im Wirkvordergrund des



Medikamentes. Durch den verminderten Blutdruck kommt es zu einem verminderten Perfusionsdruck in der Niere. Schon 1993 konnte gezeigt werden, dass die Therapie mit dem ACE-Hemmer Captopril bei Patienten mit Typ-1-Diabetes-mellitus die Progression der diabetischen Nephropathie verzögert. In dieser Studie bezog man den Effekt noch auf einen verminderten Blutdruck (Lewis et al. 1993). Die erste große Studie, die nachweisen konnte, dass ACE-Hemmer unabhängig vom Blutdruck die Progression von Nierenerkrankungen verzögern, war die 1998 durchgeführte REIN-Studie mit dem ACE-Hemmer *Ramipril* (Ruggenenti et al. 1998). Es wurde deutlich, dass *Ramipril* die Reduktion der Proteinurie im Rahmen einer nicht-diabetischen Nephropathie um 23% im Vergleich zur Kontrollgruppe bewirkte. Außerdem wurden nur 20% der *Ramipril*-Patienten dialysepflichtig, im Vergleich zu 40 bis 70% der Placebo-Patienten. In Anbetracht dieser eindrucksvollen Ergebnisse unter *Ramipril*-Therapie ist die REIN-Studie zweifelsohne ein wichtiger Meilenstein für die Behandlung von Patienten mit chronischer Nephropathie. Aufgrund dieses Erfolges werden ACE-Hemmer zur Zeit vor allem bei chronischen Nephropathien eingesetzt. Da es sich beim Alport-Syndrom ebenfalls um eine chronische Nephropathie handelt, ist anzunehmen, dass eine Therapie mit ACE-Hemmern erfolgversprechend ist.

Die erfolgreiche Therapie mit ACE-Hemmern beim Alport-Syndrom wurde anhand von Tierstudien nachgewiesen (Gross et al. 2003) und führte dazu, dass die ACE-Hemmer-Therapie heute bei Kindern mit Alport-Syndrom weltweit Standard - off label - Therapie geworden ist. Erstmals konnte 2012 die Therapie mit dem ACE-Hemmer *Ramipril* auch bei am Alport-Syndrom erkrankten Patienten erfolgreich gezeigt werden (Gross et al. 2012b). Die in Abbildung 12 gezeigte Auswertung der Daten des seit 2006 erhobenen Patientenregisters macht ebenfalls den Erfolg der ACE-Hemmer Therapie sichtbar.



**Abbildung 12 Therapieerfolg ACE-Hemmer bei Alport-Syndrom aus Gross et al. (2012b S.498)**

Die rote durchgehende Kurve zeigt den Krankheitsverlauf ohne Therapie. Bei diesen Patientengruppen sind bereits ca. 50 % der Personen im Alter von ca. 21 Jahren nierentransplantiert oder an der Dialyse.

Die grüne Kurve beschreibt, dass selbst bei spätem Therapiebeginn die Nierenersatztherapie hinausgezögert werden kann. Zu Beginn der Therapie litten die Patienten schon unter Proteinurie oder einer eingeschränkten Nierenfunktion. Die Kurve verläuft deutlich flacher und erst im Alter von 30 Jahren sind 50 % der Personen transplantiert.

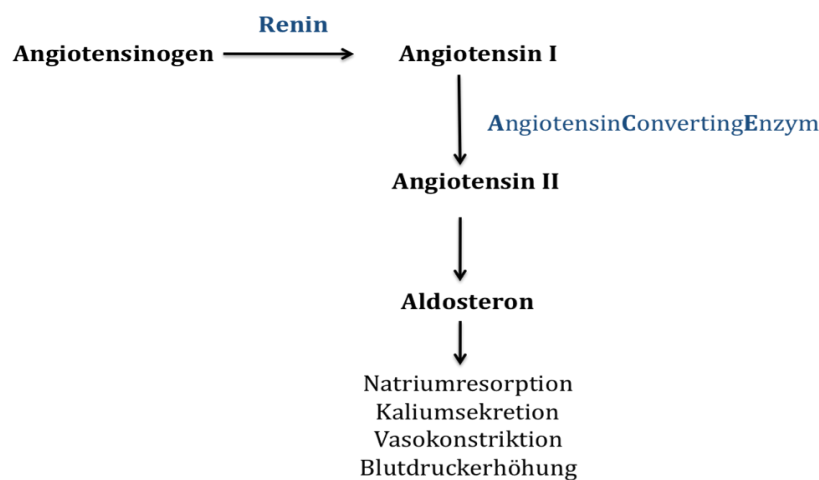
An der gelben Kurve ist abzulesen, dass auch ein sehr später Therapiebeginn im Alter von 20 Jahren noch einen Gewinn bringt.

Die blaue Kurve zeigt den Krankheitsverlauf bei einem frühen Therapiebeginn. Bei diesen behandelten Patienten ist ersichtlich, dass der Verlauf des Nierenversagens deutlich verzögert wird. Auch mit über 40 Jahren ist keiner dieser Patienten auf eine Nierenersatztherapie angewiesen.

Die Grafik zeigt deutlich den Erfolg der ACE-Hemmer Therapie. Je früher mit der Therapie begonnen wird, desto weiter kann die Nierenersatztherapie hinausgezögert werden.

#### 1.3.5.1 Wirkmechanismus von ACE-Hemmern

ACE-Hemmer greifen in das Renin–Angiotensin–Aldosteron-System ein. Dieses System ist ein multifaktorielles Effektorsystem und spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des systemischen Blutdrucks und der renalen Hämodynamik.



**Abbildung 13** Signalkaskade des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems

ACE-Hemmer bewirken über eine Blockade des Angiotensin Converting Enzyms (ACE) eine verminderte Bildung von Angiotensin II aus Angiotensin I. Dies hat zur Folge, dass weniger Aldosteron in der Nebennierenrinde gebildet wird. Daraus resultieren Vasodilatation, verminderte Katecholaminfreisetzung, Senkung des Sympatikonus und ein vermindertes Remodelling des Myokards. Die Abnahme der Aldosteronsynthese führt zu einer leichten Diurese und somit auch zu einem verminderten systemischen Blutdruck. Diese Effekte werden über den AT1-Rezeptor vermittelt. Über den AT2-Rezeptor bewirkt das anfallende Bradykinin eine Vasodilatation, vermittelt über Prostaglandin und Stickstoffmonoxid. Über eine Verminderung des zirkulierenden Angiotensin II wird der Widerstand in der efferenten Arteriole und damit der glomeruläre Perfusionsdruck reduziert. Die glomeruläre Filtrationsrate nimmt ab. Da erst im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung die

Hypertonie ein Rolle spielt, sind die blutdruckunabhängigen Effekte von ACE-Hemmern, eine verminderte Urämie und Proteinurie, die verminderte Ablagerung von extrazellulärer Matrix sowie die interstitielle und glomeruläre Fibrose, für die Alport-Syndrom-Therapie bedeutsam. Angiotensin II spielt dabei als Haupteffektor eine besondere Rolle und stellt einen entscheidenden Mediator bei den Umstrukturierungen der Niere bei Nephropathien dar. Angiotensin II wirkt vasokonstriktorisch und erhöht über eine Verengung der Vasa efferentia den glomerulären Druck. Zudem aktiviert Angiotensin II als Wachstumsfaktor Fibroblasten. Die Fibroblasten aktivieren Matrix-bildende Proteine, was zur Anreicherung von extrazellulärer Matrix führt. Die Nierenzellen hypertrophieren und das Nierengewebe nimmt ab. Zusätzlich induziert Angiotensin II profibrotische Zytokine mit proinflammatorischen Effekten. Diese Effekte von Angiotensin II werden einerseits durch die Freisetzung von TGF- $\beta$  und PAI-1 (Plasminogen activator inhibitor type 1) induziert, andererseits aktiviert Angiotensin II als proinflammatorisches Zytokin Monozyten und Makrophagen (Mezzano et al. 2001). Hierdurch trägt das Renin-Angiotensin-System entscheidend zur Entstehung der Fibrose bei progredienten Nierenerkrankungen bei. Durch den ACE-Hemmer wird weniger Angiotensin II gebildet und dadurch fallen diese profibrotischen und proinflammatorischen Wirkungen weg. ACE-Hemmer haben also antiinflammatorische und antifibrotische Effekte, was eine verminderte Glomerulosklerose und interstitielle Fibrose zur Folge hat. Dieser antifibrotische Effekt ist auf die Herunterregulation der profibrotischen Faktoren Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP-2), Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9), Connective Tissue Growth Factor (CTGF), Laminin1, Nidogen, Typ-I-Kollagen und Fibronectin zurückzuführen (Gross und Weber 2005, Gross et al. 2003). Da ACE-Hemmer die Bildung von Angiotensin II verhindern, schützen sie die Niere. Dennoch schreitet die Krankheit trotz ACE-Hemmer fort. Kommt es zum Nierenversagen ist eine Nierenersatztherapie notwendig. Dies kann in Form von Dialyse oder einer Nierentransplantation sein (Gross und Kashtan 2009).

#### **1.4 Mausmodell für das autosomal rezessive Alport-Syndrom**

SVJ 129 COL4A3 (SV 129-Col4a3<sup>tm1Dec</sup>/J) knockout Mäuse dienen als Tiermodell für das humane autosomal rezessive Alport-Syndrom. (SVJ 129 COL4A3: SV129 = Stammname der Mäuse, J= The Jackson Laboratory, COL4A3= Gennamen des Kollagens 4A3). Sie wurden vom Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA zur Verfügung gestellt. 1996 wurde dieses Knockout-Mausmodell von D. Cosgrove et al. entwickelt (Cosgrove et al. 1996). Der Tierstamm eignet sich besonders gut für Versuchsreihen, da er eine hohe Generationszahl, eine kurze Lebenszeit und einen einheitlichen Phänotyp aufweist (Gross et al. 2003). 20 - 25% der Nachkommen der heterozygoten Elterntiere sind homozygot und erkranken am Vollbild des Alport-Syndroms. Sie versterben nach zehn Wochen am progressiven Nierenversagen. So durchläuft das Mausmodell innerhalb von zehn Wochen den typischen Krankheitsverlauf des Alport-Syndroms. Ab der vierten Lebenswoche entwickeln die Mäuse eine Hämaturie und ab der sechsten Lebenswoche eine Proteinurie. Nach der achten Lebenswoche beginnt die Entwicklung eines progredienten Nierenversagens, welches in der zehnten Lebenswoche in der Regel zum Tod führt (Gross et al. 2003). Die homozygoten Mäuse können kurz nach der Geburt durch PCR diagnostiziert werden (Cosgrove et al. 1996, Miner und Sanes 1996).

Da sich das Tiermodell analog zum menschlichen Alport-Syndrom verhält und die Tiere genetische und phänotypische Merkmale der humanen Erkrankung aufweisen, stellen sie ein etabliertes und gängiges Modell für Studien des Alport-Syndroms dar (Cosgrove et al. 2007). Da der klinische Verlauf der autosomal-rezessiven und der X-chromosomalen Form des Alport-Syndroms weitgehend identisch ist, repräsentiert das Mausmodell 95% der Erkrankungsformen. Anhand von COL4A3<sup>-/-</sup> Mäusen wurde in Versuchen gezeigt, dass die Behandlung mit dem ACE-Hemmer *Ramipril* die Lebenszeit der Tiere verdoppelt und eine Reduktion der Proteinurie bewirkt. Die unbehandelten Mäuse starben nach 71 +/-6 Tagen am terminalen Nierenversagen. Durch eine frühe und bis zum Tod anhaltende Therapie verdoppelte sich die Überlebenszeit auf 150 +/-21 Tage (Gross et al. 2003, Gross et al. 2004a). Eine frühe Therapie mit *Ramipril* verzögert außerdem das Auftreten von Proteinurie, und beeinflusst deren Schweregrad. Eine unbehandelte Maus schied 12 Gramm/Liter Eiweiß im Urin und eine behandelte Maus nur 2 Gramm/Liter in Woche 9 aus. Es wurde deutlich, dass *Ramipril* eine antifibrotische und nephroprotektive Wirkung auf COL4A3 knockout Mäuse hat. Durch die Senkung der profibrotischen Faktoren TGF- $\beta$  und CTGF konnte eine Verminderung der tubulointestitiellen Fibrose gezeigt werden (Gross et al. 2003).

### 1.5 Biomarker - Identifizierung durch Proteomik

Biomarker sind charakteristische biochemische Substanzen oder Substanzgruppen in Lebewesen, die objektiv gemessen werden können. Sie werden als Indikatoren für Gesundheit oder Krankheit herangezogen und können Auskunft über den Verlauf und die Prognose einer Krankheit und deren Therapie geben. Im Idealfall korrelieren sie mit dem Krankheitsverlauf. Sie sollten ansteigen, bevor erste Krankheitssymptome auftreten und eine Entscheidungshilfe für einen Therapiebeginn sein. Charakteristische biologische Strukturen, die als Biomarker funktionieren, können Zellen, Gene, Gen-Abschnitte, Proteine, Stoffwechselprodukte oder bestimmte Moleküle wie Enzyme oder Hormone sein. Ebenfalls werden komplexe Organfunktionen oder charakteristische Veränderungen biologischer Strukturen als Biomarker herangezogen.

In der Medizin kann zwischen krankheitsbezogenen und arzneimittelbezogenen Biomarkern unterschieden werden. Die krankheitsbezogenen Biomarker geben Informationen, ob eine Krankheit droht oder welche Krankheit der Patient vermutlich hat (diagnostische Biomarker) oder wie eine Krankheit wahrscheinlich verlaufen wird (prognostische Biomarker). Die arzneimittelbezogenen Biomarker sind prädikative Biomarker, die anzeigen, ob ein Medikament wirkt und wie der Patient auf eine Therapie anspricht, um eine bestmögliche individuelle Behandlung festzulegen. Ein Marker kann mehreren Kategorien zugeordnet werden. Die Grenzen sind fließend, denn sie können sowohl zur Diagnose als auch zur Therapieauswahl dienen. In der Analytik unterscheidet man 3 Typen: qualitativ, quantitativ und kategorisch. Hier geht es hauptsächlich darum, ob und wie Biomarker überhaupt messbar sind. Unabhängig von der Einteilung kann man sagen, dass Biomarker Antworten auf eine Krankheit, deren Verlauf oder/und Therapie geben sollen (Muller et al. 2007). Deshalb sind die Anforderungen an Biomarker sehr hoch. Sie müssen objektiv messbar und schnell evaluierbar sein. Grundlegend wichtig sind die technischen Aspekte, wie die möglichst leichte Zugänglichkeit des Probenmaterials und die Genauigkeit und Geschwindigkeit des Nachweisverfahrens sowie eine geringe Abweichung der Ergebnisse aus verschiedenen Laboren. Die Bedeutung eines Biomarkers für Diagnostik, Prognose und Risikoeinschätzung der Erkrankung muss in unabhängigen Studien belegt sein.

Für empirische Untersuchungen sind die drei Gütekriterien Validität, Objektivität und Reliabilität entscheidend. Objektivität ist notwendig für eine allgemeingültige Erkenntnis unabhängig von Einzelmeinungen, aber keine hinreichende Bedingung für Reliabilität. Die Verlässlichkeit eines wissenschaftlichen Versuches im Sinne von gleichbleibenden Ergebnissen bei wiederholbaren Messungen ist notwendig aber nicht hinreichend für eine Validität. Ziel ist immer eine möglichst hohe Validität zu erreichen, die von einer ebenfalls hohen Objektivität und Reliabilität abhängig ist. Die Entwicklung von Biomarkern erfolgt in vier Etappen. Am Beginn steht die Entdeckung, danach folgt die klinische Validität, nachfolgend dann die Entscheidung der Nützlichkeit des Biomarkers und am Ende schließt sich die kommerzielle Entwicklung an. Gerade bei chronischen Erkrankungen ist eine sichere und frühe Diagnostik essentiell und oft ein früher Therapiebeginn für den Therapieerfolg notwendig, da vielen dieser Krankheiten, wie auch dem Alport-Syndrom, ein frühes symptomloses Krankheitsstadium vorausgeht. In dieser Phase dienen Biomarker, symptomfreie Risikopatienten rechtzeitig und zuverlässig zu identifizieren. Beim Alport-Syndrom ist Urin, als leicht zugängliches Probenmaterial, eine Möglichkeit, die Nierenfunktion zu überprüfen. Um den Verlauf der chronischen Nierenfibrose durch Alport-Syndrom zu verlangsamen und eine Dialyse bzw. eine Organtransplantation zeitlich hinauszuzögern, sind prognostische Biomarker von großer Bedeutung. Durch das Auftreten der Proteinurie beim Alport-Syndrom kann die systematische Analyse von Proteinen in Bezug auf ihre Identifikation, Quantifizierung und Funktionalität Informationen über den Krankheitsstand oder deren Verlauf geben.

Eine neue Methode, Biomarker zu entdecken und somit in die erste Phase der Identifizierung von Biomarkern einzutreten, ist die Proteomanalyse. Denn nicht das Genom, sondern die daraus entstehenden Proteine können auf veränderte Prozesse im Körper reagieren, indem sie hoch oder runter reguliert oder modifiziert werden. Ein Protein kann durch die Zusammenarbeit verschiedener Gene entstehen. Deshalb ist es notwendig, auch die Proteine und nicht nur die Gene zu identifizieren. Somit können durch proteomische Analysen im Urin anhand von Biomarkern Krankheiten diagnostiziert und deren Therapieverlauf kontrolliert werden. Der kombinierte Einsatz von wirksamen Medikamenten mit Biomarkern ist besonders bei Patienten wichtig, bei denen die therapeutischen Optionen eingeschränkt sind oder jahrelang andauern. Zur Erforschung von neuen Biomarkern wird unter anderem das Verfahren der Proteomanalyse angewendet. Das Wort Proteomik leitet sich von dem Begriff Proteom ab. Das Proteom ist die Gesamtheit aller Proteine, die zu einem bestimmten Zeitpunkt und unter definierten Bedingungen von einem Genom in einer Zelle exprimiert werden. Erstmals verwendete 1995 Wasinger den Begriff „Proteom“ (Wasinger et al. 1995). Das Genom ist in jeder Zelle gleich, das Proteom unterscheidet sich jedoch je nach Zustand der Zelle und kann von inneren und äußeren Faktoren beeinflusst werden. Jede Zelle kann ihre Proteine posttranslational modifizieren, zum Beispiel durch Glykosylierung, Phosphorylierung und Acetylierung. Durch posttranslationale Modifikation entstehen verschiedene Proteine mit unterschiedlichen Funktionen (De Hoog und Mann 2004). Genetische Informationen können demzufolge zu unterschiedlichen (phänotypischen) Ausprägungen führen. Im Gegensatz zum Genom zeichnet sich das Proteom durch Temperatur, Nährstoffmilieu oder medikamentenabhängige Veränderlichkeit aus. Diese Proteine können aufgetrennt und mithilfe der Massenspektrometrie den jeweiligen einzelnen Genen zugeordnet werden. Es ist denkbar, durch proteomische Studien die Auswirkungen von biologischen, pharmazeutischen und toxischen Einflüssen auf den Organismus zu untersuchen und somit

---

Wirkmechanismen und Effizienz von Medikamenten während bestimmter Krankheitsstadien zu beobachten.

Die Proteomanalyse besteht in der Regel aus den beiden großen Verfahrensteilen 2D-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie und gliedert sich nach Peng und Gygi (Peng und Gygi 2001) in folgende 5 Einzelschritte:

1. 2D-Gelelektrophorese
2. Ausschneiden von Gelspots
3. proteolytischer Verdau
4. Massenspektrometrie
5. Datenbankabgleich.

Der Vorteil der 2D-Gelelektrophorese ist, dass alle Proteine der Probe auf dem Gel sichtbar gemacht werden können, ohne vorher genau bestimmen zu müssen, nach welchen Proteinen gesucht werden soll. Eventuelle Probenverunreinigungen z.B. durch Lipide oder Salze können durch die Proteinfällung nach Wessel und Flugge eliminiert werden (Wessel und Flugge 1984). Der Nachteil der 2D-Gelelektrophorese ist, dass hydrophile Proteine nicht im Gel dargestellt werden können. Bei Proteinen mit besonders großem oder kleinem Molekulargewicht oder bei besonders sauren oder basischen Proteinen ist es ebenfalls schwierig, diese aufzutrennen. Anhand von Massenspektrometrie mittels *matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight* (MALDI TOF) können die einzelnen Proteine identifiziert werden. In diesem Zusammenhang ist das Probenmaterial Urin bedeutend, denn Urin-Proteine reflektieren in ihrer Menge und Zusammensetzung Abweichungen und Auffälligkeiten vom gesunden Zustand (Killingsworth 1982). So wird der Schweregrad einer Proteinurie anhand der Proteinausscheidungen gemessen.

## 1.6 Zielsetzung

Nach der Beschreibung der Klinik des Alport-Syndroms als seltene Erbkrankheit (Alport 1927) erfolgte in der Wissenschaftsgeschichte die Klärung der genetischen Ursachen und des Pathomechanismus. Ein geeignetes Tiermodell, welches in 10 Wochen alle Krankheitsstadien bis zum Nierenversagen durchläuft, wurde zur Untersuchung des menschlichen Alport-Syndroms in der Forschung für vorklinische Studien etabliert (Cosgrove et al. 1996). Nach Studien zur pharmakologischen Beeinflussung steht mit dem ACE-Hemmer *Ramipril* ein am Mausmodell erprobtes Medikament zur Verfügung, welches bei Erwachsenen erfolgreich zur nephroprotektiven Therapie eingesetzt wird. Dieser Erfolg lässt sich auch anhand des EU - Patientenregisters zeigen, welches seit 2006 die Überlebensdaten, die Proteinuriedaten und das Eintrittsalter in die Dialyse der Patienten dokumentiert (Gross et al. 2012b). Aufgrund der zu erwartenden medikamentösen Verzögerung des Krankheitsverlaufes verbessert sich die Lebenserwartung der Patienten, denn der Beginn einer Nierenersatztherapie wird auf einen wesentlich späteren Zeitpunkt verschoben. Bei einem frühen Therapiebeginn zeichnet sich ein beachtlicher Erfolg ab, deshalb ist eine frühzeitige Diagnose noch im Kindesalter wünschenswert.

Das Bestimmen von aussagefähigen Prognosemarkern ist von besonderem Interesse, da bisherige Therapieerfolge invasiv über die Nierenpunktion und histologischen Untersuchungen und die Gesamtproteinmenge im Urin definiert wurden. Die Gesamtproteinmenge ist jedoch nicht hinreichend aussagekräftig, da ihre Veränderungen nicht das Verhalten einzelner Proteine widerspiegelt. Die Menge einzelner Proteine können sinken, ansteigen oder stagnieren und damit Veränderungen der proportionalen Anteile im Gesamtproteinwert verursachen ohne das Gesamtbild wesentlich zu verändern. Einzelne Proteine können möglicherweise durch ihr Verhalten während der Therapie konkret detaillierte Aussagen über den Krankheitsstand geben und Prognosen über den Therapieverlauf sowie den Erfolg zulassen. Dazu wird in dieser Arbeit mit Hilfe der Proteomanalytik am Tiermodell, dass die menschlichen Krankheitsstadien zwei und drei simuliert, untersucht, ob geeignete Biomarkerkandidaten für den Krankheitsverlauf, den Therapieerfolg und den Therapieverlauf zu finden sind. Hierbei werden unbehandelte und behandelte Mäuse in zwei verschiedenen Krankheits- und Therapiestadien verglichen.

Ziel dieser Studie ist die Identifizierung von nichtinvasiven Biomarkern im Urin, die klinisch relevante Prognosen bei der Therapie mit ACE-Hemmern von Patienten mit dem Alport-Syndrom erlauben. Die nachgewiesenen spezifischen Proteinexpressionsmuster bei Behandlung mit dem ausgewählten ACE-Hemmer *Ramipril* können die Basis zur Identifizierung spezifischer Therapiemarker bilden und so eventuell die Voraussetzung für eine effektive Therapie und Therapieüberwachung sein. Um einen Biomarkerkandidaten für den Krankheitsverlauf zu identifizieren, wurde das 6-Wochen-Placebo-Stadium mit dem 7,5-Wochen-Placebo-Stadium verglichen. Um einen Biomarkerkandidaten für den Therapieerfolg zu identifizieren, wurden zum einen im 6-Wochen-Stadium und zum anderem im 7,5-Wochen-Stadium behandelte und unbehandelte Mäuse miteinander verglichen. Um einen Biomarkerkandidaten für den Therapieverlauf zu finden, wurden die 6-Wochen-Stadien und 7,5-Wochen-Stadien unter ACE-Hemmer Therapie verglichen. Anhand des zentralen Krankheitskriterium Proteinurie sollen Prognosemarker bestimmt werden, die Auskunft über den Krankheitsverlauf, den Therapieverlauf und den Therapieerfolg geben können. Idealerweise sollen sich die drei Marker kandidatentypen in einem Protein vereinen.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1. Chemikalien und Geräte

Folgende aufgeführte Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Geräte und wissenschaftliche Analysesoftware kamen während dieser Arbeit zum Einsatz:

#### 2.1.1 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
1,4-Dithiothreitol 99% p.a. (DTT)	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol minimum 98%	Sigma-Aldrich, Steinheim
2,5- Dihydroxybenzoesäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aceton	Merck, Darmstadt
Acetonitril (ACN)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxiddisulfat (Ambic)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumbicarbonat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bio-Lyte 3/10 Ampholyte	Bio-Rad, München
Bradford-Reagens	BioRad, München
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
BSA-Standard	Sigma-Aldrich, Steinheim
Butanol	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid Dihydrat	Merck, Darmstadt
CAPS	Merck, Darmstadt
Chloroform 99%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Coomassie Brillant Blue G-250	Bio-Rad, München
Criterion XT MOPS Running Buffer	Bio-Rad, München
Criterion XT Precast Gel 12% BIS-Tris IPG + 1 Well comb	Bio-Rad, München
Cy3 DY-547-NHS-Ester	Dyomics, Jena
Cy5 DY 647-NHS-Ester	Dyomics, Jena
destilliertes Wasser (doppelt deionisiert)	laboreigene Herstellung
Dodecylsulfat Natriumsalz	Merck, Darmstadt
Essigsäure 99-100%	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Flamingo Fluorescent Gel Stain	Bio-Rad, München
Glycerin etwa 87% zur Analyse	Merck, Darmstadt
Glycin 99%	Roth, Karlsruhe
Harnstoff 99%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Jodacetamide	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Lysin Monohydrochlorid	Sigma
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
Methanol 99%	Roth, Karlsruhe
Mineralöl	Bio-Rad, München
N,N-Dimethylformamid 99%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Pinceau S solution für electrophoresis	Serva, Heidelberg



Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope	Bio-Rad, München
Protein Assay	Bio-Rad, München
Roti-Blue	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Salzsäure, rauchend 37%	Roth, Karlsruhe
Sequencing Grade Modified Trypsin	Promega, Madison, Wisconsin, USA
Sodium Dodecyl Sulfat 10% (SDS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tetramethylethylendiamin 99% (TEMED)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trifluoressigsäure (TFA)	Merck, Darmstadt
Tris Pufferan 99%	Roth, Karlsruhe
Trypsin Sequencing Grade Modified	Promega, Wisconsin, USA
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Urea for electrophoresis	Sigma-Aldrich, Steinheim

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
Amersham Hybond ECL Membran	GE Healthcare
Criterion XT Precast Gel 12% Bis-Tris IPG+1 Well Comb 11cm	Bio-Rad, München
Einmalküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Eppendorf Tubes	Eppendorf, Hamburg
Gelfärbeschalen	Roth, Karlsruhe
Glaspipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Halb-Mikroküvetten 10x4x45 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Handschuhe Gentle Skin sensitive	Meditrade, Kiefersfelden
Midi Polyacrylamid Gel System (Criterion Precast Gel System)	Bio-Rad, München
Mini Polyacrylamid Gel System (Ready Gel Precast Gel System)	Bio-Rad, München
Model 583 Gel Dryer Filter Paper	Bio-Rad, München
PCR Soft Tubes	Eppendorf, Hamburg
pH-Fix 7.5-9.5 Indikatorstäbchen	Macherey-Nagel,
Pipette Eppendorf Reference 100µl; 0.5-10µl; 10-100 µl 100-1000µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen 0.1-10µl; 200 µl: 1000µl	Eppendorf, Hamburg
Readystrips IPG Strips 11cm pH 4-7	Bio-Rad, München
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Röhre 15ml, 50ml	Sarstedt, Nümbrecht
Rührspatel	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.3 Geräte

Geräte	Modell	Hersteller
digitales Phosphor Oszilloskop	TDS520D	Tektronix, Beaverton, Oregon, USA
Elektrophoresis Powersupply	PS 3002	Life technologies
Fokussierkammer	Protean IEF Cell	Bio-Rad, München
Gelelektrophoresesystem	13cm x 8cm	Bio-Rad, München
isoelektrisches Fokussiersystem	Protean IEF Cell	Bio-Rad, München
Kühlzentrifuge	Sartorius 1-15 PK ,Rotor 12132H	Sigma, Osterode
Lab-Shaker	Kühner	Braun, Burladingen
Magnetrührer	Ikamag RCT	IKA-Werke GmbH, Staufen
Massenspektrometer	Voyager DE-STR MALDI-TOF,	Applied Biosystem, CA, USA
PH-Meter	PB-11	Sartorius, Göttingen
Photometer	Lambda 25 UV/VIS Spectrometer	Perkin Elmer & Co GmbH, Stuttgart
Pipetus	Pipetus® 100-240 Volt	Hirschmann, Eberstadt
Rotationschüttler	GFL 3005	GFL, Burgwedel
Sartorius Laborwaage	Universal	Sartorius, Göttingen
Scanner	Fluorescent Image Analizing System FLA 5100	Fujifilm , Düsseldorf
Speed-Vakuumzentrifuge	Univapo 150 H	UniEquip Laborgerätebau- und Vertriebs GmbH, Planegg
Thermomixer	Comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415D, Rotor 14198	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallbad	Sonorex	Bandelin electronic, Berlin
Vortexer	Reax 200	Heidolph Instruments, Schwabach
Wärmebad	GFL 1083	GFL, Burgwedel
Wärmeinkubator	Flow Laboratories IP 1500 Automatic CO2 Inkubator	Flow Laboratories, Kalifornien, USA

### 2.1.4 Software

Software	Verwendung	Hersteller
Data Explorer- Voyager V	MALDI-TOF-Datenanalyse	Applied Biosystems, Laguna Beach, USA
Decodon Delta 2D 4.2	2D Gelelektrophorese Analysesoftware	Decodon GmNH Biotechnicum, Greifswald
Exel 2003	Tabellenkalkulation	Microsoft Corporation, USA
Image J	Analysesoftware	National Institutes of Health
Image Reader FLA 5000 V.30	Scannerprogramm	Fujifilm
Mascot Wizard	Proteindatenbanksuchemaschine	www.matrixscience.com
Swissprot	Proteindatenbank	www.expasy.org/uniprot/
MassLynx 4.0	Software für Massenspektrometer	Waters, Massachusetts, USA

### 2.1.5 Antikörper

Antikörper	Hersteller
Alexa Fluor 488 donkey anti-goat IgG	Invitrogen, Darmstadt
Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG	Invitrogen, Darmstadt
Alexa Fluor 647 donkey anti-sheep IgG	Invitrogen, Darmstadt
Anti-Human Haptoglobin	Sigma, Steinheim
Anti-Mouse Albumin Polyglonal Antibody	Thermo scientific, Waltham, Massachusetts
Rabbit polyclonal to Amyloid Precursor Protein	Abcam, Cambridge
Rabbit polyclonal to Antithrombin III	Abcam, Cambridge
Rabbit polyclonal to Parvalbumin	Abcam, Cambridge
Serpin A3K (K-14):sc162174	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz
Sheep polyclonal to Plasminogen	Abcam, Cambridge

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Probengewinnung

#### Sammlung

Als Grundlage der Studie dienen COL3A4 knockout Mäuse. Die Studie wurde im Rahmen des Tierversuchsantrags Alport Knockouts G.10.163 der Georg-August-Universität Göttingen genehmigt. Es wurde Urin von insgesamt 37 Mäusen im Zeitraum von Dezember 2010 bis Dezember 2011 gesammelt. Ein Teil der Mäuse bekam mit dem Trinkwasser ab der 4. Woche nach Geburt den ACE-Hemmer *Ramipril*, der andere Teil der Mäuse blieb unbehandelt – Placebo. Das *Ramipril* wurde durch die Firma Sanofi-Aventis zu Verfügung gestellt. Hierzu wurde von den behandelten als auch den unbehandelten Mäusen Urin in der 6. Woche und der 7,5. Woche nach Geburt abgenommen. Diese Stadien wurden gewählt, da die Stadien der Urinentnahme denen der chronic kidney disease Stadien zwei und drei beim Menschen entsprechen. Zusätzlich wurden noch Proben im 4,5-Wochen-Stadium behandelter und unbehandelter Mäuse für einen Nachversuch entnommen. Der Spontanurin der Mäuse wurde direkt nach der Abnahme mit Datum versehen einzeln bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren und bis zur weiteren Analyse gelagert.

### Probenaufbereitung

Um eine möglichst breite Proteinstreuung zu bekommen, wurden Mausurinproben gepoolt, das heißt, der Urin der Mäuse im gleichen Krankheitsstadium und der gleichen Behandlung wurde zu einer Probe vereint. Hierbei handelt es sich um ein Standardvorgehen in der Urinproteomanalyse (Zhou et al. 2006). Dies dient dazu, interindividuelle Unterschiede der Mäuse auszugleichen. Aus allen entnommenen Urinproben wurden 4 Poole hergestellt:

- Urine der mit ACE-Hemmer *Ramipril* behandelten Mäuse – 6 Wochen nach Geburt
- Urine der mit ACE-Hemmer *Ramipril* behandelten Mäuse – 7,5 Wochen nach Geburt
- Urine der unbehandelten Mäuse – 6 Wochen nach Geburt
- Urine der unbehandelten Mäuse – 7,5 Wochen nach Geburt.

In allen Gruppen wurden von 5-10 Mäusen jeweils 20-60 µl Urin gemischt. Durchschnittlich ergab sich eine Proteinkonzentration von 10 µg/ µl Probe. Die Proben für den Nachversuch mit 4,5 Wochen wurden genauso behandelt, wie die im 6-Wochen- und 7,5-Wochen-Stadium zuvor.

#### 2.2.2 Fällung der Proteine

Die Proteinfällung erfolgte nach dem Schema von Wessel und Flugge (Wessel und Flugge 1984) und dient dazu, den Proteinen die Hydrathülle zu entziehen. Die vorbereiteten Poolproben wurden mittels Chloroform-Methanol-Fällung gefällt. Dazu wurden je 100 µl der Probe mit 400 µl Methanol, 100 µl Chloroform und 300 µl Wasser gemischt und eine Minute bei 14 000 g zentrifugiert. Anschließend wurde die obere Phase der zwei Phasen entfernt und der Rest der Probe erneut mit 400 µl Methanol gemischt und zwei Minuten bei 14 000 g zentrifugiert. Die obere Phase wurde erneut abgenommen und die restliche Probe nochmals mit 400 µl Methanol gemischt und zwei Minuten bei 14 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde letztmalig abgenommen und verworfen. Im Anschluss daran wurde die Probe getrocknet. Nach dem Trocknen wurde die Probe in Lysepuffer (9,5 M Urea, 4 % CHAPS, 50 mM DTT) aufgenommen.

#### 2.2.3 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration der Proben wurde mit der Methode nach Bradford bestimmt (Bradford 1976). Die Coomassie Brilliantbluelösung bindet an die Proteine und bildet Komplexe mit den Seitenketten der Aminosäuren. Dadurch ändert sich das Absorptionsmaximum von 465 nm ohne Protein zu 595 nm mit Protein. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Hierzu wurde zunächst eine Eichkurve aus Bradford-Reagens (1:5 verdünnt) und bovinem Serum-Albumin erstellt. Nach einer Inkubationszeit von zehn Minuten wurde die Extinktion in einem Spektralphotometer (Lambda 25 UV/ VIS Spectrometer, Perkin Elmer) bei 595 nm Wellenlänge gemessen und aus den resultierenden Werten eine Gleichung zur Berechnung der Konzentrationen erstellt. Anhand dieser Gleichung konnte die Extinktion der gemessenen Proben in Proteinkonzentrationen umgerechnet werden. In der Gleichung wurden neben der Steigerung der Geraden auch die Verdünnung der Proben, das Probenvolumen und der Leerwert des Probenpuffers berücksichtigt.

### 2.2.4 2D-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist ein analytisches Verfahren, bei dem unter Einfluss eines elektrischen Feldes Moleküle durch ein Gel transportiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Verfahren verwendet, um Proteine voneinander zu trennen. Die Trennung der Proteine beruht zum einen auf der unterschiedlichen Ladung der Proteine und zum anderen auf der Molekulargröße. Dabei werden in der ersten Dimension die Proteine anhand ihres relativen Gehalts an sauren und basischen Aminosäureresten, also anhand ihres isoelektrischen Punktes aufgetrennt. Die Proteine wandern bis zu der Stelle im Gel, an dem der pH-Wert ihrem isoelektrischen Punkt entspricht. In der zweiten Dimension erfolgt die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Dies erfolgt durch die so genannte Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamid Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). Das negativ geladene SDS überlagert die Eigenladung des Proteins. Je größer das Protein ist, umso mehr negative Ladung kann gebunden werden. Es entsteht ein konstantes Verhältnis von Masse zu Ladung. Die Trennung im elektrischen Feld erfolgt somit ausschließlich nach der Größe des Proteins und nicht nach der Ladung des Proteins (Laemmli 1970). Durch Dithiothreitol werden die Disulfidbrücken der Proteinstrukturen zerstört und so können sich die Proteine leichter in ihrer Primärstruktur anordnen.

#### Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung

Es wurden Probenmenge für 150 µg Protein verwendet und mit Rehydratationspuffer (Urea 8 M, Chaps 1 %, DTT 15 mM, Ampholyte 0,2 %) auf 175 µl aufgefüllt und mit etwa 1 µl Bromphenolblau sichtbar gemacht. Die Probe wurde auf IPG-Streifen in einer Fokussierkammer aufgetragen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Streifen mit 2 ml Mineralöl abgedeckt.

Die Fokussierkammer wurde im Fokussiergerät über Nacht 12 Stunden bei 20°C passiv rehydriert und anschließend die Spannung nach folgendem Schema schrittweise erhöht:

**Tabelle 5 Spannungsschritte bei der Isoelektrischen Fokussierung**

Schritt	Voltstärke in V	Gradient	Zeit in h	Funktion
1	500	Rapid	1	Proteineintritt
2	1 000	Rapid	1	Proteineintritt
3	10 000-80 000	Linear	4	Fokussierung
4	10 000	Rapid	30 000 Vh	Fokussierung
5	500	Rapid	12	Step and Hold

#### Zweite Dimension: Proteinauftrennung nach Molekulargewicht

Die IPG-Streifen wurden aus dem Fokussiergerät genommen und für 15 Minuten in 10 ml Äquilibrierpuffer (6 M Urea, 30 % Glycerol, 2 % SDS, 0,05 M Tris-HCl) mit 100 mg DTT und 15 Minuten in 10 ml Äquilibrierpuffer mit 400 mg Jodacetamid inkubiert. Vor dem Auftragen auf die zweite Dimension wurden die Streifen mit doppelt entionisiertem Wasser kurz abgewaschen.

Die IPG Streifen wurden in Fertiggele (Criterion XT Precast Gel 12 % BIS-Tris IPG + 1 Well comb) gelegt. Als Marker dient Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope (Bio-Rad) mit Banden für 250 kDa; 150 kDa; 100 kDa; 75 kDa; 50 kDa; 37 kDa; 25 kDa; 20 kDa; 15 kDa und 10 kDa. Die Gele wurden in einer Laufeinheit mit Electrophoresepuffer (Criterion XT MOPS

Running Buffer) angebracht und unter ständigem Kühlen an steigende Spannung angelegt, 150 V für 10 Minuten, 180 V für 10 Minuten und 200 V bis sich das Gel vollständig aufgetrennt hatte.

Das gelaufenen 2D-Gel wurde für mindestens 2 Stunden in Fixierlösung (40 % Ethanol, 10 % Essigsäure) gelegt und anschließend über Nacht in Flamingo (Flamingo Fluorescent Gel Stain) gefärbt. Hierbei handelt es sich um eine Fluoreszenz basierte Proteinfärbemethode, welche der Detektion von Proteinen im 2D-Gel dient. Die gefärbten Gele wurden am Scanner bei 532 nm Laserlinie bei mittlerer Intensität gescannt und anschließend in Rati blue Färbelösung gelegt.

### 2.2.5 2D-Differential-Gelelektrophorese (2D DIGE)

Die 2D DIGE wurde durchgeführt, um die Ergebnisse der 2D-Gelelektrophorese zu validieren und zu quantifizieren. Es ist nun möglich, zwei Proben direkt miteinander zu vergleichen. Dazu wurden in einem Gel 6-Wochen-Placebostadium mit 6-Wochen-ACE-Hemmerstadium und in einem weiteren Gel 7,5-Wochen-Placebostadium mit 7,5-Wochen-ACE-Hemmerstadium verglichen. Von jeder Probe wurden 75 µg Protein mit 1.5 µl Cy Dye 3 Fluoreszenzfarbstoff (400 pmol/µl) oder 1.5 µl Cy Dye 5 Fluoreszenzfarbstoff (400 pmol/µl) markiert und mit Lysis Puffer + Tris-HCl Puffer von pH 8.5 auf 15 µl aufgefüllt und im Anschluss daran für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 1.5 µl 10 mM Lysine hinzugefügt und weiter 10 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die jeweils zu vergleichenden Proben zusammengemischt und auf 175 µl mit Rehydratationspuffer (+10 µl Ampholyte + 20 mg DTT) aufgefüllt. Die Probe wurde auf IPG-Streifen in einer Fokussierkammer aufgetragen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wurden die Streifen mit 2 ml Mineralöl abgedeckt. Die Fokussierkammer wurde im Fokussiergerät über Nacht 12 Stunden passiv rehydriert und anschließend die Spannung nach folgendem Schema schrittweise erhöht.

**Tabelle 6 Spannungsschritte Isoelektrische Fokussierung DIGE**

Schritt	Voltstärke in V	Gradient	Zeit in h	Funktion
1	500	Rapid	1	Proteineintritt
2	1000	Rapid	1	Proteineintritt
3	10 000 bis 60 000	Linear	4	Fokussierung
4	500	Rapid	10.000 Vh	Fokussierung
5	500	Rapid	12	Step and Hold

Die Streifen wurden aus dem Fokussiergerät genommen und für 20 Minuten in 10 ml Äquilibrierpuffer (6 M Urea, 30 % Glycerol, 2 % SDS, 0,05 M Tris-HCl) mit 100 mg DTT und für 20 Minuten in 10 ml Äquilibrierpuffer mit 400 mg Jodacetamid inkubiert. Vor dem Auftragen auf die zweite Dimension wurden die Streifen mit doppelt entionisiertem Wasser kurz abgewaschen. Die IPG Streifen wurden in Fertiggele (Criterion XT Precast Gel 12 % BIS-Tris IPG + 1 Well comb) gelegt. Die Gele wurden in einer Laufeinheit mit Electrophoresepuffer (Criterion XT MOPS Running Buffer) angebracht und unter ständigem Kühlen folgende Spannungen angelegt: 150 V für 10 Minuten, 180 V für 10 Minuten und 200 V bis sich die Proteine gut aufgetrennt hatten. Die Gele wurden gleich im Anschluss an den Lauf im Scanner Fuji FLA 5100 mit den Laser bei 532 nm (Cy 3) und 635 nm (Cy5) gescannt und anschließend mit dem Programm Delta2D überlappt.

### 2.2.6 Digitalisierung der Gele

Die Digitalisierung der Gele erfolgte mit Hilfe des Fuji FLA 51000 **Fluoreszenz**-Laser-Scanners. Dieser besitzt Laser in den Wellenlängen 473 nm, 532 nm, 635 nm und 650 nm. Über die Spannung von 250 bis 1 000 V kann die Empfindlichkeit des Gerätes variiert werden. Um ein optimales Scannergesult zu erzielen, sollte die Spannung so gering wie möglich gehalten werden. Bei 600 V zeigten sich die besten Ergebnisse.

### 2.2.7 Statistische Auswertung der Gele

Mit Hilfe der Software Delta2D der Decodon AG erfolgte die Auswertung der Gele. Hierzu durften nur Gele verwendet werden, die nicht digital nachbearbeitet wurden. Nur Funktionen wie Spiegeln, Beschneiden und Drehen waren dabei zulässig. Die Auswertung unterteilt sich in folgende Schritte:

#### 1. Warping

Kleine Positionsunterschiede der Spots wurden ausgeglichen. Durch das Setzen von sogenannten „match-vectoren“ werden die Positionsunterschiede dargestellt.

#### 2. Erstellung eines Mastergels

Die Bilder wurden übereinander gelegt und daraus ein artifizielles Mastergel durch Bildfusion erzeugt. Das neu entstandene Bild hat keine quantitative Aussage.

#### 3. Erstellen einer Proteom Map

Hierbei wurden auf dem Mastergel die Spots festgelegt, die sich aus den Parametern Hintergrund, mittlere Spotgröße und Sensitivität berechneten.

#### 4. Übertragung der Proteom Map

Die Proteom Map wurde nun auf die einzelnen Gele übertragen und durch Warping die Positionsunterschiede ausgeglichen. Nun kann die Intensität der einzelnen Spots anhand der Parameter interner Standard, Probe und Kontrolle berechnet und auf 100 % normiert werden.

Um die Regulationsunterschiede und deren statistische Signifikanz darzustellen, werden für jeden Spot das relative Verhältnis der normierten Intensität, die Standardabweichung und ein T-Test berechnet. Die Expression eines Proteins gilt als signifikant geregelt, wenn der errechnete Quotient aus dem Vergleich Probe zu Kontrolle einen Wert von 2, was für eine Hochregulierung dieses Proteins spricht, oder einen Wert von 0,5 für eine Herunterregulierung bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit (p-Wert) von  $p < 0,05$  ergibt.

### 2.2.8 Trypsinverdau der Gelspots

Trypsin hydrolisiert Peptidbindungen nach zwei basischen Aminosäuren und generiert so ein für das jeweilige Protein typisches Peptidgemisch. Es entsteht ein „Fingerabdruck.“ Aus den mit „Rati blue“ Färbelösung gefärbten Gelen wurden Gelspots mit einem Skalpell ausgestanzt und anschließend drei Mal mit destilliertem Wasser gewaschen und danach für 15 Minuten mit 50%igem Acetonitril und für eine Stunde mit 100%igem Acetonitril inkubiert. Anschließend wurden 10 µl 100 mM Ammoniumbikarbonat auf die Gelspots gegeben und nach 5 Minuten Inkubationszeit 10 µl vom 100%igem ACN hinzugegeben, so dass eine 1:2-Lösung entstand. Nach 15 Minuten wurde die Lösung entfernt und die Gelspots getrocknet.

Im nächsten Schritt wurde aus 1940 µl ddH<sub>2</sub>O; 10 µl 1 M CaCl<sub>2</sub> und 50 µl 1 M Ammoniumbikarbonat ein Verdauungspuffer hergestellt. Vom Verdauungspuffer wurden 100 µl auf 12,5 µl Trypsin gegeben. Vom Trypsin-Verdauungspuffer wurden 6 µl auf die getrockneten Gelspots gegeben und diese auf Eis 45 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde die Lösung entfernt und 6 µl vom Verdauungspuffer ohne Trypsin auf den Gelspot gegeben. Die Gelspots wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Verdauungspuffer in neue Eppendorfcups abpipettiert. Auf die Gelspots wurden 15 µl 30 % ACN / 70 % 0,1 %ig Trifluoressigsäure (TFA) gegeben und für 30 Minuten im Ultraschallbad inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abpipettiert und in die Eppendorfcups hinzugegeben, denen zuvor die abpipettierte Lösung hinzugegeben wurde. Danach wurden auf die Gelspots 15 µl 60 % ACN / 40 % 0,1%ig TFA gegeben und nochmals für 30 Minuten im Ultraschallbad inkubiert. Anschließend wurde Lösung in die anderen Eppendorfcups hinzupipettiert und die Eppendorfcups mit den Gelspots entfernt. Die Eppendorfcups mit Lösung wurden für 40 Minuten in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Die getrockneten Proben wurden in 4 µl 0,3 %ig TFA gelöst. Auf eine gereinigte rostfreie MALDI - Platte wurden 0,7 µl Matrix und 1,4 µl von der Probe gegeben.

### 2.2.9 Massenspektrometrie

Der Großteil der Proteinidentifikation erfolgte am MALDI-TOF Gerät der Proteomics AG der Universitätsmedizin Göttingen und nach Protokoll der Proteomics AG (Dihazi et al. 2009). Die Identifikation der zuvor gefundenen Proteine erfolgte durch die Massenspektrometrie. Ein Massenspektrometer besteht aus einer Ionenquelle, einem Analysator und einem Detektor. In der Ionenquelle werden die verdauten Proteinfragmente in eine Gasphase überführt und ionisiert. Im Analysator werden die Ionen, in einem elektrischen Feld beschleunigt, nach ihrem Verhältnis Masse zu Ladung aufgetrennt. Der Detektor erfasst die Ionen. Beim MALDI-TOF MS (*matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight Messenspektrometer*) werden die Proteinfragmente in einer Matrix kristallisiert. Die durch Laserschuss ionisierten Proteinfragmente werden durch ein Hochspannungsfeld beschleunigt und anhand ihrer Flugzeit nach Masse getrennt. Die Ionen treffen in unterschiedlichem Abstand auf den Detektor auf und so kann ihr Molekulargewicht bestimmt werden. Die Detektoren stehen am Ende der Flugröhre und fangen die entsprechenden Signale auf. Bei der TOF- Analyse gilt: je kleiner die Masse und je größer die Ladung des Ions, desto schneller fliegt es durch das Flugrohr (Hortin 2006). Anhand der Massenpeaks kann im Abgleich mit öffentlichen Proteindatenbanken das Protein identifiziert werden. Dies erfolgte mit Hilfe des Programms



Mascot peptide fingerprint, angeboten von Matrix Science und der Swiss-Prot Proteindatenbank (Perkins et al. 1999).

**Tabelle 7 Parameter zum Abgleich der MS-spektren mit der Swis-Prot Proteindatenbank**

Feld	Variable
Suchtyp	Peptide Mass Fingerprint
Enzym	Trypsin
Fixe Modifikation	Carbaminomethyl
Variable Modifikation	Oxidation
Massetyp	Monoisotopisch
Toleranz	-/+ 0,6 Da
Ladungszahl	1+
Maximal Anzahl verpasster Trypsinspaltstellen	1
MOWSE Signifikanzgrenze	55
Irrtumswahrscheinlichkeit	0,05

#### 2.2.10 Peptidsequenzanalyse mit ESI-Q-TOF MS

Die Identifizierung der Proteine wurde teilweise durch eine weitere Validierung mittels der Peptid-Sequenzanalyse Electro Spray Ionisation-Time-of-Flight Mass Spectrometry (ESI-Q-TOF MS) ergänzt. Diese Daten wurden uns freundlicherweise von der Proteomicsarbeitsgruppe der Abteilung Klinische Chemie der Universitätsmedizin Göttingen unter Leitung von Dr. Abdul Rahman Asif zur Verfügung gestellt.

### 2.2.11 1D-Western Blot

Der 1D-Western Blot dient der Übertragung von Proteinen auf eine Membran mittels Elektrophorese. Dabei werden die Proteine zunächst in Polyacrylamid-Gele anhand ihres Molekulargewichtes in Proteinbanden aufgetrennt. Anschließend wandern die Proteine durch ein elektrisches Feld vom Gel auf eine Membran. Die Proteinbanden können mit Antikörpern nachgewiesen werden. Der 1D-Westernblot erfolgte nach den Protokollen der Arbeitsgruppe Dihazi (Dihazi et al. 2009).

Die Acrylamid-Gele wurden zu diesem Zweck wie folgt selbst gefertigt:

Dichtung und Spacer wurden zwischen die Platten gelegt und mit Gelplatten zusammengeklammert und durch Einfüllen von Wasser auf Dichte überprüft. Für das Trenngel wurden 7 ml Wasser, 5 ml 1,5 M Tris-HCl, 8 ml Acrylamid/bisacryl 30 %, 200 µl 10 % SDS, 100 µl 10 % APS und 15 µl TEMED gemischt und in die Plattenkammer bis 2 cm unter den Rand gefüllt. Nach Auspolymerisation des Trenngels wurde das Sammelgel aus 15 ml Wasser, 6,3 ml 0,5 M Tris-HCl, 3,9 ml Acrylamid, 250 µl 10 % SDS, 125 µl 10 % APS und 25 µl TEMED gemischt. Anschließend wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und ein Probenkamm eingesetzt. Pro Geltasche wurden 40 µg Protein aufgetragen. Die Probenmenge wurde auf 10 µl mit Wasser aufgefüllt und anschließend mit 10 µl zweifachem Probenpuffer 10 min bei 96 °C im Schüttler denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Die gegossenen Gele wurden mit der Tasche nach innen in das Elektrophorese-Gerät eingeklemmt und mit 1x Elektrophorese-Puffer (5x Puffer: 125 mM Tris, 1,25 M Glycin, 0,5 % SDS) aufgefüllt. Anschließend wurden die Taschen beladen. Die erste Tasche mit 8 µl Marker Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope (Bio-Rad) mit Banden für 250 kDa; 150 kDa; 100 kDa; 75 kDa; 50 kDa; 37 kDa; 25 kDa; 20 kDa; 15 kDa und 10 kDa und die weiteren Taschen mit je 20 µl Probe. Danach wurde das Gel bei 150 V 10 Minuten und anschließend auf 200 V auf Eis laufen gelassen.

Fließ und Filterpapier wurden in Transferpuffer (5x Puffer: 25 mM Tris-HCl, 186 mM Glycin, 20 % Methanol) eingeweicht. Anschließend wurde das Gel auf das Filterpapier aufgebracht und mit einer Zellulosemembran, Filterpapier und Fließ abgedeckt, in die Blotbox gebracht und mit Transferpuffer aufgefüllt und über Nacht bei 40 V im Kühlraum geblottet. Nach dem Blotten wurde das Gel mit „Ponceau S Solution for electrophoresis“ gefärbt, mit 5 % Essigsäure fixiert und anschließend mit Waschpuffer (50 mM Tris, 0,5 M NaCl, 0,05 % Tween-20, pH 7,4) gewaschen, um die Proteine auf der Zellulosemembran sichtbar zu machen. Die getrockneten Blots wurden im Anschluss daran mit Blockingpuffer, einer 5%igen Milchpulverlösung bei 37 °C für 2 Stunden geschüttelt.

Um den Primärantikörper auf die Membran aufzutragen, wurden die verschiedenen Antikörper in je 5 ml Blockingpuffer aufgenommen und über Nacht bei 4° C auf die Membran gegeben.

**Tabelle 8 Antikörper in verwendeter Verdünnung**

Antikörper	Größe in kDa	Verdünnung
Amyloid-Precursor	87	1 : 500
Antithrombin III	52	1 : 13 000
Haptoglobin	39	1 : 2 000
Parvalbumin	12	1 : 1 000
Plasminogen	93	1 : 14 300
Serpin A3K	47	1 : 500

Am nächsten Tag wurde der Primärantikörper abgenommen und die Membran 3 Mal 10 Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde ebenfalls in Blockingpuffer verdünnt (1:2 000) und mindestens 2 Stunden bei 37 °C im Dunkeln auf die Membran gegeben. Anschließend wurde der Sekundärantikörper entfernt und die Membran zwei Mal 10 Minuten in Waschpuffer gewaschen, mit Stickstoff getrocknet und mit dem Fuji FLA 5100 Scanner bei 532 nm Laserlinie bei einer Intensität von 700 V gescannt.

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung erfolgte mit der Software ImageJ.

### 2.2.12 2D- Westernblot

Die Durchführung des 2D-Westernblots erfolgte, um die verschiedenen Albuminformen und Fragmente sowie eine Verminderung der Albuminausscheidung unter ACE-Hemmer Therapie zu zeigen. Anhand der Stadien nach 4,5 Wochen und nach 6 Wochen soll dies in folgenden Arbeitsschritten gezeigt werden:

Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung

Probenmengen für 150 µg Protein wurden mit Rehydratationspuffer (Urea 8 M, Chaps 1 %, DTT 15 mM, Ampholyte 0,2 %) auf 175 µl aufgefüllt und mit etwa 1 µl Bromphenolblau sichtbar gemacht. Die Probe wurde auf IPG-Streifen in einer Fokussierkammer aufgetragen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Streifen mit 2 ml Mineralöl abgedeckt. Die Fokussierkammer wurde im Fokussiergerät über Nacht für 12 Stunden bei 20 °C passiv rehydriert und anschließend die Spannung nach folgendem Schema schrittweise erhöht:

**Tabelle 9 Spannungsschritte Isoelektrische Fokussierung 2D-Westernblot**

Schritt	Voltstärke in V	Gradient	Zeit in h	Funktion
1	500	Rapid	1	Proteineintritt
2	1 000	Rapid	1	Proteineintritt
3	10 000 - 80 000	Linear	4	Fokussierung
4	10 000	Rapid	30 000 Vh	Fokussierung
5	500	Rapid	12	Step and Hold

### Zweite Dimension: Proteinauftrennung nach Molekulargewicht

Die Streifen wurden aus dem Fokussiergerät genommen und für 15 Minuten in 10 ml Äquilibrierpuffer (6 M Urea, 30 % Glycerol, 2 % SDS, 0,05 M Tris-HCl) mit 100 mg DTT und 15 Minuten in 10 ml Äquilibrierpuffer mit 400 mg Jodacetamid inkubiert. Vor dem Auftragen auf die zweite Dimension wurden die Streifen mit doppelt entionisiertem Wasser kurz abgewaschen. Die IPG Streifen wurden in Fertiggele (Criterion XT Precast Gel 12 % BIS-Tris IPG + 1 Well comb) gelegt. Als Marker dient Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope (Bio-Rad) mit Banden für 250 kDa; 150 kDa; 100 kDa; 75 kDa; 50 kDa; 37 kDa; 25 kDa; 20 kDa; 15 kDa und 10 kDa. Die Gele wurden in einer Laufeinheit mit Electrophoresepuffer (Criterion XT MOPS Running Buffer) angebracht und unter ständigem Kühlen an steigende Spannung angelegt. 150 V für 10 Minuten, 180 V für 10 Minuten und 200 V bis das Gel fertig gelaufen war.

Für den zweiten Teil des 2D-Westernblots wurde das Criterion Precast Gel System verwendet. Fließ und Filterpapier wurden in Transferpuffer (5x Puffer: 950 mM Glycine, 125g Tris, 0,25 % SDS, 29 % Methanol, 1:4 mit Wasser) eingeweicht. Anschließend wurde das Gel auf das Filterpapier aufgebracht und mit einer Zellulosemembran, Filterpapier und Fließ abgedeckt, in die Blotbox gebracht und mit Transferpuffer aufgefüllt und über Nacht bei 40 V im Kühlraum geblottet. Nach dem Blotten wurde das Gel mit Ponceau S Solution for electrophoresis gefärbt, mit 5 % Essigsäure fixiert und anschließend mit Waschpuffer gewaschen. Die getrockneten Blots wurden im Anschluss daran mit Blockingpuffer, einer 5%igen Milchpulverlösung, bei 37 °C für 2 Stunden geschüttelt.

Um den Primärantikörper aufzutragen, wurde der Anti-Albumin Antikörper in Verdünnung 1:10 000 in Blockingpuffer aufgenommen und über Nacht bei 4°C auf die Zellulosemembran gegeben. Am nächsten Tag wurde der Primärantikörper abgenommen und die Membran 3 Mal 10 Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Der Sekundärantikörper, in diesem Fall Anti-Rabbit in der Verdünnung 1:2 000 in Blockingpuffer, wurde mindestens 2 Stunden bei 37 °C im Dunkeln auf die Membran gegeben. Anschließend wurde der Sekundärantikörper entfernt und die Membran zwei Mal 10 Minuten in Waschpuffer gewaschen und anschließend mit Stickstoff getrocknet und mit dem Fuji FLA 5100 Scanner bei 532 nm Laserlinie bei einer Intensität von 400 V gescannt.

### 2.3 Methodenkritik

Urin eignet sich sehr gut zur Probengewinnung und Diagnostik. Er kann aber unter dem Einfluss von Medikamenten, Stress, Ernährung, Sperma oder durch den Monatszyklus leichte Veränderungen zeigen. 2D-Gele haben eine hohe Auflösungskraft, denn die Proteine liegen in den Formen vor, die sie gerade in der Zelle oder Flüssigkeit haben. Leider ist diese Methode sehr aufwendig und komplex und daher nicht für die Routinediagnostik geeignet. Des Weiteren sind relativ große Proteinmengen (150 µg) für ein Gel notwendig, die aus dem Urin von einer Maus nicht immer leicht zu gewinnen sind. Besonders in den Kontrollgruppen, welche keine oder sehr wenig Proteinurie haben. Ein weiteres Problem ist, dass Proteine höherer Konzentrationen die Proteine niedrigerer Konzentrationen überlagern können. Oftmals sind aber gerade die kleinen Proteine wichtig für die Diagnostik oder wichtig, um die eine gegen die andere Erkrankung abzugrenzen. Weiterhin können sehr saure oder sehr basische Proteine nicht dargestellt werden. Die 2D-Gel-Methode birgt die Gefahr, dass neben den zu untersuchenden Proteinen viele andere geladene und ungeladene Moleküle die elektrophoretische Auftrennung stören (Muller et al. 2007). Ein hoher Salzgehalt der Urinproben kann zu Problemen beim Fokussieren führen. Durch die Proteinfällung nach Wessel und Flugge können die Probenverunreinigungen durch Lipide oder Salze verhindert werden (Wessel und Flugge 1984).

Bei der MALDI-TOF Analyse werden vor allem häufige, große und bekannte Proteine von der Datenbank erkannt. Bei sehr kleinen Proteinen bereitet das Finden in Swiss-Prot Probleme.

Die potenziellen Markerkandidaten wurden anhand des Mausmodells des Alport-Syndroms entwickelt. Eine direkte Übertragung auf den Menschen kann also nicht zu 100 % gewährleistet werden, sondern muss noch weiter überprüft werden.

---

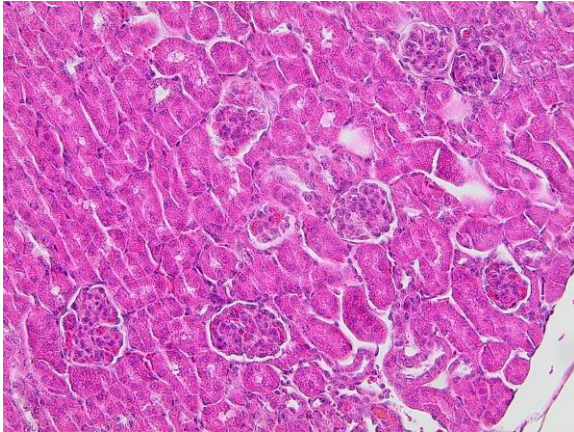
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Histologische Darstellung des Nierengewebes

Die histologischen Bilder wurden angefertigt, um einen Eindruck über den Grad der Nierenschädigung und eine mögliche Strukturverbesserung aufgrund der Therapie zu bekommen. Dazu wurden Gewebeschnitte von behandelten Mäusen (mit *Ramipril*) und unbehandelten Mäusen (ohne *Ramipril*) angefertigt und mittels Hämatoxylin-Eosin und Periodic Acid-Schiff gefärbt.

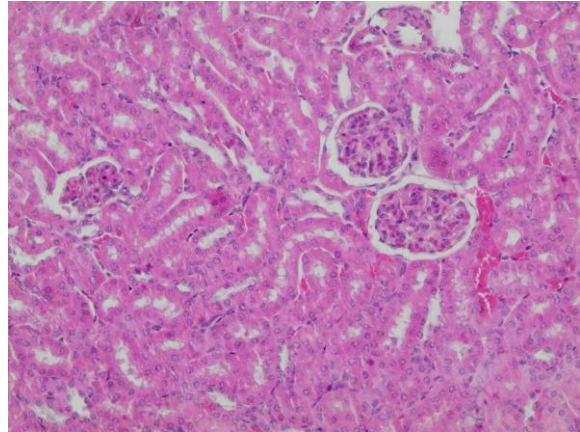
##### 3.1.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE Färbung) ist eine schnelle und einfache Färbemethode und ist daher optimal für die orientierende Übersichtsfärbung geeignet. Hämatoxylin färbt basophile Strukturen wie die DNA und den Zellkern blau. Eosin färbt azidophile Strukturen wie Proteine rot. Die HE Färbung zeigte, dass die Mäuse im 6-Wochen-Stadium keine wesentlichen histologischen Unterschiede aufweisen (Abbildung 14 und Abbildung 15). Im 7,5-Wochen-Stadium ohne *Ramipril* ist im Gegensatz zum 7,5-Wochen-Stadium mit *Ramipril* eine leichte Schrumpfung der Glomeruli zu erkennen (Abbildung 16 und Abbildung 17). Es sind herdförmige glomeruläre und tubulointerstitielle Vernarbungen und ein Lymphozyten infiltrierte Interstitium im 7,5-Wochen-Stadium zu erkennen.



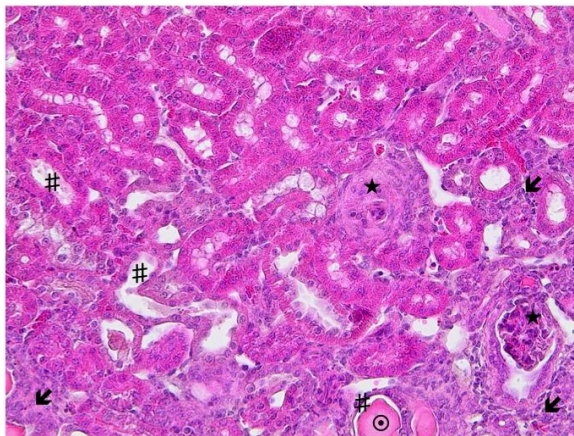
**Abbildung 14 HE-Schnitt 6 Wochen ohne Ramipril**

HE-Färbung: Zellkerne blau, Proteine rot, Glomeruli und angeschnittene Tubuli unauffällig  
20 fache Vergrößerung



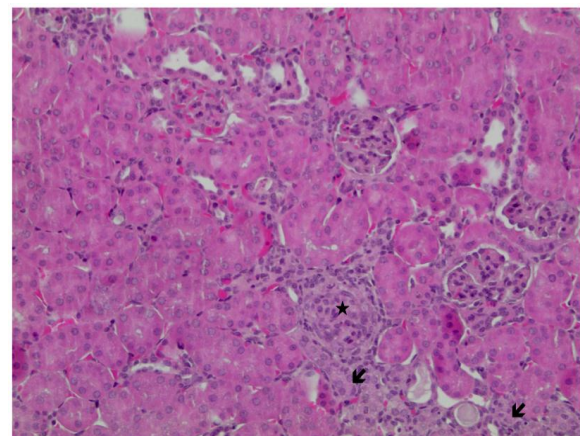
**Abbildung 15 HE-Schnitt 6 Wochen mit Ramipril**

HE-Färbung: Zellkerne blau, Proteine rot, Glomeruli und angeschnittene Tubuli unter Behandlung unverändert unauffällig  
20 fache Vergrößerung



**Abbildung 16 HE-Schnitt 7,5 Wochen ohne Ramipril**

HE-Färbung: Zellkerne blau, Proteine rot, Glomerulie beginnen zu sklerosieren (★), Tubulusepithel vereinzelt abgeflacht (#) und mit Proteinzyllindern gefüllt (⊙), Lymphozyten infiltrierte Interstitium (↙)  
20 fache Vergrößerung



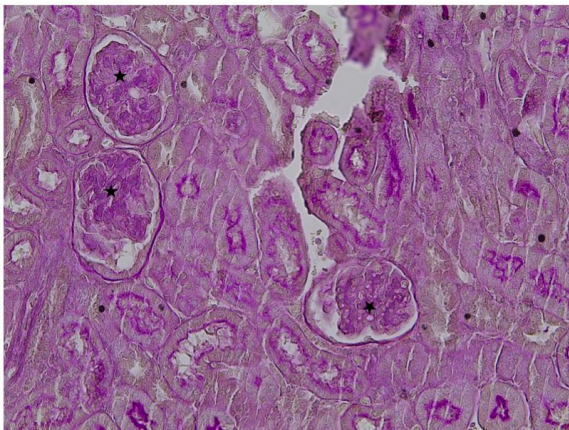
**Abbildung 17 HE-Schnitt 7,5 Wochen mit Ramipril**

HE-Färbung: Zellkerne blau, Proteine rot, kaum tubulointerstitielles Infiltrat (↙), nur ein Glomerulus beginnend sklerosiert (◻)  
20 fache Vergrößerung

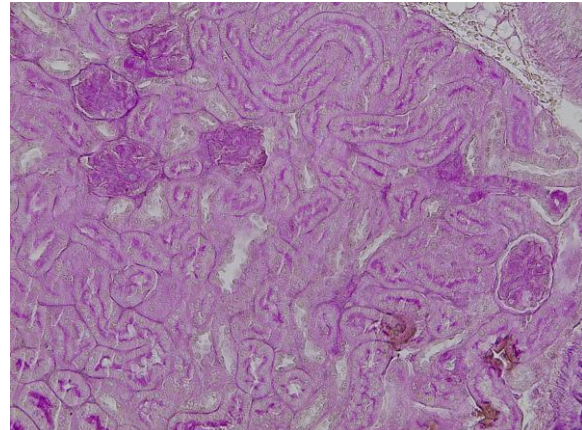


### 3.1.2 Periodic acid-Schiff-Färbung

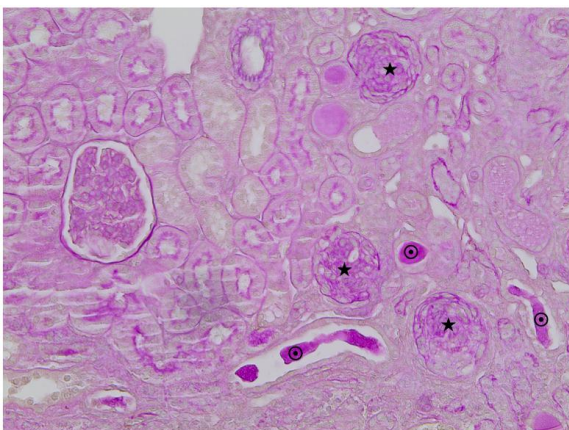
PAS ist die Abkürzung für Periodic acid-Schiff. Bei dieser Färbung werden kohlenhydrathaltige Komponenten wie Glykogen, Cellulose, neutrale Mukopolysaccharide und Glykolipide angefärbt. Die Färbung dient dazu, Kollagen, Basalmembran und Zellwand darzustellen. Hierbei werden neutrale Mucopolysaccharide magenta-rot bis pink, Zellkerne blauviolett und das Cytoplasma rosa gefärbt. Sowohl im 6-Wochen- als auch im 7,5-Wochen-Stadium ohne *Ramipril* sind Schrumpfungen der Glomeruli zu erkennen (Abbildung 18 und Abbildung 20). Der Schrumpfraum ist mit Bindegewebe ausgefüllt. In den gleichen Stadien unter *Ramipril* Therapie sind diese Schrumpfungen nicht zu finden (Abbildung 19 und Abbildung 21).



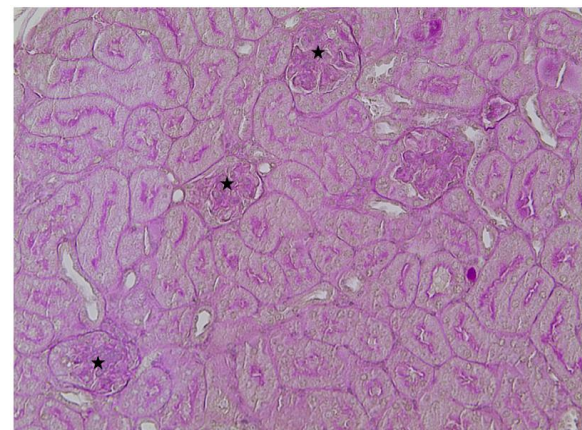
**Abbildung 18 PAS-Schnitt 6 Wochen ohne *Ramipril***  
PAS-Färbung: Färbung zur Darstellung von Kollagen, Basalmembran und Zellwand, beginnende Glomerulussklerose (◻) und tubulointerstitielle Fibrose  
20 fache Vergrößerung



**Abbildung 19 PAS-Schnitt 6 Wochen mit *Ramipril***  
PAS-Färbung: Färbung zur Darstellung von Kollagen, Basalmembran und Zellwand, Glomerulussklerose unter Therapie geringer ausgeprägt  
20 fache Vergrößerung



**Abbildung 20 PAS-Schnitt 7,5 Wochen ohne *Ramipril***  
PAS-Färbung: Färbung zur Darstellung von Kollagen, Basalmembran und Zellwand, verstärkt Glomerulussklerose (◻), einzelne Nephronen untergegangen und mit Proteinzyllindern gefüllt (⊙),  
20 fache Vergrößerung



**Abbildung 21 PAS-Schnitt 7,5 Wochen mit *Ramipril***  
PAS-Färbung: Färbung zur Darstellung von Kollagen, Basalmembran und Zellwand, Sklerosierung der Glomeruli (◻) unter Therapie weniger ausgeprägt  
20 fache Vergrößerung

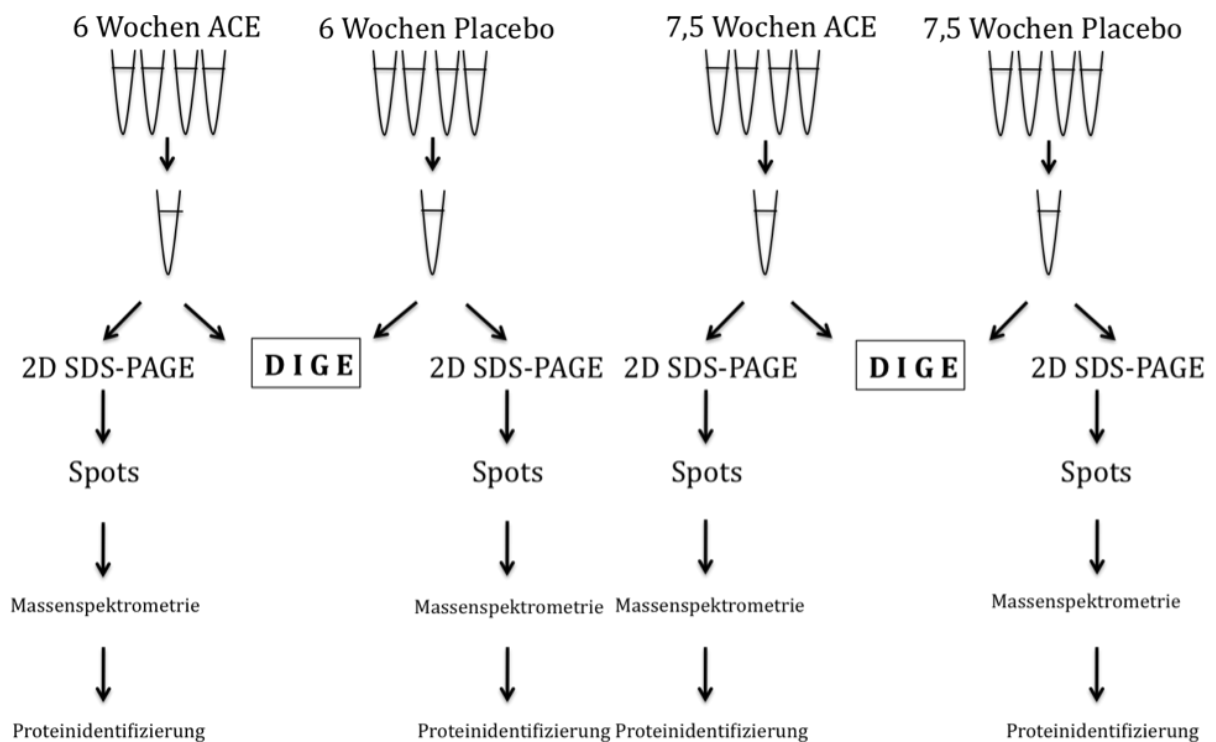


### 3.2 Aufbau und Strukturierung der Versuchsreihe

Die Proben der einzelnen Mausurin Gruppen wurden gepoolt, um die interindividuelle Variation zu reduzieren. Dabei wurden aus den vier Untersuchungsstadien

- 6 Wochen mit ACE-Hemmer
- 6 Wochen Placebo
- 7,5 Wochen mit ACE-Hemmer
- 7,5 Wochen Placebo

jeweils die gleiche Menge Mausurin zu einem Pool zusammengemischt. Dies ist ein Standardvorgehen in der Urinproteomanalyse, was in anderen Studien zuvor gezeigt wurde (Zhou et al. 2006). Aus dem jeweiligen Pool wurden 2D SDS-PAGE erstellt. Die ausgeschnittenen Spots wurden verdaut und die Proteine mittels Massenspektrometrie identifiziert. Aus jeweils zwei Proben wurde ein DIGE zur besseren Vergleichbarkeit und Quantifizierung der Ergebnisse gemacht. Zum Zweck einer besseren Ergebnisqualität wurden aus jedem Pool jeweils drei Gele reproduziert. Diese Methode benutzt man in der Discovery Phase. Die Marker wurden mittels Westernblot in einzelnen Proben validiert. Somit erfüllt der praktische Teil der Arbeit die drei Kriterien an ein Experiment Objektivierbarkeit, Reproduzierbarkeit und Validierung.



**Abbildung 22 Versuchsaufbau**

Aus dem jeweiligen Pool 6 Wochen ACE-Hemmer, 6 Wochen Placebo, 7,5 Wochen ACE-Hemmer und 7,5 Wochen Placebo wurden je mindestens drei 2D SDS-PAGE erstellt. Die ausgeschnittenen Spots wurden mittels Trypsinverdau verdaut und die Proteine mittels Massenspektrometrie identifiziert. Aus jeweils zwei Proben wurde DIGE zur besseren Vergleichbarkeit und Quantifizierung der Ergebnisse angefertigt.

### 3.3 Proteomische Charakterisierung des Urins der Alport-Syndrom - Mäuse mit resultierender Identifizierung von Proteinen als potentielle Prognosemarker

#### 3.3.1 Etablierung zweidimensionaler Proteinprofile von Alport-Mausurin mittels 2D - Gelelektrophorese

Eine Verzögerung der Niereninsuffizienz als Folge der Therapie mittels ACE-Hemmer *Ramipril* soll durch potentielle Prognosemarker nachweisbar werden. Zum Zweck der Identifizierung von neuen Urin-Proteinmarker erfolgte eine Analyse der Proteome der Urine von behandelten und unbehandelten Mäusen.

Dazu wurden 4 Gruppen definiert:

- mit ACE-Hemmer *Ramipril* behandelte Mäuse 6 Wochen nach Geburt
- mit ACE-Hemmer *Ramipril* behandelte Mäuse 7,5 Wochen nach Geburt
- unbehandelte Mäuse – Placebo 6 Wochen nach Geburt
- unbehandelte Mäuse – Placebo 7,5 Wochen nach Geburt.

Die Proteine wurden aus dem Urin präpariert und mittels 2D-Gel Elektrophorese wie im Abschnitt 2.2.3 des Material und Methoden Teils beschrieben, aufgetrennt. Die Proteinexpressionsmuster der verschiedenen Urinproben wurden mittels Delta2D software (Decodon GmbH) miteinander verglichen. Zweidimensionale Proteinkarten entstanden aus der Analyse des Urinproteoms in dem pH Bereich 4 bis 7. Mehr als 700 Proteinspots wurden in einigen Urinproben unter Verwenden von 20 000 Pixels als Filtergrenze identifiziert. Das Pixelvolumen von jedem Spot diente als Basis für den Vergleich zwischen den verschiedenen Urinproben. Die in den Abbildungen 26-29 dargestellten Gele pH 4 bis 7 geben ein repräsentatives Bild der zwei dimensional Gelelektrophoresen der Mäuse-Urin-Proteome von 6-Wochen-Placebostadium, 6-Wochen-ACE-Hemmerstadium, 7,5-Wochen-Placebostadium und 7,5-Wochen-ACE-Hemmerstadium wieder.

Auf der x-Achse ist der pH-Wert abzulesen und auf der y-Achse das Molekulargewicht in kilo Dalton (kDa). Dabei befinden sich die Proteine mit einem hohen Molekulargewicht im oberen Bereich des Gels und die Proteine mit geringem Molekulargewicht sind im unteren Bereich des Gels zu finden.

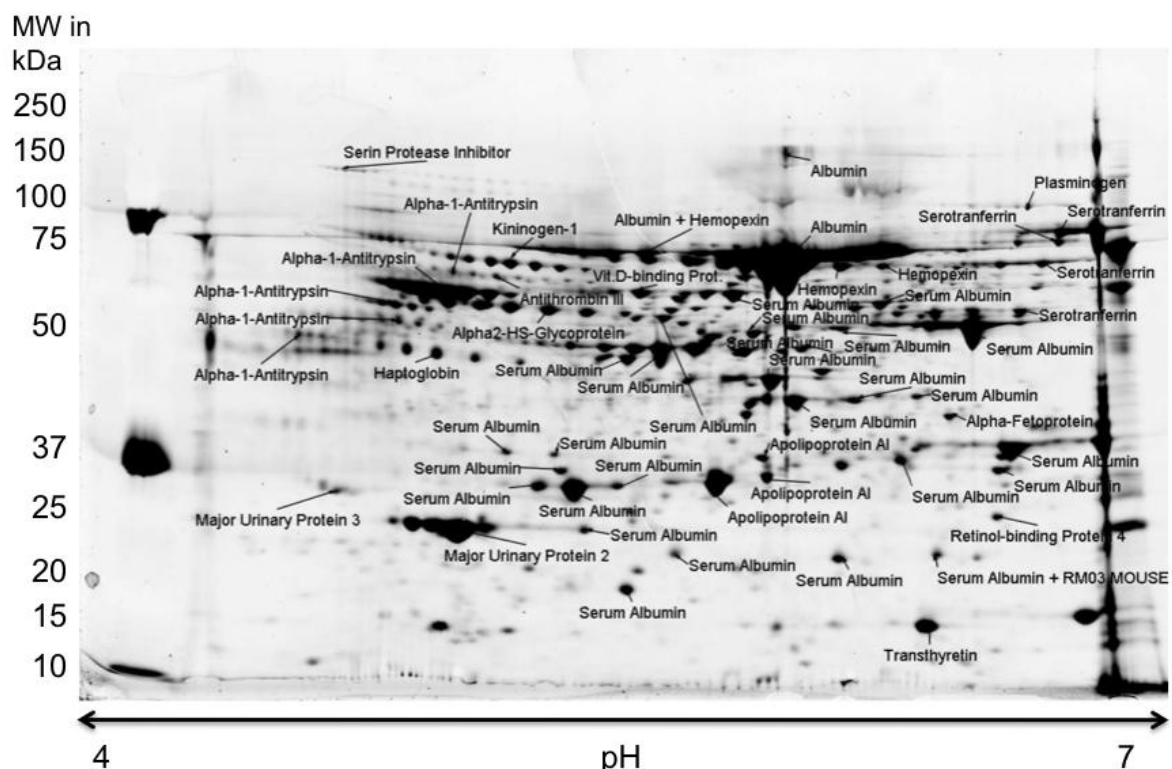
Durch posttranslationale Modifikation werden Proteine phosphoryliert oder glykosiliert und so ändert sich der pH-Wert leicht, während das Molekulargewicht gleich bleibt. Deshalb sind die gleichen Proteine an unterschiedlichen Stellen im Gel zu finden (Lee 2004). Einige Proteine sind durch Proteasen gespalten oder abgebaut, so dass sich ihre Molekularmasse ändert, der pH-Wert bleibt gleich.

Der Begriff Spot steht für ein im Gel dargestelltes Protein. Nachdem ein Überblick über das gesamte Urinproteom durch Identifizierung aller im Gel sichtbaren Proteine der Gruppe im 6-Wochen-Placebostadium verschafft wurde, wurden in den nachfolgenden Proteomprofilen nur die unterschiedlichen Spots weiter identifiziert.

### 3.3.1.1 Identifizierung der Proteine aus Mäuse-Urinproteom im 6-Wochen-Placebostadium

Mit dem Ziel, einen Einblick in die Proteine der Urinproben zu gewinnen, wurden die getrennten Proteinspots manuell aus dem frischen Gel ausgeschnitten, enzymatisch mit Trypsin gespalten und für die massenspektrometrische Analyse wie unter dem Abschnitt 2.2.7 im Material und Methoden Teil beschrieben, vorbereitet. Anschließend mittels „Applied Biosystems Voyager-DE STR time-of-flight Massenspektrometer bzw. mittels Q-TOF Ultima Global“ (Micromass, Manchester, UK) wie im Kapitel 2.2.8 bereits beschrieben, analysiert. Die anschließende Datensuche mittels Mascot ermöglichte die Identifizierung von insgesamt 60 Proteinen (Abbildung 23). Zusätzlich werden Informationen über den Proteinnamen, das Molekulargewicht, den isoelektrischen Punkt, den Wert der Übereinstimmung zwischen gemessenen und theoretisch errechneten Peptidmassen („Masse“) und die Trefferquote („Score“) angegeben.

Anhand des 2D-Gels (Abbildung 23) konnte nach 6 Wochen eine deutliche Proteinurie der unbehandelten Mäuse gezeigt werden. Neben Albumin und diversen Albuminfragmenten wurden Proteine wie Amyloid-Precursor, Serpin A3K, Haptoglobin, Parvalbumin, Antithrombin III und Plasminogen gefunden. Außerdem wurden noch Alpha 1 Antitrypsin, Hemopexin, Kininogen, Serin Protease Inhibitor, Vitamin D Binding Protein, Alpha2-HS-Glycoprotein, Alpha-Fetoprotein, Retinol-binding Protein, Serotransferrin, Tranthyretin und diverse mausspezifische Proteine nachgewiesen.



**Abbildung 23** Proteommap 6 Wochen Placebo

Mit dem Ziel, einen Einblick in die Proteine der Urinproben zu gewinnen, wurden die getrennten Proteinspots manuell aus dem frischen Gel ausgeschnitten, enzymatisch mit Trypsin gespalten und für die massenspektrometrische Analyse wie unter 2.2.7 beschrieben, vorbereitet. Anschließend mittels Applied Biosystems Voyager-DE STR time-of-flight Massenspektrometer bzw. mittels Q-TOF Ultima Global (Micromass, Manchester, UK) wie im Kapitel 2.2.8 bereits beschrieben, analysiert. Die anschließende Datensuche mittels Mascot ermöglichte die Identifizierung von insgesamt 60 Proteinen. Die Ergebnisse der Proteinidentifikation sind in der nachfolgenden **Tabelle 10** aufgelistet.

**Tabelle 10** Liste aller identifizierten Proteine aus Mäuse-Urinproteom im 6-Wochen-Placebostadium gemessen mit MALDI-TOF MS und ESI MS/MS.

Die Proteinidentifizierung erfolgte über Datenbankenvergleich. Angegeben sind: das Molekulargewicht, der isoelektrischen Punkt, der Wert der Übereinstimmung zwischen gemessenen und theoretisch errechneten Peptidmassen („Masse“) und die Trefferquote („Score“).

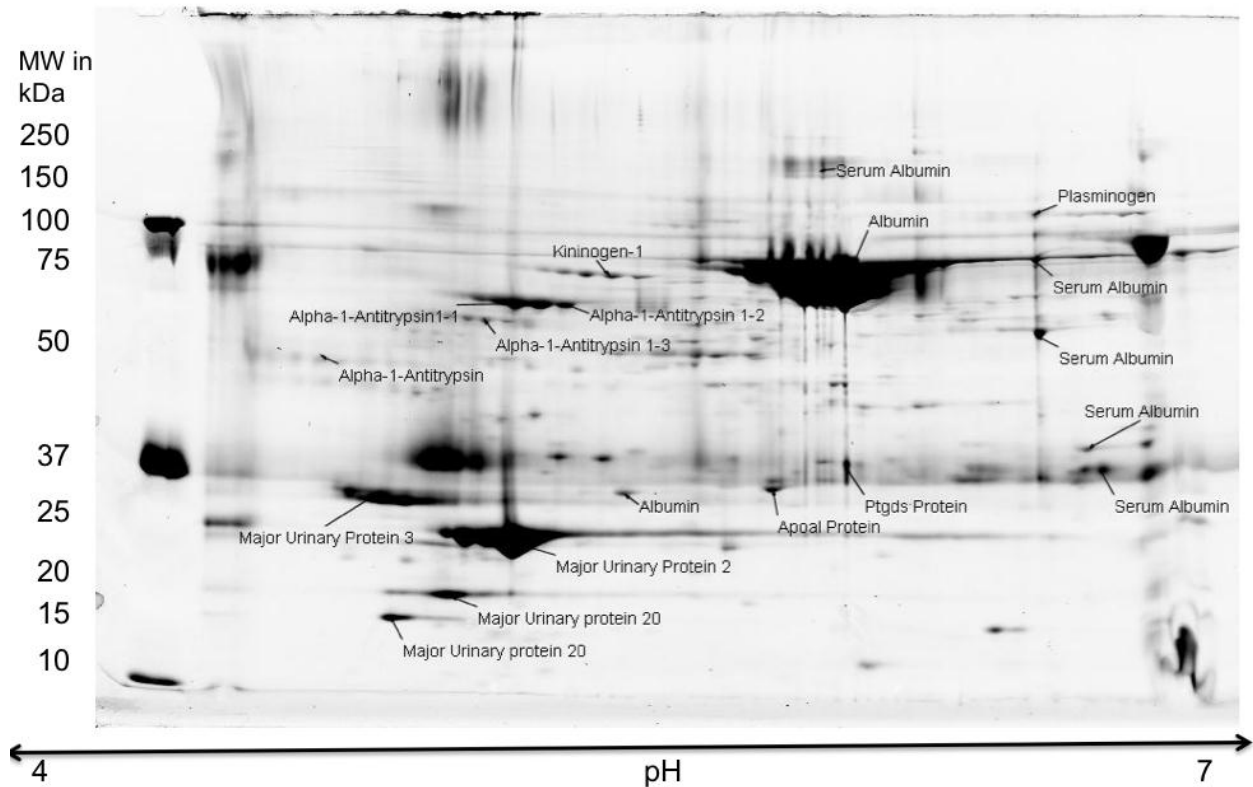
Spot-nummer	Proteinname	Genname	PMF Score	MS/MS Score	Masse	Accession	pl
1	Kininogen-1	Kng1	93		74140	KNG1 MOUSE	6,05
2	Kininogen-1	Kng1	76		74140	KNG1 MOUSE	6,05
3	Alpha-2-HS-Glycoprotein	Ahsg	93		38100	FETUA MOUSE	6,04
4	Alpha-2-HS-Glycoprotein	Ahsg	93		38100	FETUA MOUSE	6,04
5	Haptoglobin	Hpt	74		39241	gi/8850219	5,88
6	Vitamin D-binding Protein	GC	85		54647	gi/193446	5,26
7	Kallikrein-1	KLK1		97	28756	KLK1_MOUSE	4,96
8	AMBP_Mouse	Ambp		51	39004	AMBP MOUSE	5,96
9	Serum Albumin precursor	Alb	71		70700	gi/163310765	5,75
10	Serum Albumin precursor	Alb	141		70700	gi/163310765	5,75
11	Serum Albumin precursor	Alb	121		70700	gi/163310765	5,75
12	Apolipoprotein A-I	Apoa1	132		30569	APOA1 MOUSE	5,64
13	Apolipoprotein A-I	Apoa1	212		30569	APOA1 MOUSE	5,64
14	Apolipoprotein A-I	Apoa1	169		30569	APOA1 MOUSE	5,64
15	Serum Albumin	Albu	61		70700	ALBU MOUSE	5,75
16	Serum Albumin	Albu	64		70700	ALBU MOUSE	5,75
17	Serum Albumin	Albu	81		70700	ALBU MOUSE	5,75
18	Serum Albumin	Albu	56		70700	ALBU MOUSE	5,75
19	Serum Albumin	Albu	66		70700	ALBU MOUSE	5,75
20	Major Urinary Protein 2	Mup2	151		20935	MUP2 MOUSE	5,04
21	Transthyretin	Ttr		480	15880	TTHY MOUSE	5,77
22	Haptoglobin	Hpt	74		39241	gi/8850219	5,88
23	Serum Albumin	Albu	67		70700	ALBU MOUSE	5,75
24	Transthyretin	Ttr	56		15880	TTHY MOUSE	5,77
25	Serum Albumin	Albu	69		70700	ALBU MOUSE	5,75
26	Retinol-binding Protein 4	Rbp4	93		23533	RET4 MOUSE	5,96
27	Serum Albumin	Albu	90		70700	ALBU MOUSE	5,75
28	Transthyretin	Ttr		42	15880	TTHY MOUSE	5,77
29	Serum Albumin	Albu	108		70700	ALBU MOUSE	5,75
30	Amyloid Precursor Protein	Apcs	70		26401	SAMP_MOUSE	5,97
31	Alpha-Fetoprotein	Afp	116		48792	gi/191765	5,47
32	Serum Albumin	Albu	91		70700	ALBU MOUSE	5,75
33	Serum Albumin	Albu	115		70700	ALBU MOUSE	5,75
34	Serum Albumin	Albu	85		70700	ALBU MOUSE	5,75
35	Serum Albumin	Albu	145		70700	ALBU MOUSE	5,75
36	Serum Albumin	Albu	129		70700	ALBU MOUSE	5,75
37	Hemopexin	Hpx	122		52026	HEMO MOUSE	7,92
38	Serotransferrin	Tf	237		78841	TRFE MOUSE	6,94
39	ALBU_MOUSE + HEMO_MOUSE						
40	Alpha-1-antitrypsin	Serpina1a	59		46145	A1AT1 MOUSE	5,44
41	Alpha-1-Antitrypsin 1-3	Serpina1c	53		45966	A1AT3 MOUSE	5,25
42	Alpha-1-Antitrypsin 1-3	Serpina1c	68		45966	A1AT3 MOUSE	5,25
45	Serin Protease Inhibitor	Serpina3k	63		47021	SPA3K MOUSE	5,05
46	Serum Albumin	Albu	77		70700	ALBU MOUSE	5,75

47	Serum Albumin	Albu	64		70700	ALBU MOUSE	5,75
48	Serum Albumin	Albu	64		70700	ALBU MOUSE	5,75
49	Serum Albumin	Albu	56		70700	ALBU MOUSE	5,75
50	Serum Albumin	Albu	59		70700	ALBU MOUSE	5,75
51	Serum Albumin	Albu	62		70700	ALBU MOUSE	5,75
52	Serum Albumin	Albu	140		70700	ALBU MOUSE	5,75
53	Hemopexin	Hpx	95		52026	HEMO MOUSE	7,92
54	Serotransferrin	Tf	58		78841	TRFE MOUSE	6,94
55	Serotransferrin	Tf	84		78841	TRFE MOUSE	6,94
56	Serotransferrin	Tf	56		78841	TRFE MOUSE	6,94
57	Serum Albumin	Albu	64		70700	ALBU MOUSE	5,75
58	Serum Albumin	Albu	56		70700	ALBU MOUSE	5,75
59	Serum Albumin	Albu	58		70700	ALBU MOUSE	5,75
60	Alpha-1-Antitrypsin 1-3	Serpina1c	61		45966	A1AT3 MOUSE	5,25

### 3.3.1.2 Identifizierung der Proteine aus Mäuse-Urinproteom im 6-Wochen-ACE-Hemmerstadium

Mit dem Ziel, einen Einblick in die Proteine der Urinproben zu gewinnen, wurden die getrennten Proteinspots manuell aus dem frischen Gel ausgeschnitten, enzymatisch mit Trypsin gespalten und für die massenspektrometrische Analyse wie unter 2.2.7 beschrieben, vorbereitet. Dabei wurden die Spots ausgewählt, die sich im Unterschied zu den Proteomprofil 6 Wochen Placebo darstellten. Anschließend wurden sie mittels Applied Biosystems Voyager-DE STR time-of-flight Massenspektrometer bzw. mittels Q-TOF Ultima Global (Micromass, Manchester, UK) wie im Kapitel 2.2.8 bereits beschrieben, analysiert. Die anschließende Datensuche mittels Mascot ermöglichte die Identifizierung von insgesamt 39 Proteinen (Abbildung 24). Zusätzlich gibt die Tabelle 11 Informationen über den Proteinnamen, das Molekulargewicht, den isoelektrischen Punkt, den Wert der Übereinstimmung zwischen gemessenen und theoretisch errechneten Peptidmassen („Masse“) und die Trefferquote („Score“) an.

Das Proteomprofil stellt sich verändert dar (Abbildung 24). Unter der Behandlung mit dem ACE-Hemmer *Ramipril* konnte gezeigt werden, dass die Proteinurie rückläufig ist. Es tauchen weitere Mausproteine wie Major Urinary Protein 3, Major Urinary Protein 20 und Major Urinary Protein 2 auf, die zuvor bei gesunden Mäusen gezeigt wurden. Dies spricht ebenfalls dafür, dass der ACE-Hemmer die Progredienz der Erkrankung verlangsamt.



**Abbildung 24** Proteommap des 6-Wochen-ACE-Hemmerstadiums

Mit dem Ziel, einen Einblick in die Proteine der Urinproben zu gewinnen, wurden die getrennten Proteinspots manuell aus dem frischen Gel ausgeschnitten, enzymatisch mit Trypsin gespalten und für die massenspektrometrische Analyse wie unter dem Abschnitt 2.2.7 beschrieben, vorbereitet. Anschließend mittels Applied Biosystems Voyager-DE STR time-of-flight Massenspektrometrie bzw. mittels Q-TOF Ultima Global (Micromass, Manchester, UK) wie im Kapitel 2.2.8 bereits beschrieben, analysiert. Die anschließende Datensuche mittels Mascot ermöglichte die Identifizierung von insgesamt 39 Proteinen. Die Ergebnisse der Proteinidentifikation sind in der nachfolgenden **Tabelle 11** aufgelistet. Die identifizierten 39 Proteine stellen den Unterschied zum Proteomprofil 6 Wochen Placebo dar.

**Tabelle 11** Liste aller identifizierten Proteine des Mäuse-Urinproteom im 6-Wochen-ACE-Hemmerstadiums gemessen mit MALDI-TOF MS und ESI MS/MS.

Die Proteinidentifizierung erfolgte über Datenbankenvergleich. Angegeben sind: das Molekulargewicht, der isoelektrische Punkt, der Wert der Übereinstimmung zwischen gemessenen und theoretisch errechneten Peptidmassen („Masse“) und die Trefferquote („Score“).

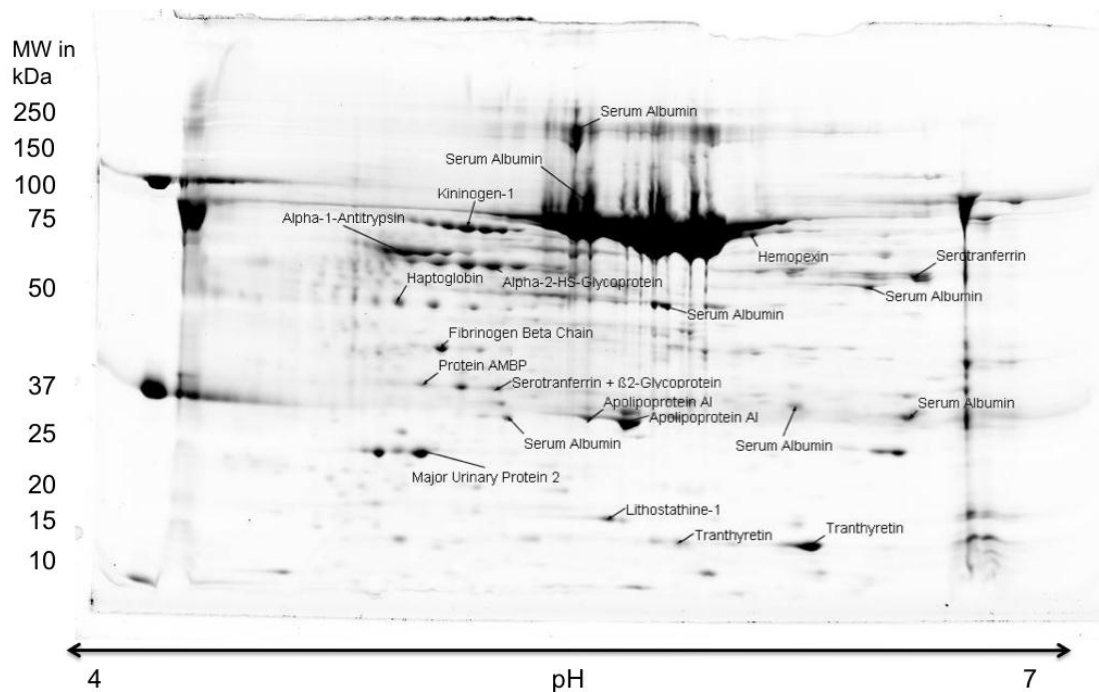
Spot-nummer	Proteinname	Genname	PMF Score	MS/MS Score	Masse	Accession	pI
1	Major Urinary Protein 20	Mup 20	127		21145	MUP20 MOUSE	4,86
2	Major Urinary Protein 20	Mup 20	102		21145	MUP20 MOUSE	4,86
3	Major Urinary Protein 3	Mup 3	97		21736	gi/ 127532	4,80
5	Serum Albumin	Alb	56		24237	gi/26986064	5,48
6	Serum Albumin	Alb	66		24237	gi/26986064	5,48
7	Serum Albumin	Alb	56		24237	gi/26986064	5,48

8	Serum Albumin	Alb	69		24237	gi/26986064	5,48
9	Alpha-1-antitrypsin 1-3	Serpina1c	141		45966	A1AT3 MOUSE	5,25
10	Alpha-1-antitrypsin 1-3	Serpina1c	67		45966	A1AT3 MOUSE	5,25
11	Serpina1b Protein	Serpina1b	72		46039	gi/18381048	5,31
12	Alpha-1-antitrypsin1-1	Serpina1a	61		46145	A1AT1 MOUSE	5,44
13	Kininogen-1 isoform 2	Kng1	105		48951	gi/12963497	5,74
14	Kininogen-1 isoform 2	Kng1	94		48951	gi/12963497	5,74
16	Alpha-1-antitrypsin 1-3	Serpina1c	56		45966	A1AT3 MOUSE	5,25
17	Alpha-1-antitrypsin 1-3	Serpina1c	63		45966	A1AT3 MOUSE	5,25
21	Transthyretin	Ttr	56		15880	TTHY MOUSE	5,77
22	Haptoglobin	Hpt		185	39241	gi/8850219	5,88
25	Serum Albumin	Alb	296		70700	ALBU MOUSE	5,75
32	Serum Albumin precursor	Alb	127		70700	gi/163310765	5,75
33	Ptgds Protein	Ptgs	70		14103	gi/23273002	6,29
34	Apoal Protein	Apoal	115		23008	gi/61402210	7,00
35	Serum Albumin precursor	Alb	92		70700	gi/163310765	5,75
37	Serum Albumin	Alb	117		70700	ALBU MOUSE	5,75
39	Plasminogen	Pl	66		93460	gi/20453845	6,21

### 3.3.1.3 Identifizierung der Proteine aus Mäuse-Urinproteom im 7,5-Wochen-Placebostadium

Mit dem Ziel, einen Einblick in die Proteine der Urinproben zu gewinnen, wurden die getrennten Proteinspots manuell aus dem frischen Gel ausgeschnitten, enzymatisch mit Trypsin gespalten und für die massenspektrometrische Analyse wie unter Abschnitt 2.2.7 beschrieben, vorbereitet. Dabei wurden die Spots ausgewählt, die sich von dem Proteomprofil des 6-Wochen-Placebostadiums unterscheiden. Anschließend wurden sie mittels Applied Biosystems Voyager-DE STR time-of-flight Massenspektrometer bzw. mittels Q-TOF Ultima Global (Micromass, Manchester, UK) wie im Kapitel 2.2.8 bereits beschrieben, analysiert. Die anschließende Datensuche mittels Mascot ermöglichte die Identifizierung von insgesamt 7 Proteinen (Abbildung 25). Zusätzlich gibt die Tabelle 12 Informationen über den Proteinnamen, das Molekulargewicht, den isoelektrischen Punkt, den Wert der Übereinstimmung zwischen gemessenen und theoretisch errechneten Peptidmassen („Masse“) und die Trefferquote („Score“) an.

Nach 7,5 Wochen konnte bei den unbehandelten Mäusen ein Fortschreiten der Proteinurie, vor allem der Albuminurie gezeigt werden (Abbildung 25). Zu erkennen ist, dass die Albuminmenge der Proben so weit zugenommen hat, dass Albumin im Gel die anderen Proteine geringer ausseht, was daran liegt, dass immer 150 µg Protein pro Gel verwendet werden und somit die Albuminmenge gegenüber den anderen Proteinen überwiegt.



**Abbildung 25** Proteommap des 7,5-Wochen-Placebostadiums

Mit dem Ziel, einen Einblick in die Proteine der Urinproben zu gewinnen, wurden die getrennten Proteinspots manuell aus dem frischen Gel ausgeschnitten, enzymatisch mit Trypsin gespalten und für die massenspektrometrische Analyse wie unter Abschnitt 2.2.7 beschrieben, vorbereitet. Anschließend mittels Applied Biosystems Voyager-DE STR time-of-flight Massenspektrometer bzw. mittels Q-TOF Ultima Global (Micromass, Manchester, UK) wie im Kapitel 2.2.8 bereits beschrieben, analysiert. Die anschließende Datensuche mittels Mascot ermöglichte die Identifizierung von insgesamt 7 Proteinen. Die Ergebnisse der Proteinidentifikation sind in der nachfolgenden **Tabelle 12** aufgelistet. Die identifizierten 7 Proteine stellen den Unterschied zum Proteomprofil des 6-Wochen-Placebostadiums dar.



**Tabelle 12** Liste aller identifizierten Proteine aus Mäuse-Urinproteom des 7,5-Wochen-Placebostadiums gemessen mit MALDI-TOF MS und ESI MS/MS.

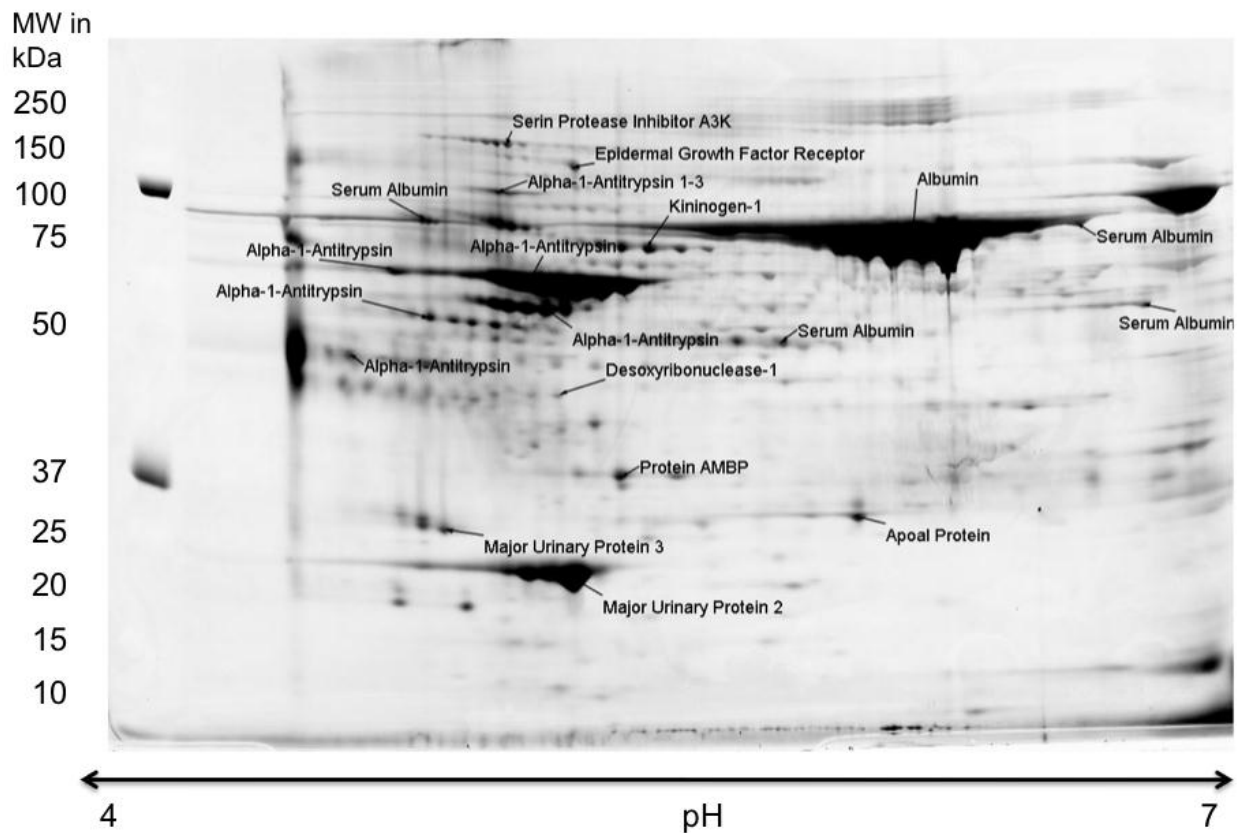
Die Proteinidentifizierung erfolgte über Datenbankenvergleich. Angegeben sind: das Molekulargewicht, der isoelektrische Punkt, der Wert der Übereinstimmung zwischen gemessenen und theoretisch errechneten Peptidmassen („Masse“) und die Trefferquote („Score“).

Spot-nummer	Proteinname	Genname	PMF Score	MS/MS Score	Masse	Accession	pI
2	Fibrinogen beta chain	Fgb	80		55402	FIBB MOUSE	6,68
3	Protein AMBP	Ambp	56		39916	AMBP MOUSE	5,96
5	Lithostatine-1	Reg1	73		18906	LIT1 MOUSE	6,08
7	Transthyretin	Ttr	68		15880	TTHY MOUSE	5,77
8	Serum Albumin	Albu	86		70700	ALBU MOUSE	5,75
10	Serotransferrin	Tf	123		78841	TRFE MOUSE	6,94
1	TRFE_MOUSE + APOH MOUSE		281				
12	Protein AMBP	Ambp			39916	AMBP MOUSE	5,96
13	Kallikrein-1	KLK1		50	28756	KLK1_MOUSE	4,96
14	Apolipoprotein A-I	Apoa1	99		30569	APOA1 MOUSE	5,64
15	Alpha-1-antitrypsin 1-3	Serpina1c			45966	A1AT3 MOUSE	5,25
16	Serum Albumin	Albu	105		70700	ALBU MOUSE	5,75
17	Serum Albumin	Albu	98		70700	ALBU MOUSE	5,75
19	Major Urinary Protein 3	Mup 3		82	21736	gi/ 127532	4,80

#### 3.3.1.4 Identifizierung der Proteine aus Mäuse-Urinproteom im 7,5 Wochen-ACE-Hemmerstadium

Mit dem Ziel, einen Einblick in die Proteine der Urinproben zu gewinnen, wurden die getrennten Proteinspots manuell aus dem frischen Gel ausgeschnitten, enzymatisch mit Trypsin gespalten und für die massenspektrometrische Analyse wie unter Abschnitt 2.2.7 beschrieben, vorbereitet. Dabei wurden die Spots ausgewählt, die sich im Unterschied zu den Proteomprofil 6 Wochen ACE-Hemmer darstellten. Anschließend wurden sie mittels Applied Biosystems Voyager-DE STR time-of-flight Massenspektrometer bzw. mittels Q-TOF Ultima Global (Micromass, Manchester, UK) wie im Kapitel 2.2.8 bereits beschrieben, analysiert. Die anschließende Datensuche mittels Mascot ermöglichte die Identifizierung von insgesamt 13 Proteinen (Abbildung 26). Zusätzlich gibt die Tabelle 13 Informationen über den Proteinnamen, das Molekulargewicht, den isoelektrischen Punkt, den Wert der Übereinstimmung zwischen gemessenen und theoretisch errechneten Peptidmassen („Masse“) und die Trefferquote („Score“) an.

Auch bei den 7,5 Wochen behandelten Mäusen zeigt sich eine geringere Proteinurie (Abbildung 26). Die Albuminmenge verringert sich, sie überlagert jedoch weiterhin die anderen Proteine.



**Abbildung 26** Proteommap des 7,5-Wochen-ACE-Hemmerstadiums

Mit dem Ziel, einen Einblick in die Proteine der Urinproben zu gewinnen, wurden die getrennten Proteinspots manuell aus dem frischen Gel ausgeschnitten, enzymatisch mit Trypsin gespalten und für die massenspektrometrische Analyse wie unter Abschnitt 2.2.7 beschrieben, vorbereitet. Anschließend mittels Applied Biosystems Voyager-DE STR time-of-flight Massenspektrometer bzw. mittels Q-TOF Ultima Global (Micromass, Manchester, UK) wie im Kapitel 2.2.8 bereits beschrieben, analysiert. Die anschließende Datensuche mittels Mascot ermöglichte die Identifizierung von insgesamt 8 Proteinen. Die Ergebnisse der Proteinidentifikation sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet. Die identifizierten 8 Proteine stellen den Unterschied zum Proteomprofil des 6- Wochen-ACE-Hemmerstadiums dar.

**Tabelle 13** Liste aller identifizierten Proteine aus Mäuse-Urinproteom des 7,5-Wochen-ACE-Hemmerstadiums gemessen mit MALDI-TOF MS und ESI MS/MS.

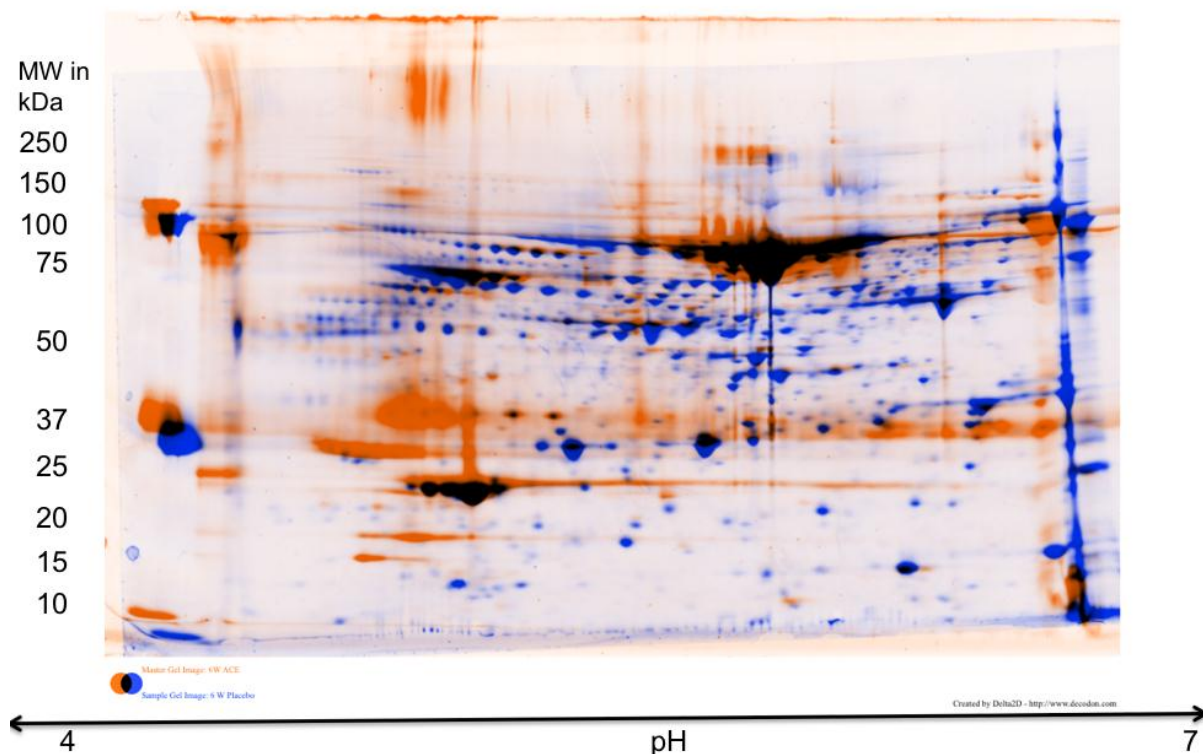
Die Proteinidentifizierung erfolgte über Datenbankenvergleich. Angegeben sind: das Molekulargewicht, der isoelektrische Punkt, der Wert der Übereinstimmung zwischen gemessenen und theoretisch errechneten Peptidmassen („Maasse“) und die Trefferquote („Score“).

Spot-nummer	Proteinname	Genname	PMF Score	MS/MS Score	Masse	Accession	pI
1	Serin Protease Inhibitor A3K	Serpina3k	95		47021	SPA3K MOUSE	5,05
2	Serin Protease Inhibitor A3K	Serpina3k	122		47021	SPA3K MOUSE	5,05
3	Epidermal Growth Factor Receptor	Egfr	92			EGFR MOUSE	6,46
4	Alpha-1-Antitrypsin 1-3	Serpina1c	56		45966	A1AT3 MOUSE	5,25
6	Alpha-1-Antitrypsin 1-3	Serpina1c	56		45966	A1AT3 MOUSE	5,25
7	Alpha-1-Antitrypsin 1-3	Serpina1c	83		45966	A1AT3 MOUSE	5,25
9	Alpha-1-Antitrypsin 1-3	Serpina1c	58		45966	A1AT3 MOUSE	5,25
10	Desoxyribonuclease-1	Dnase1	56		32235	DNAS1 MOUSE	4,8

### 3.3.2 Auswertung der 2D-Gel-Elektrophorese

Die Überlappung der 2D-Gele wurde mittel des Programms Decodon Delta 2 D durchgeführt und dient dazu, Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Proteomprofile darzustellen. Dabei steht die Farbe blau für unbehandelte Mäuse, die Farbe orange für Mäuse, die mit ACE-Hemmer behandelt wurden. Die schwarzen Bereiche zeigen die Übereinstimmung zwischen den beiden verglichenen Gelen. Anhand der Überlappung der Gele wurde entschieden, welche Spots ausgestochen und verdaut werden sollten. Nachdem alle Spots des Proteomprofils im 6-Wochen-Placebostadium identifiziert wurden, wurden in den nachfolgenden Proteomprofilen nur die zu diesem unterschiedlichen Spots weiter untersucht und identifiziert. Die Proteomprofile der Mäuse unter Behandlung zeigen qualitativ eine verminderte Ausscheidung der Proteine verglichen zu den Proteomprofilen der unbehandelten Kontrollgruppe (Abbildung 27 und Abbildung 28).

#### 3.3.2.1 Vergleich der Proteomprofile im 6-Wochen-Placebostadium mit 6-Wochen-ACE-Hemmerstadium

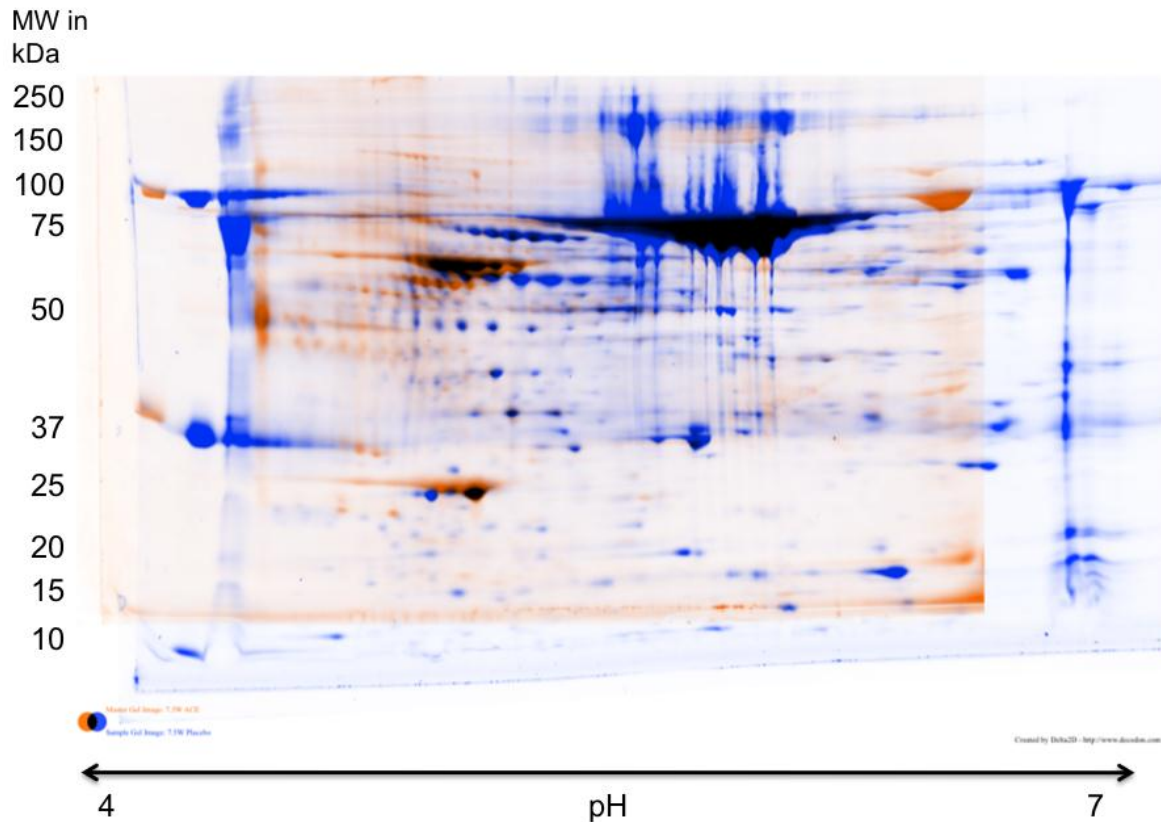


#### **Abbildung 27 Überlappung der Proteomprofile der 6-Wochen-Placebo- und 6-Wochen-ACE-Hemmerstadien**

Die Überlappung der 2D-Gele wurde mittel des Programms Decodon Delta 2 D durchgeführt und dient dazu, Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Proteomprofile im 6-Wochen-Stadium darzustellen. Dabei steht die Farbe blau für unbehandelte Mäuse, die Farbe orange für Mäuse, die mit ACE-Hemmer behandelt wurden. Die schwarzen Bereiche zeigen die Übereinstimmung zwischen den beiden verglichenen Gelen. Ein Zeichen, dass die ACE-Hemmer Therapie zu einer Verbesserung der Nierenfunktion führt, ist, dass mehr blaue als orange Spots zu sehen sind.

### 3.3.2.2 Vergleich der Proteomprofile im 7,5-Wochen-Placebostadium mit 7,5-Wochen-ACE-Hemmerstadium

Die Proteomprofile der Mäuse unter Behandlung zeigen qualitativ ein verminderte Ausscheidung der Proteine verglichen zur unbehandelten Kontrollgruppe (Abbildung 27 und Abbildung 28).

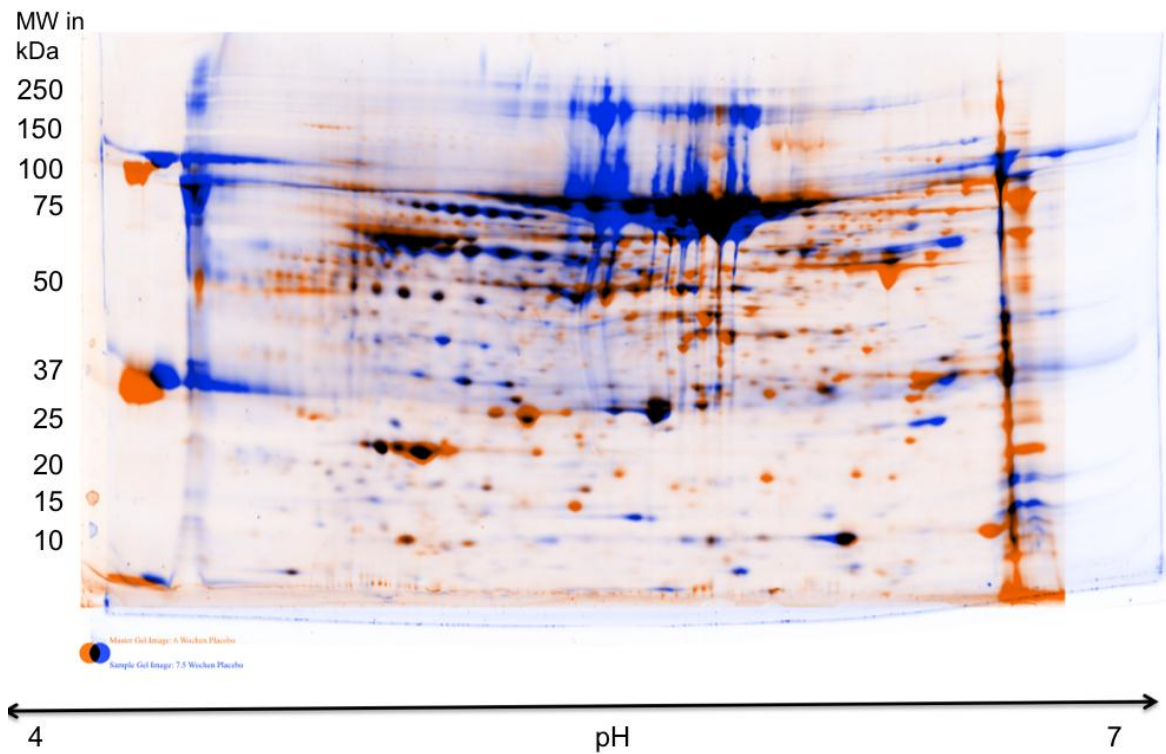


#### **Abbildung 28 Überlappung der Proteomprofile der 7,5-Wochen-Placebo- und 7,5-Wochen-ACE-Hemmerstadien**

Die Überlappung der 2D-Gele wurde mittel des Programms Decodon Delta 2 D durchgeführt und dient dazu, Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Proteomprofile im 7,5-Wochen-Stadium darzustellen. Dabei steht die Farbe blau für unbehandelte Mäuse, die Farbe orange für Mäuse, die mit ACE-Hemmer behandelt wurden. Die schwarzen Bereiche zeigen die Übereinstimmung zwischen den beiden verglichenen Gelen. Ein Zeichen, dass die ACE-Hemmer Therapie zu einer Verbesserung der Nierenfunktion führt, ist, dass mehr blaue als orange Spots zu sehen sind.

### 3.3.2.3 Vergleich der Proteomprofile im 6-Wochen-Placebostadium mit 7,5-Wochen-Placebostadium

Ohne Therapie schreitet die Erkrankung und die Proteinurie weiter fort (Abbildung 29). Da vor allem im späteren Stadium die Albuminurie sehr stark zunimmt überlagert das Albumin die kleineren Proteine.



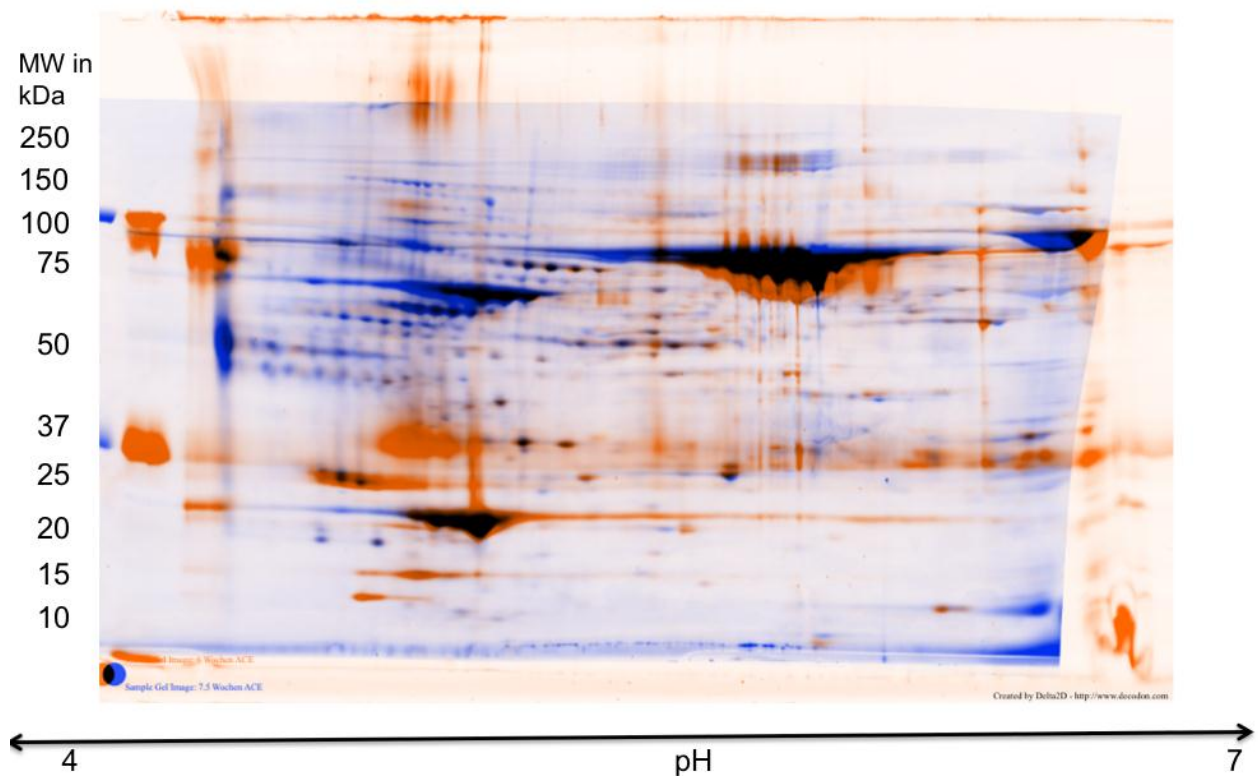
#### Abbildung 29 Überlagerung der Proteomprofile der 6-Wochen-Placebo- und 7,5-Wochen-Placebostadien

Die Überlagerung der 2D-Gele wurde mittels des Programms Decodon Delta 2 D durchgeführt und dient dazu, Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Proteomprofile der unbehandelten Mäuse darzustellen. Dabei steht die Farbe blau für unbehandelte Mäuse im 6-Wochen-Stadium, die Farbe orange für Mäuse im 7,5-Wochen-Stadium. Die schwarzen Bereiche zeigen die Übereinstimmung zwischen den beiden verglichenen Gelen. Ein Zeichen, dass die ACE-Hemmer Therapie zu einer Verbesserung der Nierenfunktion führt, ist, dass mehr blaue als orange Spots zu sehen sind.



### 3.3.2.4 Vergleich der Proteomprofile im 6-Wochen-ACE-Hemmerstadium mit 7,5-Wochen-ACE-Hemmerstadium

Der Vergleich der Proteomprofile der Mäuse in den behandelten Stadien zeigt besonders im 6-Wochen-Stadium einen vermehrten Rückgang von Proteinen gegenüber dem 7,5-Wochen-Stadium (Abbildung 30). Auch die Mausproteine, die sonst bei gesunden Mäusen zu finden sind, tauchen im 6-Wochen-Stadium wieder auf, im 7,5-Wochen-Stadium sind sie nur noch sehr schwach zu sehen. Dies spricht dafür, dass trotz Behandlung die Erkrankung und somit die Proteinurie weiter fortschreitet.



**Abbildung 30** Überlagerung der Proteomprofile der 6-Wochen-ACE-Hemmer- und 7,5-Wochen-ACE-Hemmerstadien

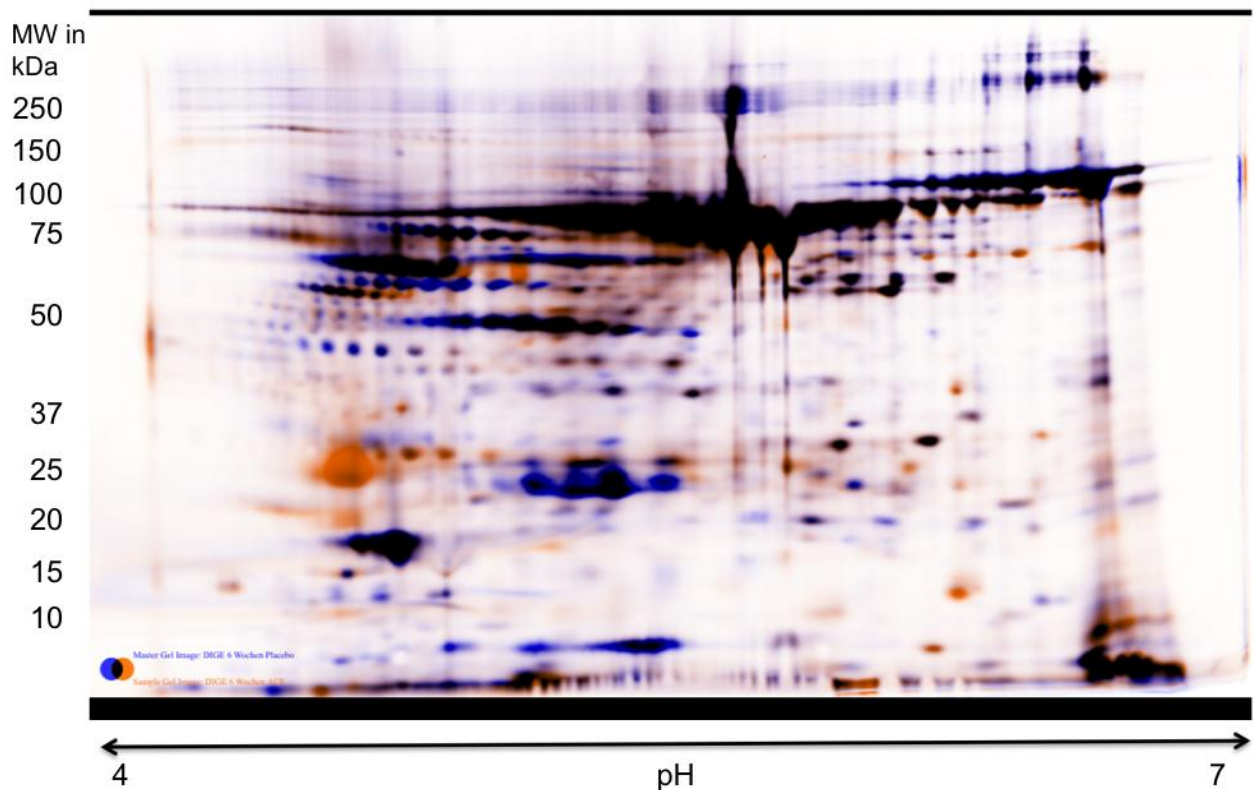
Die Überlagerung der 2D-Gele wurde mittel des Programms Decodon Delta 2 D durchgeführt und dient dazu, Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Proteomprofile der behandelten Mäuse darzustellen. Dabei steht die Farbe blau für behandelte Mäuse im 6-Wochen-Stadium, die Farbe orange für Mäuse im 7,5-Wochen-Stadium. Die schwarzen Bereiche zeigen die Übereinstimmung zwischen den beiden verglichenen Gelen. Ein Zeichen, dass die ACE-Hemmer Therapie zu einer Verbesserung der Nierenfunktion führt, ist, dass mehr blaue als orange Spots zu sehen sind.

### 3.4 Proteomprofile der DIGE der Urinproben

Bei der DIGE Untersuchung der Proben sollen die Unterschiede und Gemeinsamkeiten der einzelnen Stadien noch deutlicher dargestellt werden, da bei diesem Verfahren zwei Proben in dem gleichen Gel untersucht worden sind. Die Erstellung des DIGE-Gels erfolgte wie im Kapitel 2.2.4 beschrieben. Des Weiteren dienen die DIGE Gele dazu, die Proben zu quantifizieren und ihre Reproduzierbarkeit zu zeigen.

Die Farbe orange stellt das Urinproteom der behandelten Mäuse dar, während das Urinproteom der unbehandelten Mäuse blau dargestellt wird. Schwarz zeigt die Übereinstimmung zwischen bei den Gelen.

#### 3.4.1 Vergleich der Proteomprofile im 6-Wochen-Placebostadium mit 6-Wochen-ACE-Hemmerstadium

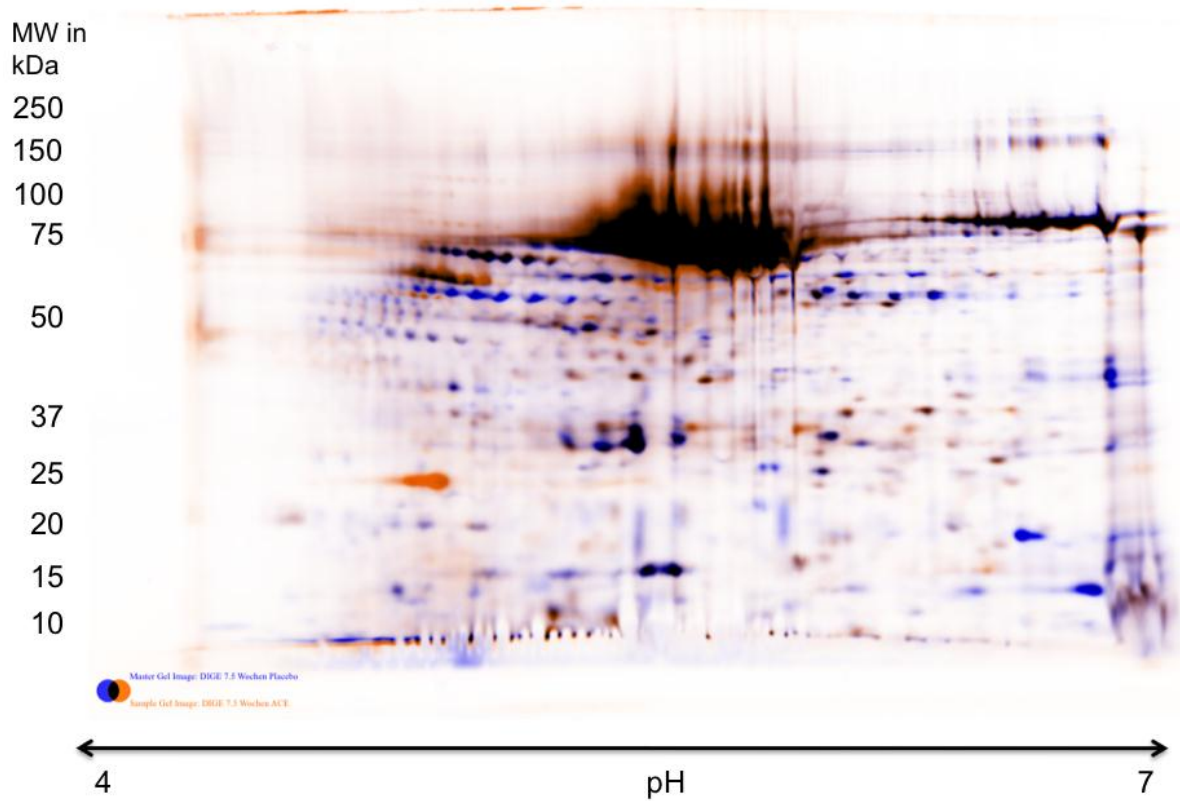


**Abbildung 31 Proteomprofil der 6-Wochen-Placebo- und 6-Wochen-ACE-Hemmerstadien**

Die Erstellung des DIGE-Gels erfolgte wie im Kapitel 2.2.4 beschrieben. Die Proteine wurden mit fluoreszierenden Farbstoffen gekoppelt. Nach der SDS-PAGE und dem Einscannen wurde ein Farbcode festgelegt: In dem DIGE-Gel sind die Proteine des 6-Wochen-Placebostadiums blau und die Proteine des 6-Wochen-ACE-Hemmerstadiums orange dargestellt. Sind Proteine der beiden Gruppen identisch sind sie schwarz dargestellt. Es sind einige orange Proteine im 2D-Gel auffällig, die nur im 6-Wochen-ACE-Hemmerstadium vorhanden sind.

### 3.4.2 Vergleich der Proteomprofile im 7,5-Wochen-Placebostadium mit 7,5-Wochen-ACE-Hemmerstadium

Im 7,5-Wochen-Stadium zeigt sich eine verstärkte Ausscheidung von Albumin. Auch andere Proteine sind unter Therapie schwächer zu sehen, als zuvor ohne Behandlung.



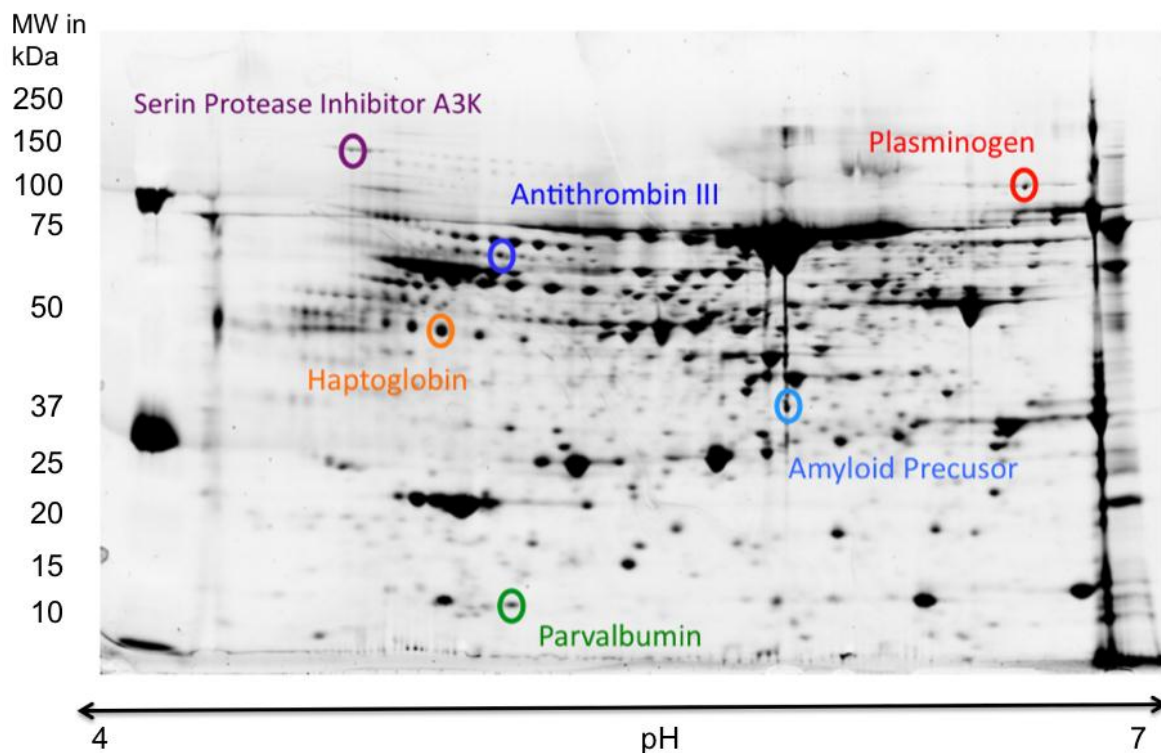
#### **Abbildung 32 Proteomprofil der 7,5-Wochen-Placebo- und 7,5-Wochen-ACE-Hemmerstadien**

Die Erstellung des DIGE-Gels erfolgte wie im Kapitel 2.2.4 beschrieben. Die Proteine wurden mit fluoreszierenden Farbstoffen gekoppelt. Nach der SDS-PAGE und dem Einscannen wurde ein Farbcode festgelegt: In dem DIGE-Gel sind die Proteine des 7,5-Wochen-Placebostadiums blau, die Proteine des 7,5-Wochen-ACE-Hemmerstadiums orange dargestellt. Sind Proteine der beiden Gruppen identisch, sind sie schwarz dargestellt.



### 3.5 Statistische Auswertung der 2D-Gele

Mit dem Programm Decodon 2D wurden die Spots aller Proteine identifiziert und quantifiziert. Die Tabelle der Quantifizierung aller Spots ist im Anhang dieser Arbeit zu finden. Anhand bislang unveröffentlichter Forschungsergebnisse unserer Arbeitsgruppe stellten sich die Proteine Amyloid Precursor, Antithrombin III, Haptoglobin, Parvalbumin, Plasminogen und Serpin A3K als wesentliche Unterschiede zwischen gesunden und knockout Mäusen dar. Um zu untersuchen, ob diese Proteine auch als Prognosemarker bei der ACE-Hemmer Therapie mit *Ramipril* infrage kommen, wurden sie weiter untersucht. Diese sechs Proteine stellten sich ebenfalls in der Discovery Phase als Unterschiede in den Proteomprofilen der behandelten und unbehandelten Mäuse dar.

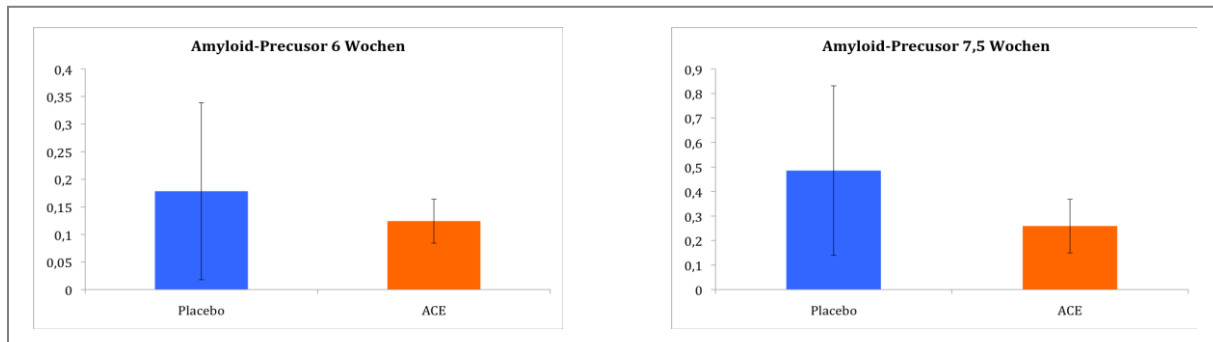


#### Abbildung 33 Proteomprofil mit markierten Spots

Die getrennten Proteinspots wurden manuell aus dem frischen Gel ausgeschnitten, enzymatisch mit Trypsin gespalten und für die massenspektrometrische Analyse wie unter Abschnitt 2.2.7 beschrieben, vorbereitet. Anschließend wurden sie mittels Applied Biosystems Voyager-DE STR time-of-flight Massenspektrometer bzw. mittels Q-TOF Ultima Global (Micromass, Manchester, UK) wie im Kapitel 2.2.8 beschrieben, analysiert. Die anschließende Datensuche mittels Mascot ermöglichte die Identifizierung der Proteine. Die sechs markierten Proteine stellen die Unterschiede zu den zuvor untersuchten Proteomprofilen dar.

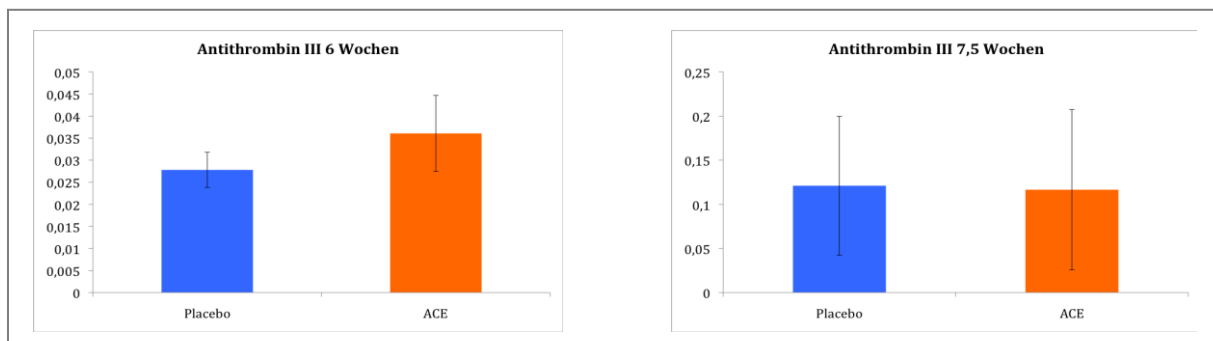
### 3.5.1 Vergleich Placebo und ACE-Hemmer im 6- und 7,5-Wochen-Stadium

Im Folgenden werden die normierten Spotvolumen dieser sechs Proteine graphisch dargestellt. Dabei steht der Vergleich von behandelten und unbehandelten Mäusen im 6-Wochen-Stadium und 7,5-Wochen-Stadium im Vordergrund. Die Farbe blau stellt das normierte Spotvolumen ohne Behandlung dar, orange das normierte Spotvolumen unter Behandlung. Das Verhältnis aus dem Quotient der Mittelwerte ergibt die relativen Expressionsunterschiede. Bei einer signifikanten Proteinregulation gilt ein Quotient der normierten Spotintensität von  $< 0.5$  und bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$ .



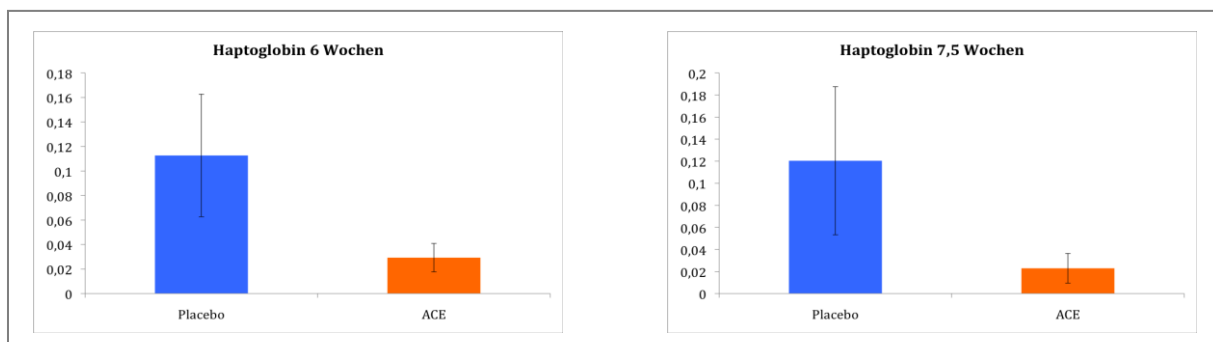
**Abbildung 34** Darstellung der Expressionsunterschiede von Amyloid-Precursor mit und ohne Behandlung im 6-Wochen- und 7,5-Wochen-Stadium.

Aufgetragen sind die Mittelwerte der normierten Spotvolumen und per Whisker die jeweilige Standardabweichung. Das normierte Spotvolumen für ACE-Hemmer liegt gegenüber Placebo im 6-Wochen-Stadium um 30 % niedriger; im 7,5-Wochen-Stadium um 47 % niedriger.



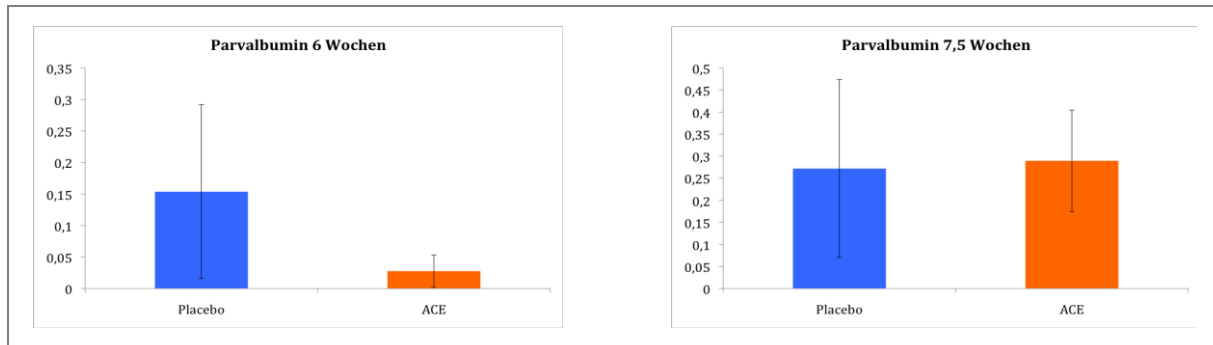
**Abbildung 35** Darstellung der Expressionsunterschiede von Antithrombin III mit und ohne Behandlung im 6-Wochen- und 7,5-Wochenstadium.

Aufgetragen sind die Mittelwerte der normierten Spotvolumen und per Whisker die jeweilige Standardabweichung. Das normierte Spotvolumen für ACE-Hemmer liegt gegenüber Placebo im 6-Wochen-Stadium um 74 % höher; im 7,5-Wochen-Stadium um 4 % niedriger.



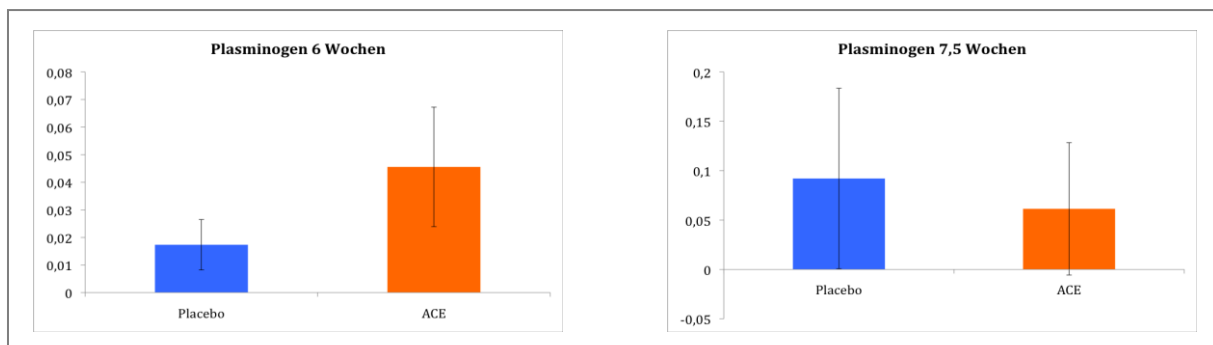
**Abbildung 36** Darstellung der Expressionsunterschiede von Haptoglobin mit und ohne Behandlung im 6-Wochen- und 7,5-Wochen-Stadium.

Aufgetragen sind die Mittelwerte der normierten Spotvolumen und per Whisker die jeweilige Standardabweichung. Das normierte Spotvolumen für ACE-Hemmer liegt gegenüber Placebo im 6-Wochen-Stadium 74 % niedriger; im 7,5-Wochen-Stadium 81 % niedriger.



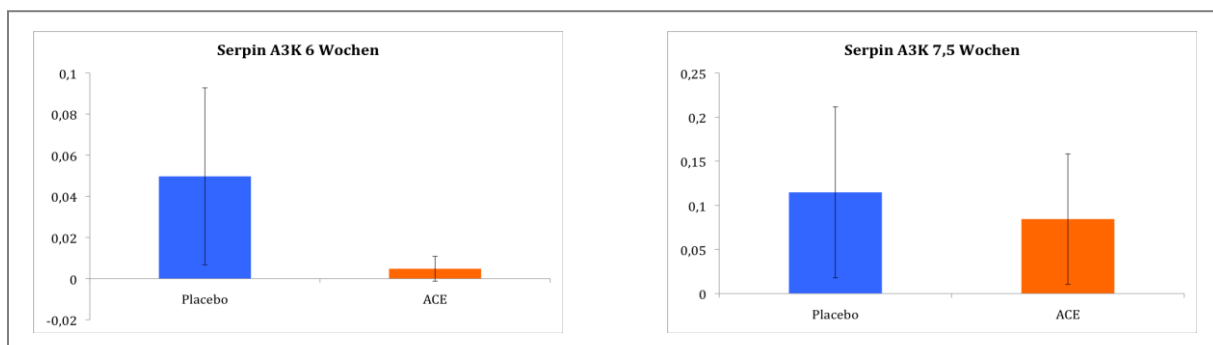
**Abbildung 37** Darstellung der Expressionsunterschiede von Parvalbumin mit und ohne Behandlung im 6-Wochen- und im 7,5-Wochen-Stadium.

Aufgetragen sind die Mittelwerte der normierten Spotvolumen und per Whisker die jeweilige Standardabweichung. Das normierte Spotvolumen für ACE-Hemmer liegt gegenüber Placebo im 6-Wochen-Stadium 82 % um niedriger; im 7,5-Wochen-Stadium um 6 % höher.



**Abbildung 38** Darstellung der Expressionsunterschiede von Plasminogen mit und ohne Behandlung im 6-Wochen- und im 7,5-Wochen-Stadium.

Aufgetragen sind die Mittelwerte der normierten Spotvolumen und per Whisker die jeweilige Standardabweichung. Das normierte Spotvolumen für ACE-Hemmer liegt gegenüber Placebo im 6-Wochen-Stadium um 163 % höher; im 7,5-Wochen-Stadium um 33 % niedriger.

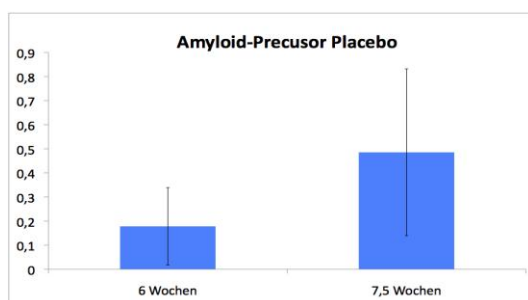


**Abbildung 39** Darstellung der Expressionsunterschiede von Serpin A3K mit und ohne Behandlung im 6-Wochen- und 7,5-Wochen-Stadium.

Aufgetragen sind die Mittelwerte der normierten Spotvolumen und per Whisker die jeweilige Standardabweichung. Das normierte Spotvolumen für ACE-Hemmer liegt gegenüber Placebo im 6-Wochen-Stadium um 90 % niedriger; im 7,5-Wochen-Stadium um 26 % niedriger.

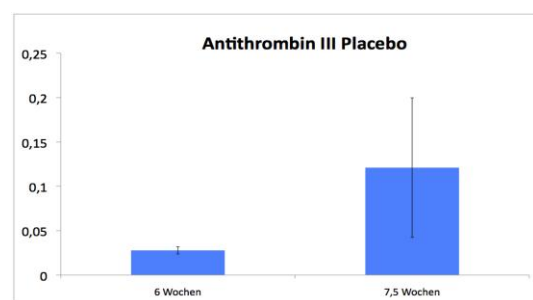
### 3.5.2 Vergleich Placebo im 6-Wochen- und 7,5-Wochen-Stadium

Im Folgenden werden die normierten Spotvolumen dieser sechs Proteine grafisch dargestellt. Dabei steht der Vergleich unbehandelter Mäuse des 6-Wochen-Stadiums mit dem 7,5-Wochen-Stadium im Vordergrund. Das Verhältnis aus dem Quotient der Mittelwerte ergibt die relativen Expressionsunterschiede. Bei einer signifikanten Proteinregulation gilt ein Quotient der normierten Spotintensität von  $< 0.5$  und bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$ .



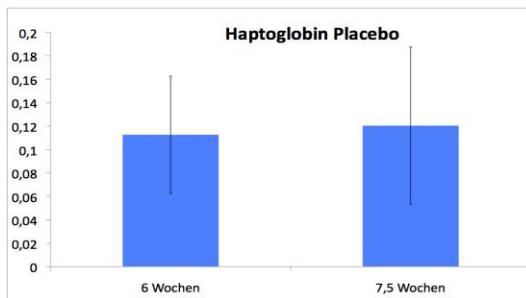
**Abbildung 40** Darstellung der Expressionsunterschiede von Amyloid-Precursor ohne Behandlung im 6-Wochen- und 7,5-Wochen-Stadium.

Aufgetragen sind die Mittelwerte der normierten Spotvolumen und per Whisker die jeweilige Standardabweichung. Das normierte Spotvolumen im 7,5-Wochen-Stadium steigt gegenüber dem des 6-Wochen-Stadiums um 172 %.



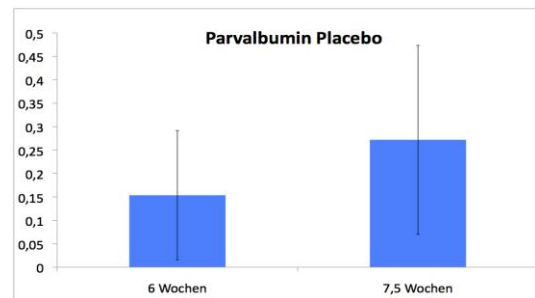
**Abbildung 41** Darstellung der Expressionsunterschiede von Antithrombin III ohne Behandlung im 6-Wochen- und 7,5-Wochen-Stadium.

Aufgetragen sind die Mittelwerte der normierten Spotvolumen und per Whisker die jeweilige Standardabweichung. Das normierte Spotvolumen im 7,5-Wochen-Stadium steigt gegenüber dem des 6-Wochen-Stadiums um 335 %.



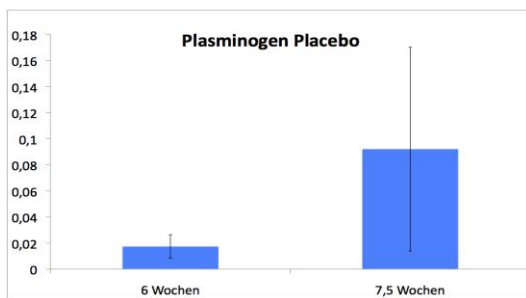
**Abbildung 42** Darstellung der Expressionsunterschiede von Haptoglobin ohne Behandlung im 6-Wochen- und 7,5-Wochen-Stadium.

Aufgetragen sind die Mittelwerte der normierten Spotvolumen und per Whisker die jeweilige Standardabweichung. Das normierte Spotvolumen im 7,5-Wochen-Stadium steigt gegenüber dem des 6-Wochen-Stadiums um 7 %.



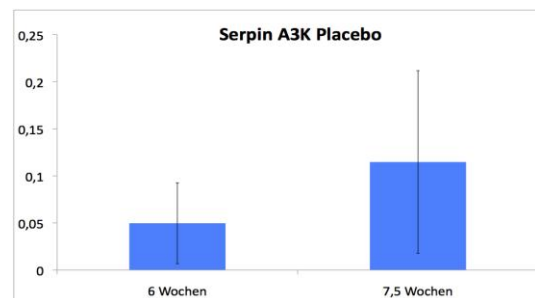
**Abbildung 43** Darstellung der Expressionsunterschiede von Parvalbumin ohne Behandlung im 6-Wochen- und 7,5-Wochen-Stadium.

Aufgetragen sind die Mittelwerte der normierten Spotvolumen und per Whisker die jeweilige Standardabweichung. Das normierte Spotvolumen im 7,5-Wochen-Stadium steigt gegenüber dem des 6-Wochen-Stadiums um 77 %.



**Abbildung 45** Darstellung der Expressionsunterschiede von Plasminogen ohne Behandlung im 6 und 7,5 Wochen Stadium.

Aufgetragen sind die Mittelwerte der normierten Spotvolumen und per Whisker die jeweilige Standardabweichung. Das normierte Spotvolumen im 7,5-Wochen-Stadium steigt gegenüber dem des 6-Wochen-Stadiums um 431 %.

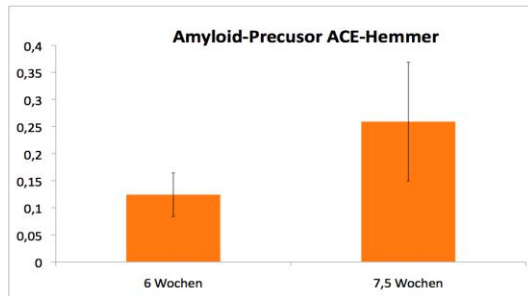


**Abbildung 44** Darstellung der Expressionsunterschiede von Antithrombin ohne Behandlung im 6 und 7,5 Wochen Stadium.

Aufgetragen sind die Mittelwerte der normierten Spotvolumen und per Whisker die jeweilige Standardabweichung. Das normierte Spotvolumen im 7,5-Wochen-Stadium steigt gegenüber dem des 6-Wochen-Stadiums um 131 %.

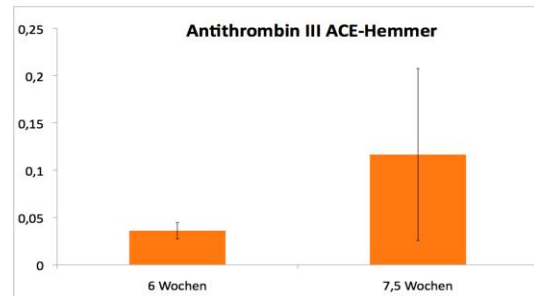
### 3.5.3 Vergleich ACE-Hemmer im 6-Wochen- und 7,5-Wochen-Stadium

Im Folgenden werden die normierten Spotvolumen dieser sechs Proteine grafisch dargestellt. Dabei steht der Vergleich von behandelten Mäusen im 6-Wochen-Stadium und 7,5-Wochen-Stadium im Vordergrund. Das Verhältnis aus dem Quotient der Mittelwerte ergibt die relativen Expressionsunterschiede. Bei einer signifikanten Proteinregulation gilt ein Quotient der normierten Spotintensität von  $< 0.5$  und bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$ .



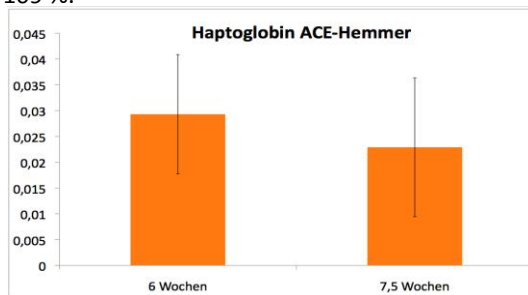
**Abbildung 46** Darstellung der Expressionsunterschiede von Amyloid-Precursor mit Behandlung im 6-Wochen- und 7,5-Wochen-Stadium.

Aufgetragen sind die Mittelwerte der normierten Spotvolumen und per Whisker die jeweilige Standardabweichung. Das normierte Spotvolumen im 7,5-Wochen-Stadium steigt gegenüber dem des 6-Wochen-Stadiums um 109 %.



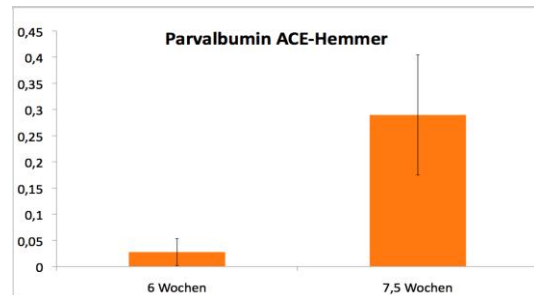
**Abbildung 47** Darstellung der Expressionsunterschiede von Antithrombin III mit Behandlung im 6 und 7,5 Wochen Stadium.

Aufgetragen sind die Mittelwerte der normierten Spotvolumen und per Whisker die jeweilige Standardabweichung. Das normierte Spotvolumen im 7,5-Wochen-Stadium steigt gegenüber dem des 6-Wochen-Stadiums um 223 %.



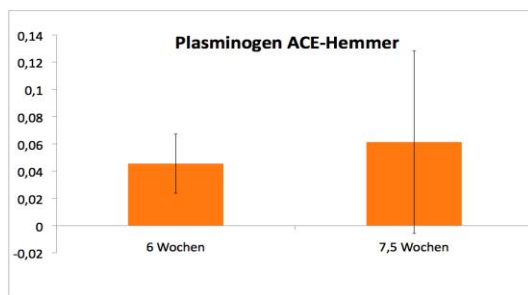
**Abbildung 48** Darstellung der Expressionsunterschiede von Haptoglobin mit Behandlung im 6-Wochen- und 7,5-Wochen-Stadium.

Aufgetragen sind die Mittelwerte der normierten Spotvolumen und per Whisker die jeweilige Standardabweichung. Das normierte Spotvolumen im 7,5-Wochen-Stadium sinkt gegenüber dem des 6-Wochen-Stadiums um 22 %.



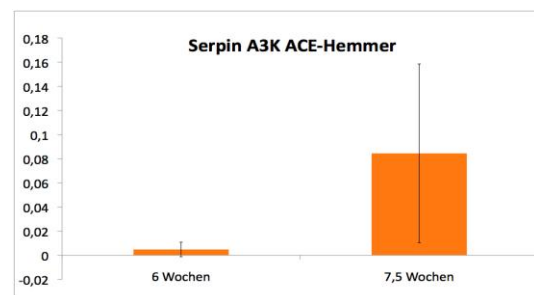
**Abbildung 49** Darstellung der Expressionsunterschiede von Parvalbumin mit Behandlung im 6-Wochen- und 7,5-Wochen-Stadium.

Aufgetragen sind die Mittelwerte der normierten Spotvolumen und per Whisker die jeweilige Standardabweichung. Das normierte Spotvolumen im 7,5-Wochen-Stadium steigt gegenüber dem des 6-Wochen-Stadiums um 948 %.



**Abbildung 50** Darstellung der Expressionsunterschiede von Plasminogen mit Behandlung im 6-Wochen und 7,5-Wochen-Stadium.

Aufgetragen sind die Mittelwerte der normierten Spotvolumen und per Whisker die jeweilige Standardabweichung. Das normierte Spotvolumen im 7,5-Wochen-Stadium steigt gegenüber dem des 6-Wochen-Stadiums um 35 %.



**Abbildung 51** Darstellung der Expressionsunterschiede von Serpin A3K mit Behandlung im 6-Wochen- und 7,5-Wochen-Stadium.

Aufgetragen sind die Mittelwerte der normierten Spotvolumen und per Whisker die jeweilige Standardabweichung. Das normierte Spotvolumen im 7,5-Wochen-Stadium steigt gegenüber dem des 6-Wochen-Stadiums um 1658 %.

### **3.6 Verifizierung der Ergebnisse der 2D SDS-PAGE mittels 1D-Westernblot**

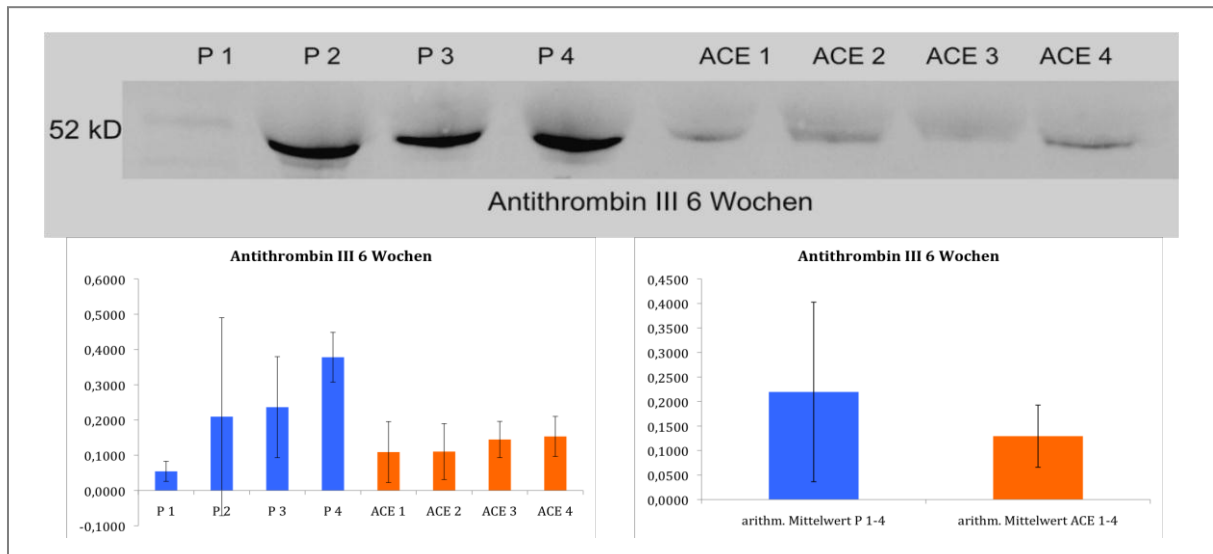
Zur Verifizierung der Proteinregulation wurden die sechs im 2D SDS-PAGE gefundenen Proteine im 1D-Westernblot Experiment untersucht. Die Durchführung der Westernblots erfolgte wie im Material und Methoden Teil unter 2.2.9 beschrieben. Hierbei wurden jeweils vier Placebo - Proben und jeweils vier ACE - Proben auf einem Westernblot pro Zeitstadium untersucht. In jedem Stadium wurde Urin von einzelnen Mäusen und nicht gepollte Proben verwendet. Um eine statistische Untersuchung zu ermöglichen, wurden von jedem Westernblot drei Wiederholungen durchgeführt. Da von den einzelnen Mäusen nicht genügend Urin für drei Wiederholungen vorhanden war, wurde der Urin unterschiedlicher Mäuse, die aber in Zeit und Erkrankungszustand identisch waren, verwendet.

Anhand bislang unveröffentlichter Forschungsergebnisse unserer Arbeitsgruppe stellten sich die Proteine Antithrombin III, Haptoglobin, Parvalbumin, Plasminogen und Serpin A3K als wesentliche Unterschiede zwischen gesunden und Mäusen mit Alport-Syndrom dar. Zur weiteren Klärung des Potentials der ausgewählten Proteine als Prognosemarker bei einer ACE-Hemmer Therapie wurden diese mittels 1D-Westernblot erneut untersucht.

Da sich Amyloid Precursor durch die geringe Proteinnmenge im 1D-Westernblot nicht darstellen lies, reduzierten sich die Markerkandidaten von sechs auf fünf.

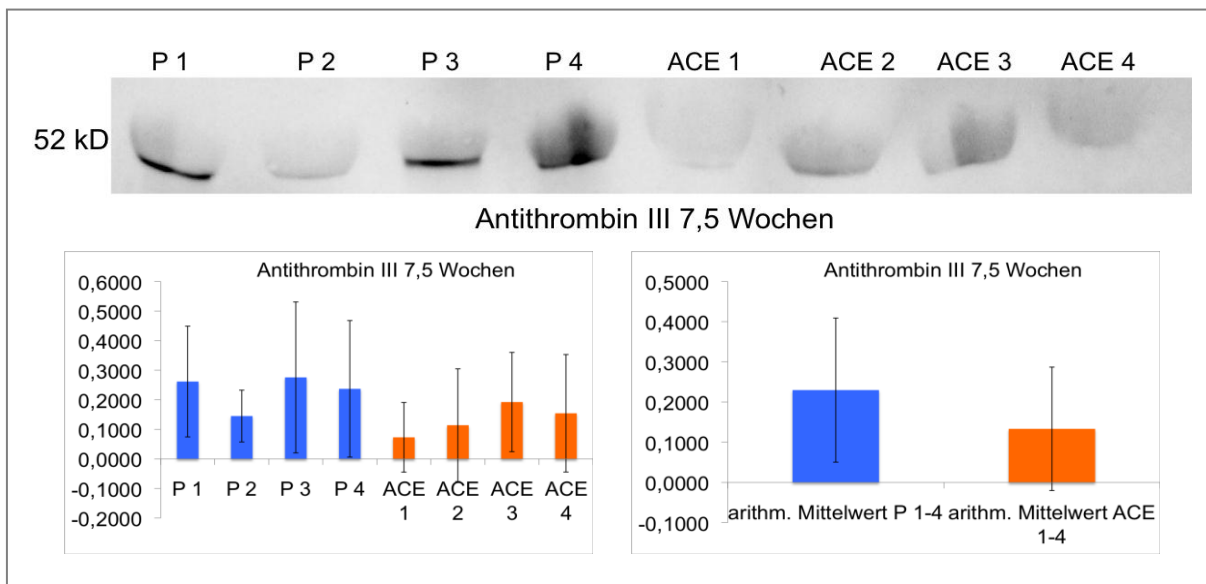
Die grafische Darstellung und Auswertung erfolgte mit der Software Image J. Dabei stellt die Farbe blau immer die Bandenintensität ohne Behandlung und orange immer die Bandenintensität mit Behandlung dar.

### 3.6.1 Immunologische Validierung von Antithrombin III als Prognosemarker



**Abbildung 52 Westernblot für Antithrombin III im 6-Wochen-Stadium**

Der Westernblot zeigt, dass die Ausscheidung im Urin von Antithrombin III im 6-Wochen-Stadium vor der Therapie in P 1 – P 4 im Mittel stärker war als unter Therapie ACE 1 – ACE 4. In der grafischen Darstellung ist die Bandenintensität aus dem Mittel der drei Westernblotanalysen abgebildet. Wobei blau die Urinproben der Mäuse ohne Behandlung und orange die Urinproben der Mäuse mit Behandlung darstellen. In der statistischen Auswertung zeigte sich eine Abnahme der Signalintensität im WB von ACE-Hemmer gegenüber Placebo um 41 %.

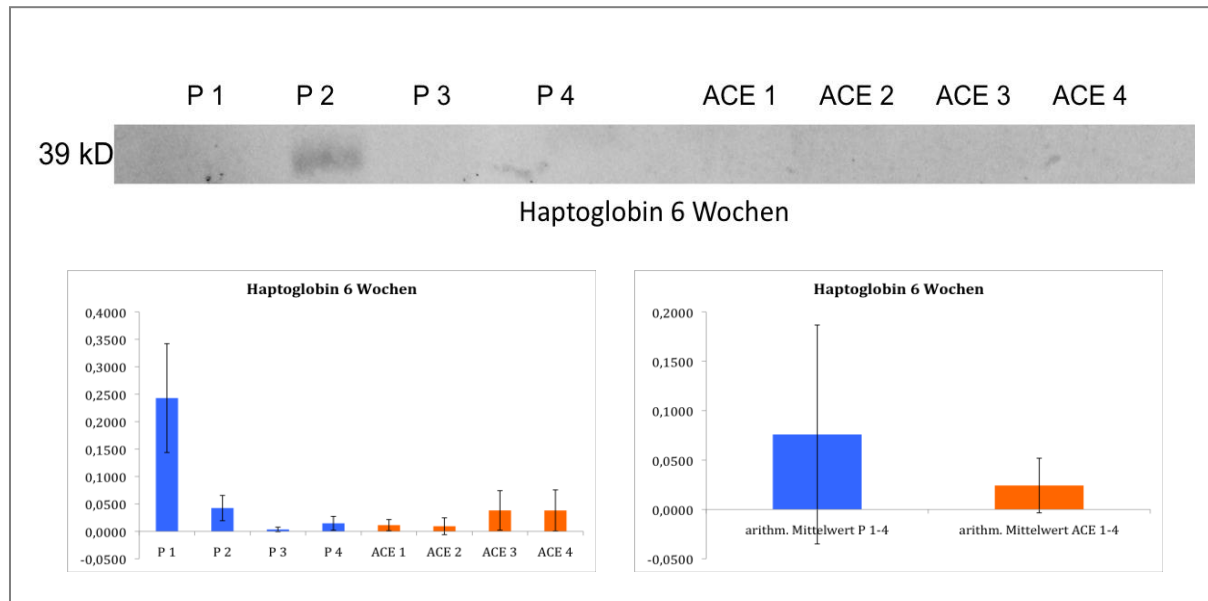


**Abbildung 53 Westernblot für Antithrombin III 7,5-Wochen-Stadium**

Der Westernblot für das 7,5-Wochen-Stadium zeigt ebenfalls ein Abfall der Bandenintensität. In der grafischen Darstellung ist die Bandenintensität aus dem Mittel der drei Westernblotanalysen abgebildet. Wobei blau die Urinproben der Mäuse ohne Behandlung und orange die Urinproben der Mäuse mit Behandlung darstellen. Die statistische Auswertung ergibt eine Abnahme der Bandenintensität von ACE-Hemmer gegenüber Placebo um 42 %.

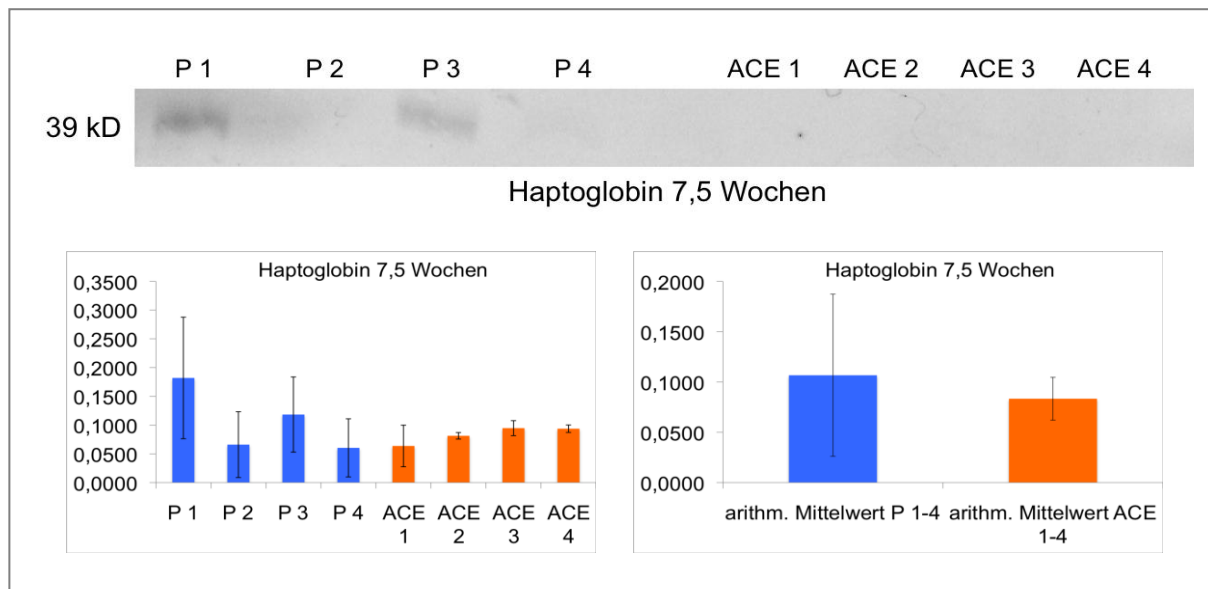


### 3.6.2 Immunologische Validierung von Haptoglobin III als Prognosemarker



**Abbildung 54 Westernblot für Haptoglobin im 6-Wochen-Stadium**

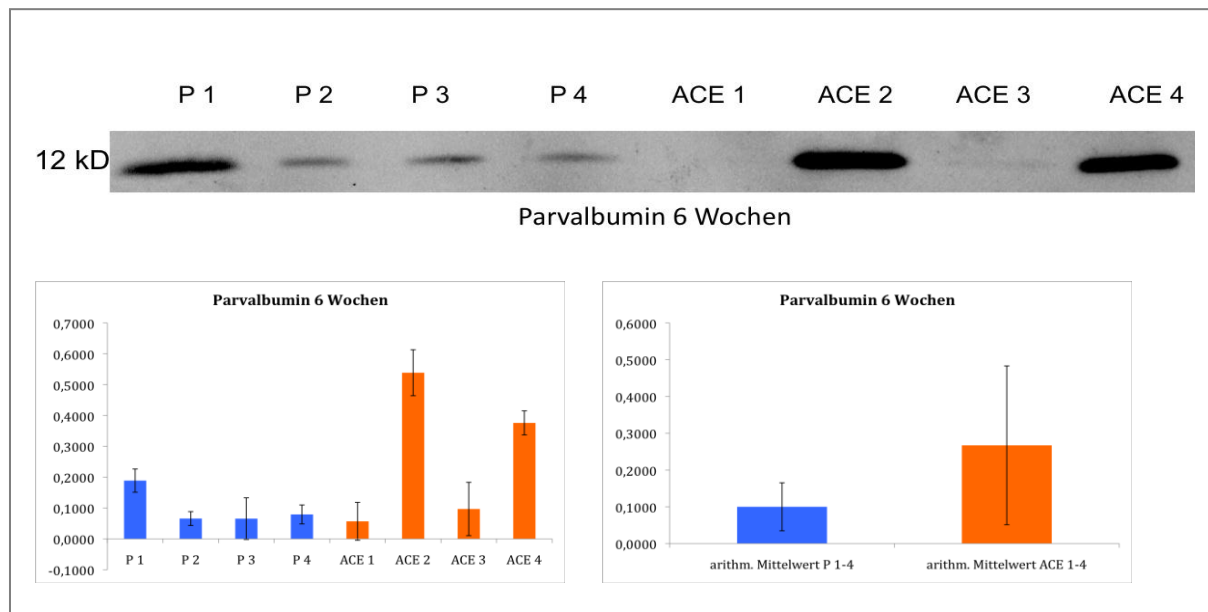
Der Westernblot zeigt, dass die Ausscheidung von Haptoglobin im Urin im 6-Wochen-Stadium vor der Therapie in P 1 – P 4 im Mittel stärker war, als unter Therapie mit ACE 1 – ACE 4. In der grafischen Darstellung ist die Bandenintensität aus dem Mittel der drei Westernblotanalysen abgebildet. Wobei die Farbe blau die Urinproben der Mäuse ohne Behandlung und die Farbe orange die Urinproben der Mäuse mit Behandlung darstellt. In der statistischen Auswertung zeigte sich eine Abnahme der Signalintensität im WB von ACE-Hemmer gegenüber Placebo um 68 %.



**Abbildung 55 Westernblot für Haptoglobin im 7,5-Wochen-Stadium**

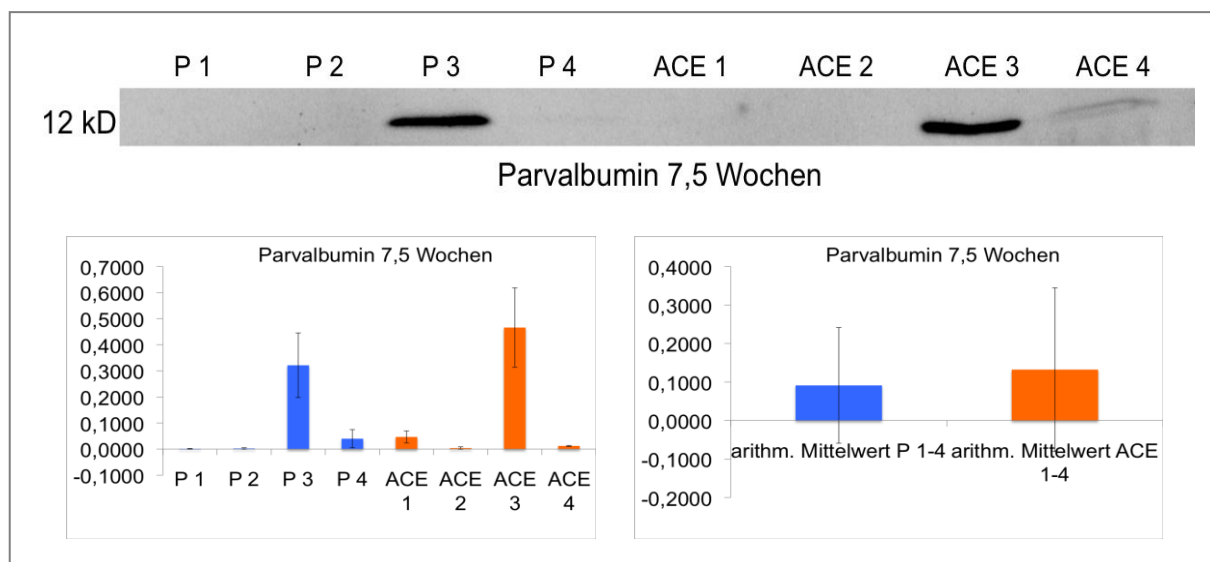
Im 7,5-Wochen-Stadium zeigt sich ebenfalls ein Abfall der Bandenintensität. In der grafischen Darstellung ist die Bandenintensität aus dem Mittel der drei Westernblotanalysen abgebildet. Wobei blau die Urinproben der Mäuse ohne Behandlung und orange die Urinproben der Mäuse mit Behandlung darstellen. Die statistische Auswertung ergibt eine Abnahme der Bandenintensität von ACE-Hemmer gegenüber Placebo um 22 %.

### 3.6.3 Immunologische Validierung von Parvalbumin III als Prognosemarker



**Abbildung 56 Westernblot für Parvalbumin im 6-Wochen-Stadium**

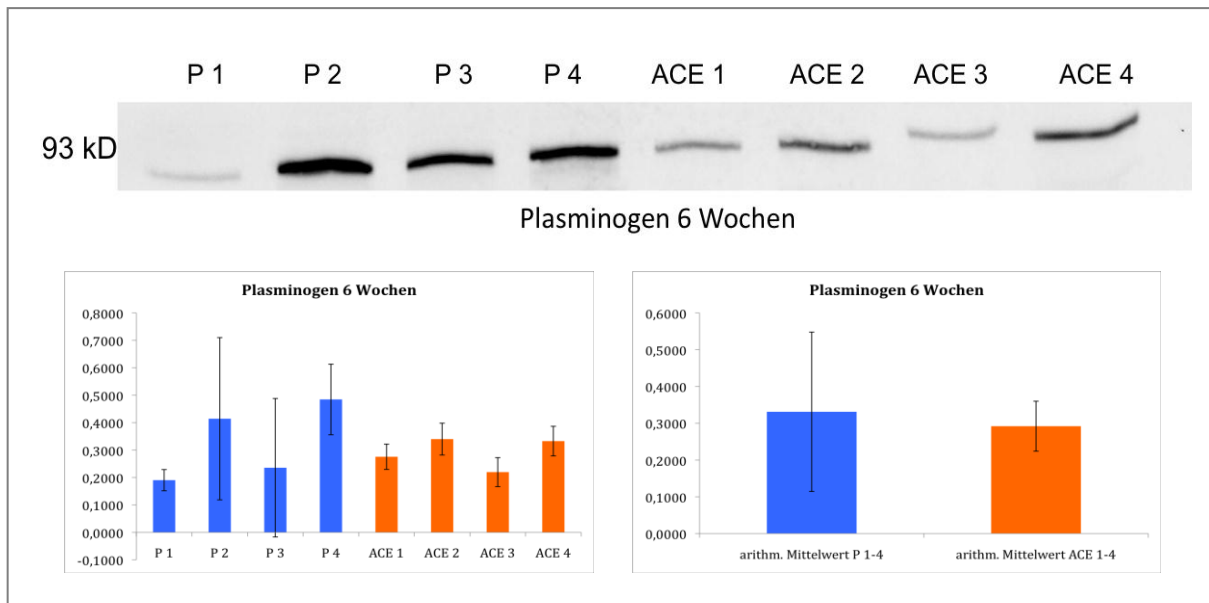
Die Abbildung zeigt die Ausscheidung von Parvalbumin im Urin im 6-Wochen-Stadium. Es finden sich sowohl in P 1 als auch in ACE 2 und ACE 4 Banden mit starker Intensität. In der grafischen Darstellung ist die Bandenintensität aus dem Mittel der drei Westernblotanalysen abgebildet. Wobei blau die Urinproben der Mäuse ohne Behandlung und orange die Urinproben der Mäuse mit Behandlung darstellen. In der statistischen Auswertung zeigt sich ebenfalls eine große Heterogenität der Urinproben. Im Mittel ergibt sich eine Intensitätszunahme der Banden von ACE-Hemmer gegenüber Placebo von 167 %.



**Abbildung 57 Westernblot für Parvalbumin im 7,5-Wochen-Stadium**

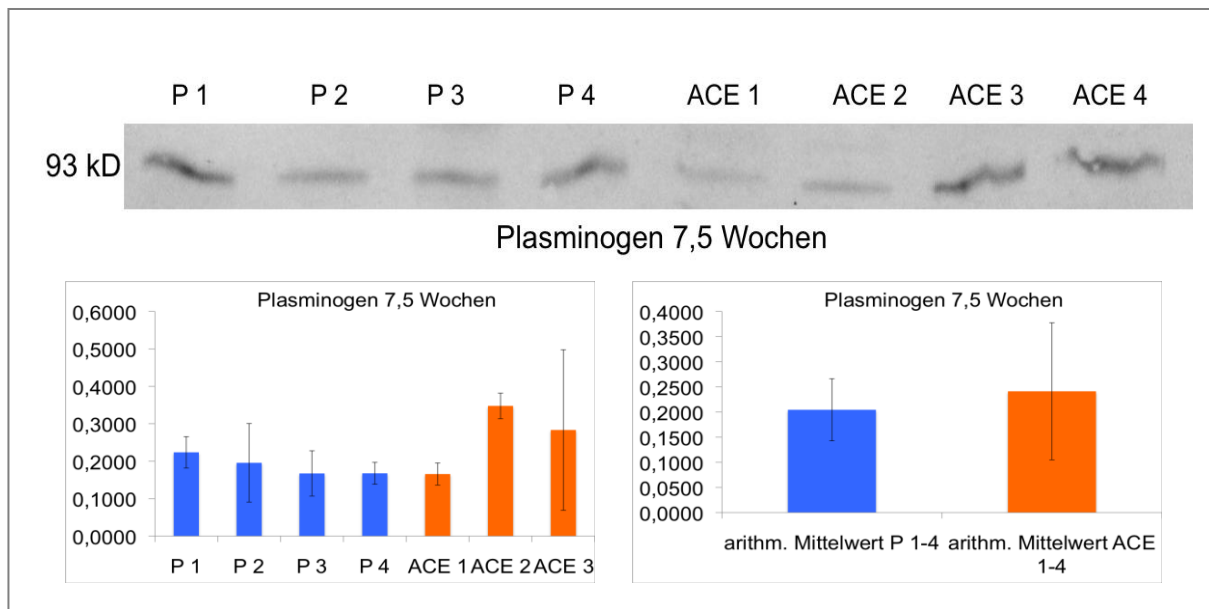
Im 7,5-Wochen-Stadium zeigt sich ein heterogenes Bandenintensitätsmuster. In der grafischen Darstellung ist die Bandenintensität aus dem Mittel der drei Westernblotanalysen abgebildet. Wobei blau die Urinproben der Mäuse ohne Behandlung und orange die Urinproben der Mäuse mit Behandlung darstellen. Die statistische Auswertung ergibt im Mittel eine Zunahme der Bandenintensität von ACE-Hemmer gegenüber Placebo von 45 %.

### 3.6.4 Immunologische Validierung von Plasminogen als Prognosemarker



**Abbildung 58 Westernblot für Plasminogen im 6-Wochen-Stadium**

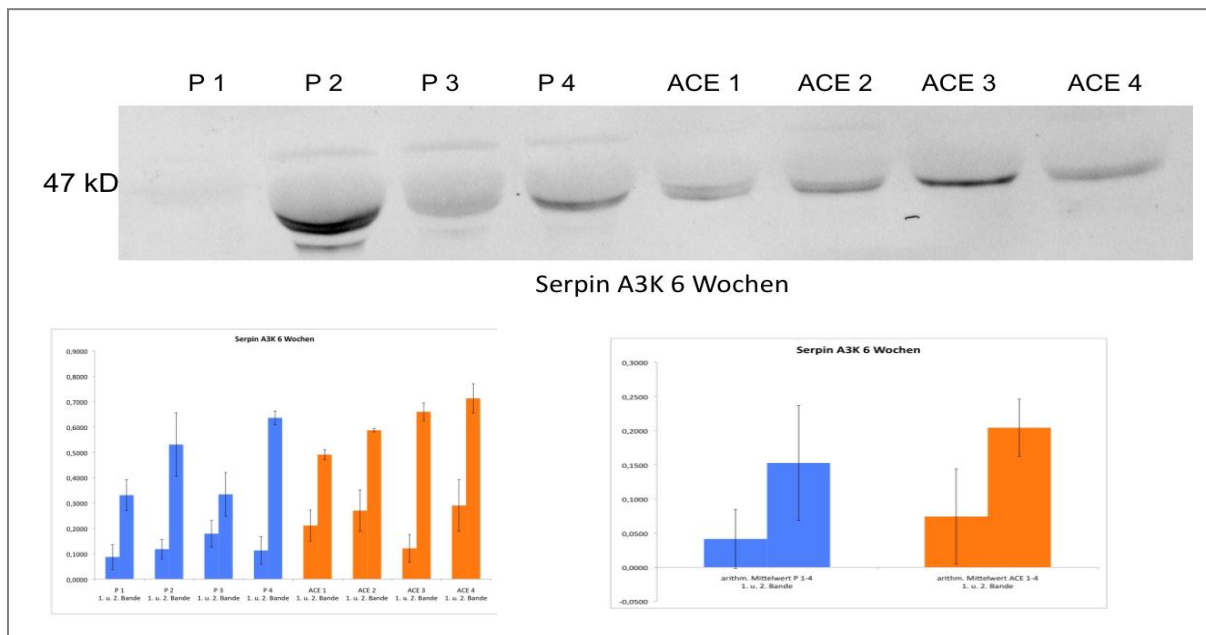
Die Ausscheidung im Urin von Plasminogen war im 6-Wochen-Stadium vor der Therapie in P 1 – P 4 im Mittel stärker als unter Therapie ACE 1 – ACE 4. In der grafischen Darstellung ist die Bandenintensität aus dem Mittel der drei Westernblotanalysen abgebildet. Wobei blau die Urinproben der Mäuse ohne Behandlung und orange die Urinproben der Mäuse mit Behandlung darstellen. Die statistische Auswertung zeigte eine Abnahme der Signalintensität im Westernblot von ACE-Hemmer gegenüber Placebo um 12 %.



**Abbildung 59 Westernblot für Plasminogen im 7,5-Wochen-Stadium**

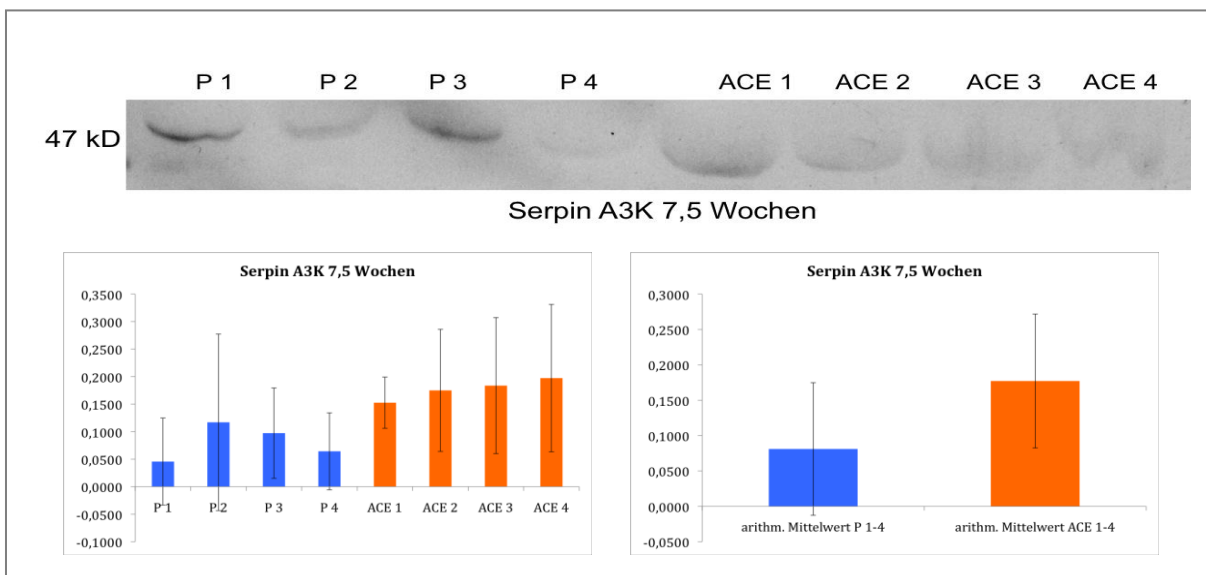
Im 7,5-Wochen-Stadium zeigt sich im Westernblot ebenfalls kein einheitliches Bandenmuster. In der grafischen Darstellung ist die Bandenintensität aus dem Mittel der drei Westernblotanalysen abgebildet. Wobei blau die Urinproben der Mäuse ohne Behandlung und orange die Urinproben der Mäuse mit Behandlung darstellen. Die statistische Auswertung ergibt eine Zunahme der Bandenintensität von ACE-Hemmer gegenüber Placebo von 18 %.

### 3.6.5 Immunologische Validierung von Serpin A3K als Prognosemarker



**Abbildung 60 Westernblot für Serpin A3K im 6-Wochen-Stadium**

Die Ausscheidung im Urin von Serpin A3K war im 6-Wochen-Stadium vor der Therapie in P 1 – P 4 im Mittel stärker als unter Therapie ACE 1 – ACE 4. In der grafischen Darstellung ist die Bandenintensität aus dem Mittel der drei Westernblotanalysen abgebildet. Wobei blau die Urinproben der Mäuse ohne Behandlung und orange die Urinproben der Mäuse mit Behandlung darstellen. In der statistischen Auswertung wurde im Mittel eine Zunahme der Signalintensität im Westernblot von ACE-Hemmer gegenüber Placebo um 26 % sichtbar.



**Abbildung 61 Westernblot für Serpin A3K im 7,5-Wochen-Stadium**

Im 7,5-Wochen-Stadium zeigt sich im Westernblot kein einheitliches Bandenintensitätsmuster. In der grafischen Darstellung ist die Bandenintensität aus dem Mittel der drei Westernblotanalysen abgebildet. Wobei blau die Urinproben der Mäuse ohne Behandlung und orange die Urinproben der Mäuse mit Behandlung darstellen. Die statistische Auswertung ergibt eine Zunahme der Bandenintensität von ACE-Hemmer gegenüber Placebo von 118 %.

### 3.7 Statistische Auswertung

**Tabelle 14** Regulation der sechs Proteine im Vergleich behandelt und unbehandelt anhand der Quantifizierung der 2D Gele

Protein	Änderung von Placebo zu ACE nach 6 Wochen	Änderung von Placebo zu ACE nach 7,5 Wochen
Amyloid-Precursor	-30 %	-47 %
Antithrombin III	30 %	-4 %
Haptoglobin	-74 %	-81 %
Parvalbumin	-82 %	6 %
Plasminogen	163 %	-33 %
Serpin A3K	-90 %	-26 %

**Tabelle 15** Regulation der sechs Proteine im Vergleich Placebo im 6-Wochen- und 7,5-Wochen-Stadium und ACE-Hemmer im 6-Wochen- und 7,5-Wochen-Stadium anhand der Quantifizierung der 2D Gele

Protein	Änderung von 6- zu 7,5-Wochen Placebo	Änderung von 6- zu 7,5-Wochen ACE-Hemmer
Amyloid-Precursor	172 %	109 %
Antithrombin III	335 %	223 %
Haptoglobin	7 %	-22 %
Parvalbumin	77 %	948 %
Plasminogen	431 %	35 %
Serpin A3K	131 %	1658 %

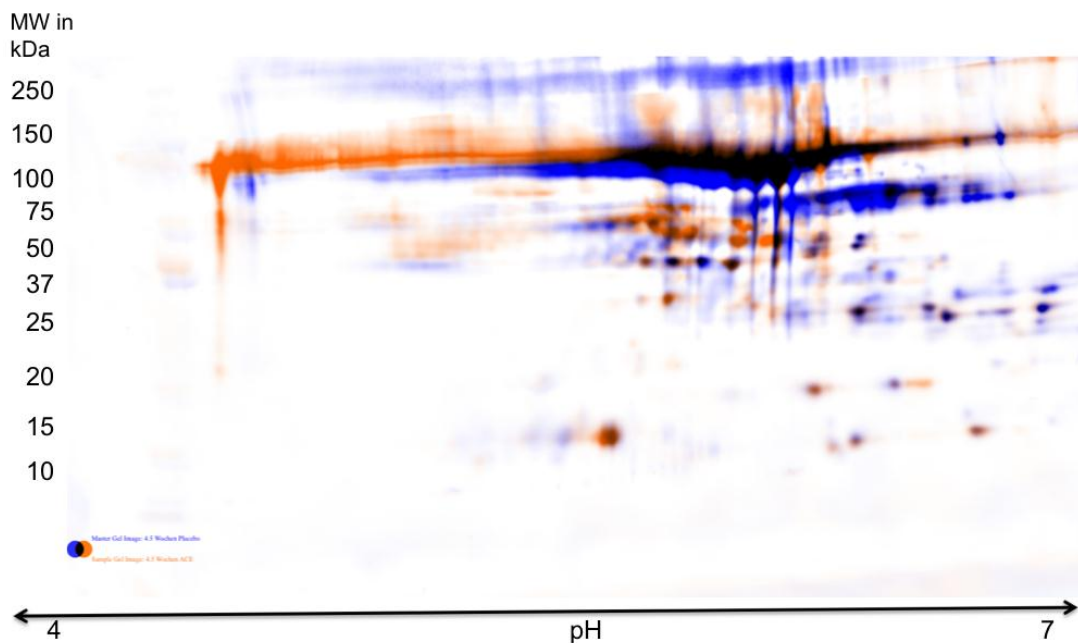
**Tabelle 16** Regulation der fünf Proteine im Vergleich behandelt und unbehandelt anhand der Quantifizierung der Westernblots

Protein	Änderung von Placebo zu ACE nach 6 Wochen	Änderung von Placebo zu ACE nach 7,5 Wochen
Antithrombin III	-41 %	-42 %
Haptoglobin	-68 %	-22 %
Parvalbumin	167 %	45 %
Plasminogen	-12 %	18 %
Serpin A3K	26 %	118 %

Die statistische Überprüfung der 2D-Gelanalyse und Westernblotauswertung für eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,05$  mittels Lilliefors-Test (Prüfung auf Verteilungsform für stetige Daten bei geringem Stichprobenumfang) und dem Wilcoxon-Vorzeichenrangentest (Prüfung zweier abhängiger Stichproben auf signifikante Abweichung für nicht normal verteilte Daten) ergibt keine statistische Signifikanz. Dennoch deuten die Untersuchungsergebnisse für die Proteine Antithrombin III und Haptoglobin auf eine klinisch relevante Herabregulation im Vergleich von unbehandelten mit behandelten Mäusen hin. Um diese klinische Relevanz durch eine statistische Signifikanz zu bestätigen, ist eine Wiederholung der Tests mit einem größeren Stichprobenumfang, als dem hier verwendeten ( $n=3$ ), anzustreben.

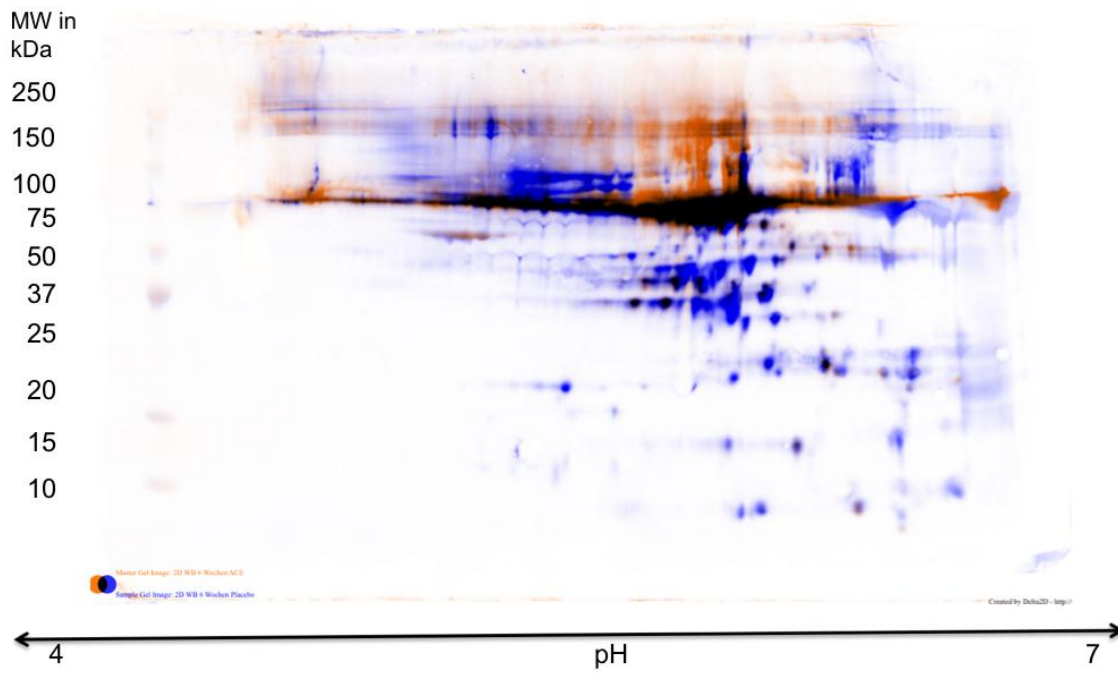
### 3.8 2D-Westernblot von Albumin im 4,5-Wochen- und 6-Wochen-Stadium

Um zu zeigen, dass sich unter ACE-Hemmer - Therapie vor allem auch die Albuminausscheidung vermindert, wurde eine 2D-Westernblotuntersuchung an den gepoolten Proben durchgeführt. Orange zeigt die Albuminurie unter Behandlung und blau die Albuminurie ohne Behandlung. Es zeigt sich sowohl eine Änderung der Größe, als auch der Intensität von Albuminfragmenten. Albumin erscheint im Westernblot ohne Behandlung größer und intensiver als mit Behandlung. Es vermindert sich besonders die Ausscheidung von kleineren Albuminfragmenten (Abbildung 63). Um zu zeigen, dass auch schon in frühesten Therapiestadien eine Besserung der Albuminurie zu sehen ist, wurde die 2D Westernblotanalyse ebenfalls im 4,5-Wochen-Stadium durchgeführt (Abbildung 62). Albumin ist in den Westernblots sehr gut erkennbar und durch seine Größe als Marker sehr interessant.



**Abbildung 62 2D-Westernblot für Albumin im 4,5-Wochen-Placebostadium und 4,5-Wochen-ACE-Hemmerstadium**

Die Erstellung des 2D-Westernblots erfolgte wie im Kapitel 2.2.11 beschrieben. Die Überlappung der Zellulosemembranen wurde mittels des Programms Decodon Delta 2 D durchgeführt und dient dazu, Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Albuminausscheidung im 4,5-Wochen-Stadium von behandelten (orange) und unbehandelten (blau) Mäusen darzustellen. Unter Therapie zeigt sich ein Rückgang der Albuminurie.



**Abbildung 63 2D-Westernblot für Albumin im 6-Wochen-Placebostadium und 6-Wochen-ACE-Hemmerstadium**

Die Erstellung des 2D-Westernblots erfolgte wie im Kapitel 2.2.11 beschrieben. Die Überlappung der Zellulosemembranen wurde mittels des Programms Decodon Delta 2 D durchgeführt und dient dazu, Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Albuminausscheidung im 6-Wochen-Stadium behandelt (orange) und unbehandelt (blau) darzustellen. Unter Therapie sind deutlich weniger Albuminfragmente zu sehen.

## 4. Diskussion

### 4.1 Identifizierung von Biomarkern durch die Ergebnisinterpretation

In dieser Arbeit wurden Proteine als Biomarkerkandidaten untersucht. Aus den erhobenen Daten können drei Typen von Biomarkerkandidaten betrachtet werden. Der erste Biomarker soll den Krankheitsverlauf des Alport-Syndroms zeigen, indem der Proteinurieprogress der Placebogruppen verglichen wurde. Dieser Markerkandidat fungiert als prognostischer Marker. Der zweite Biomarkerkandidat soll den Therapieerfolg anzeigen. Dabei werden behandelte und unbehandelte Mäuse in unterschiedlichen Krankheitsstadien verglichen. Es wird die Medikamentenwirkung angezeigt. Der dritte Markerkandidat soll den Therapieverlauf aufzeigen, indem die mit ACE-Hemmer *Ramipril* behandelten Urinproben untereinander im Zeitverlauf verglichen wurden. Dieser Markerkandidat wäre prädikativ. Hierzu wurden die sechs Biomarkerkandidaten, Amyloid-Precursor, Antithrombin III, Haptoglobin, Parvalbumin, Plasminogen und Serpin A3K, betrachtet. Die ausgewählten Proteine, die schon in vorangegangenen Studien das Krankheitsbild vom Alport-Syndrom dokumentierten, bestätigen sich in dieser Arbeit.

Können alle diese Proteine auch als Markerkandidaten für den Therapieverlauf und dessen Erfolg Auskunft geben?

#### 4.1.1 Identifizierung von Biomarkerkandidaten zum Krankheitsverlauf

Zur Identifizierung von Biomarkerkandidaten zum Krankheitsverlauf eignet sich der Vergleich des 6-Wochen-Placebostadiums mit dem 7,5-Wochen-Placebostadium. Der Krankheitsverlauf des Alport-Syndroms ist durch eine Proteinurie gekennzeichnet. Die Ausscheidung aller sechs Proteine nimmt zu. Die Proteine zeigen an, dass ohne Therapie die Proteinurie verstärkt und rasch fortschreitet. Sie eignen sich daher alle als potentielle Markerkandidaten für den Krankheitsverlauf.

#### 4.1.2 Identifizierung von Biomarkerkandidaten für den Therapieerfolg

Zur Identifizierung von Biomarkerkandidaten für den Therapieerfolg ist der Vergleich von unbehandelten und behandelten Mäusen in den verschiedenen Zeitstadien geeignet. Anhand der Auswertung der 2D-Gele und der Westernblotanalyse zeigen sich von den sechs Biomarkerkandidaten nur Antithrombin III und Haptoglobin als charakteristisch, um den Therapieerfolg anzuzeigen, da sie weniger ausgeschieden werden.

Parvalbumin, Plasminogen und Serpin A3K zeigen keinen einheitlichen Rückgang von Placebo zu ACE-Hemmer, sondern einige steigen sogar unter Therapie an und scheinen deshalb als Markerkandidaten für den Therapieerfolg nicht charakteristisch.

Diese Ergebnisse zeigen jedoch keinesfalls die Wirkungslosigkeit des ACE-Hemmers *Ramipril*. Vielmehr ist durch die unterschiedliche Ladung und Größe dieser Proteine nach anderen Hypothesen zu suchen, weshalb unter ACE-Hemmer Therapie zum Beispiel Parvalbumin und Plasminogen ansteigen.

Allgemein lässt sich formulieren, je positiver ein Protein geladen ist, desto besser wird es bei intakter GBM filtriert. Geht die Struktur der GBM verloren und wird somit ihre negative Ladung schwächer, werden die positiv geladenen Proteine weniger filtriert.

Die negativ geladenen Proteine, welche zuvor bei intakter GBM von dieser abgestoßen werden, werden bei Funktionsverlust der GBM stärker filtriert. Somit lässt sich erklären,



warum die positiv geladenen Proteine wie Parvalbumin, Plasminogen und Serpin A3K bei der Placebogruppe, die eine defekte GBM aufweist, weniger ausgeschieden werden, als in der ACE-Hemmer Gruppe, in der die GBM noch weitestgehend intakt ist.

In der grafischen Darstellung der 2D-Gel-Spotintensität von Parvalbumin lässt sich dies gut nachvollziehen. Parvalbumin ist positiv geladen und wird im Placebo Stadium weniger stark ausgeschieden als im ACE-Hemmer Stadium. Durch Verlust der negativen Ladung der GBM wird Parvalbumin weniger ausgeschieden, da positiv geladene Proteine und gering negativ geladene GBM sich weniger anziehen. Durch die Verlangsamung der Niereninsuffizienz unter ACE-Hemmer Therapie, welches eine Aufrechterhaltung der GBM Funktion und ihrer negativen Ladung bedeutet, kann mehr Parvalbumin filtriert werden. Dennoch erscheint mehr Parvalbumin im Urin als zuvor im Placebo Stadium. Ist eine Erklärung in der Größe von Parvalbumin als kleines Protein mit 12 kDa zu suchen? Könnten die verminderte Fähigkeit der Rückresorption und deren Kapazitätsgrenze mit Ursache sein?

Plasminogen ist ebenfalls nur schwach positiv geladen und wird mit zunehmenden Funktionssverlust der GBM nicht mehr filtriert, da die GBM ihre negative Ladung zunehmend verliert. Plasminogen wird im 6-Wochen-ACE-Hemmerstadium noch gut filtriert, jedoch im 7,5-Wochen-ACE-Hemmerstadium reicht die schwache positive Ladung des Plasminogens nicht mehr aus, um filtriert zu werden. Somit wird im 7,5-Wochen-ACE-Hemmerstadium weniger Plasminogen ausgeschieden.

Die Überprüfung des Therapieerfolges lässt sich leichter nachvollziehen und messen, wenn die Proteine unter Therapie nicht ansteigen. Da aber alle positiv geladenen Proteine unter Therapie vermehrt ausgeschieden werden, eignen diese sich nicht als Therapieerfolgsmarker. Somit sind die Proteine Parvalbumin, Plasminogen und Serpin A3K als Marker nicht weiter in Betracht zu ziehen.

Antithrombin III und Haptoglobin sind negativ geladen und werden daher in der Placebo Gruppe, in der die GBM defekt ist, vermehrt ausgeschieden, da die negative Ladung, welche zuvor ein Abstoßen von negativ geladenen Proteinen bewirkte, schwächer ist. In der ACE-Hemmer Gruppe werden die negativ geladenen Proteine weniger stark ausgeschieden, da die GBM intakt ist und diese die negativ geladenen Proteine noch abstößt. Antithrombin III und Haptoglobin zeigen beide einen Rückgang der Ausscheidung von Placebo zu ACE-Hemmer sowohl im Vergleich des 6-Wochen-Stadiums mit dem 7,5-Wochen-Stadium. Betrachtet man Antithrombin III, so lässt sich ein gleichmäßiger linearer Abfall der Proteinausscheidung in den beiden Stadien um jeweils 40 % erkennen. Haptoglobin hingegen nimmt im 6-Wochen-Stadium um 68 % und im 7,5-Wochen-Stadium um 22 % ab. Der Abfall ist nicht linear. Beide Proteine zeigen den Therapieerfolg an.

Die Größe der Proteine bestimmt neben der Ladung deren Ausscheidungsverhalten (Pavenstadt 1998). Im gesunden Nephron werden hochmolekulare Substanzen, Proteine und Blutzellen zurückgehalten. Plasmaproteine mit einem Molekulargewicht von über 50 kDa werden normalerweise nicht filtriert. Kleinere Proteine werden filtriert aber tubulär vollständig rückresorbiert. Den Podozyten kommt bei der Ultrafiltration des Harns eine Schlüsselrolle zu, da sie zum einen mit ihren Zellausläufern die Filtrationsschlitze und die Schlitzmembran bilden und zum anderen durch Podocalyxin-Moleküle an ihrer apikalen Zelloberfläche eine stark negative Ladung aufweisen (Kerjaschki et al. 1984). Die von den

Podozyten gebildeten Filtrationsschlitze haben eine Breite von 30 nm bis 40 nm und sind dabei fast so groß wie ein Albuminmolekül (Reiser et al. 2000). Die Filtrationsbarriere trennt somit nach Ladung und Größe der Moleküle (Gloy et al. 1998). Ist die Filtrationsbarriere intakt, können die Proteine die Membran nicht passieren. Durch die negative Ladung werden ebenfalls negativ geladene Proteine abgestoßen. Bei Schädigung des Filtrationsapparates werden mehrere kleine und große Proteine filtriert, können aber nicht so schnell wieder resorbiert werden, da die tubuläre Rückresorptionskapazität überschritten wird. So kommt es schnell zu einem Verlust an Proteinen. Schon bei einem geringen Funktionsverlust der GBM kann Albumin durch die Filtrationsschlitze in den Primärharn gelangen. Da Albumin ein Molekulargewicht von 69 kDa besitzt, kann es den Filtrationsschlitz ungehindert passieren, sobald dieser durch den Defekt vergrößert ist. Durch den Podozytenverlust nimmt auch die negative Ladung der GBM ab und dadurch wird die Filtrationsbarriere zerstört. Die negativ geladenen Teile werden nicht mehr abgestoßen und können so den Filtrationsschlitz ungehindert passieren (Reiser et al. 2000).

#### 4.1.3 Identifizierung von Biomarkerkandidaten zum Therapieverlauf

Zur Identifizierung von Biomarkerkandidaten für den Therapieverlauf ist der Vergleich des 6-Wochen-ACE-Hemmerstadiums mit dem 7,5-Wochen-ACE-Hemmerstadium maßgebend. Dabei zeigt sich, dass bei allen Proteinen außer bei Haptoglobin ein Progress der Proteinurie trotz Behandlung mit ACE-Hemmer zu verzeichnen ist. Deutlich wird, dass eine Therapie mit dem ACE-Hemmer *Ramipril* die Proteinurie nicht stoppen, aber zeitlich weit hinauszögern kann. Die Krankheit schreitet fort, jedoch viel langsamer. Der Progress bei den Mäusen mit Behandlung verläuft in seiner Kurve flacher, als bei den Mäusen ohne Behandlung, deren Kurve steiler ansteigt. Dies ist anhand der Ergebnisse der Proteine Amyloid-Precursor, Antithrombin III und Plasminogen zu sehen. Bei Haptoglobin ist sogar ein Rückgang der Proteinurie von 6 Wochen zu 7,5 Wochen zu verzeichnen und dokumentiert so einen optimal ablesbaren Therapieverlauf. Bei den Proteinen Parvalbumin und Serpin A3K verläuft der Krankheitsprogress im Mittel mit Behandlung steiler als ohne Behandlung. Somit eignen sich diese zwei Proteine nicht als Marker Kandidaten für den Therapieverlauf.

#### 4.1.4 Auswahl potentieller Marker Kandidaten

Anhand der vorstehenden Ergebnisinterpretation könnte Haptoglobin ein idealer Marker Kandidat sein, da er aus allen drei Typen von Kandidaten die deutlichste Korrelation zum Krankheitsverlauf, zum Therapieerfolg und über den Therapieverlauf aufzeigt.

Antithrombin III zeigt ebenfalls ein mögliches Potential als Marker Kandidat, da es auch den Krankheitsverlauf darstellt, unter Behandlung mit ACE-Hemmer abnimmt und den Therapieverlauf anzeigt. Der Therapieverlauf ist jedoch nicht durch einen Rückgang wie bei Haptoglobin beschrieben, sondern die Anstiegskurve von AT III verläuft mit Behandlung flacher als ohne Behandlung. AT III nimmt zwar unter Therapie zu, aber zeitlich verzögert.

#### 4.1.5 Albumin als weiterer Marker Kandidat

Albumin im Urin zählt bei vielen Nierenkrankungen als Frühmarker für den Krankheitsbeginn und -verlauf und ist heute als früher Risikomarker für chronische Niereninsuffizienz (CKD), vor allem bei der diabetischen Nephropathie anerkannt (Vora et al. 2000). Ein Screening auf Mikroalbuminurie schafft also die Chance auf frühe Risikoerkennung und eine nachfolgende

Behandlung, die das Auftreten von CKD hinauszögern oder verhindern kann. Die Ausscheidung von Albumin im Urin kann mit verschiedenen Behandlungsstrategien verringert werden, z. B. mit ACE-Hemmern (Gross et al. 2005).

Die im 2D-Westernblot gezeigte Mikroalbuminurie, die unter ACE-Hemmer-Therapie zurückgeht, ist ein Hinweis darauf, dass sich das Alport-Syndrom analog einer diabetisches Nephropathie verhält. Da schon im frühen Stadium von 4,5 Wochen eine Albuminurie zu erkennen ist, ist es wichtig, schon früh mit der Behandlung zu beginnen, da sich unter Therapie die Albuminurie verbessert. Albumin kann auch beim Alport-Syndrom ein potenzieller Frühmarkerkandidat sein, der sowohl den Krankheitsverlauf, den Therapieerfolg und den Therapieverlauf zeigen könnte.

#### **4.2 Bedeutung und Funktion der möglichen Markerkandidaten**

Genetisch bedingte Krankheiten wie das Alport-Syndrom lassen sich oft auf mehrere Gendefekte zurückführen. Die Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Genen sind oft auf der Ebene des Genoms schwierig nachzuweisen. Diese Probleme lassen sich erst lösen, wenn man die Funktion der Gene und ihre daraus entstehenden Proteine erkennt. Anhand von Proteomics, der systematischen Analyse der Identifizierung, Quantifizierung und Funktionalität von Proteinen, kann dies gelingen. Die Analyse von Proteinen einschließlich ihrer Modifikationen ermöglicht die Charakterisierung von krankheitsspezifischen Biomarkern (Schrattenholz 2001).

In dieser Arbeit konnte anhand von Proteomanalyse nochmals der Erfolg der ACE-Hemmer-Therapie mit *Ramipril* bei am Alport-Syndrom erkrankten Mäusen gezeigt werden. Die verlängerte Überlebenszeit im Zusammenhang mit dem Rückgang der Proteinurie aus Vorgängerstudien wurde bestätigt. Der Vergleich von behandelten und unbehandelten Mäusen in den verschiedenen Zeitstadien lässt eine Aussage über den Therapieverlauf zu. Das Verhalten der Proteine Haptoglobin und Antithrombin III unter der ACE-Hemmer Therapie sowie der große Unterschied in den Albuminkonzentrationen von Woche 4,5 zu Woche 6 stehen bei dieser Betrachtung im Vordergrund und werden in der Westernblotanalyse bestätigt.

Beim Alport-Syndrom lässt sich der Nierendefekt nicht auf eine einzelne Region wie das Glomerulus beschränken. In den 2D Gelen lassen sich Proteine finden, die sowohl für eine renal glomeruläre, renal tubuläre als auch postrenale Schädigung sprechen. Für einen glomerulären Schaden spricht der Verlust von Albumin, für einen tubulären Schaden spricht der Verlust des Retinol-binding Proteins und für einen postrenalen Schaden der Verlust von Haptoglobin als  $\alpha_2$  Globulin. Anhand der Untersuchungen mittels Proteomics und Westernblot kristallisieren sich Albumin, Antithrombin III und Haptoglobin als mögliche Markerkandidaten für die Überwachung der Therapie mit ACE-Hemmer *Ramipril* beim Alport-Syndrom heraus. Das Alport-Syndrom kann klinisch in ein nephrotisches Syndrom übergehen. Alle drei potenziellen Markerkandidaten werden beim nephrotischen Syndrom ausgeschieden. Beim nephrotischem Syndrom ist in der Serumelektrophorese Albumin vermindert aber  $\alpha_2$  Globulin und  $\beta$ -Globuline relativ erhöht. Dies liegt daran, dass vermehrt Albumin ausgeschieden wurde.  $\alpha_2$  Globuline und  $\beta$ -Globuline sind nur relativ erhöht durch den hohen Verlust an anderen Proteinen.

#### 4.2.1 Funktion und Bedeutung von Albumin

Albumin im Urin zählt bei Nierenerkrankungen als Frühmarker, da es bereits schon bei Mikroproteinurie ausgeschieden wird. Albumin ist ein globuläres Plasmaprotein mit einem Molekulargewicht von 69 kDa und negativer Ladung. Es dient der Aufrechterhaltung des onkotischen Drucks. Albumin wird in der Leber gebildet und dient im Blut als Trägerprotein für Steroidhormone, Fettsäuren und Schilddrüsenhormone. Das Fortschreiten der Erkrankung führt zu einer Makroproteinurie und bewirkt somit auch das Ausscheiden von Antithrombin III und Haptoglobin.

#### 4.2.2 Funktion und Bedeutung von Antithrombin III

Antithrombin III (AT III) spielt eine wichtige Rolle als Hemmstoff in der Blutgerinnung. Die Gerinnungshemmung erfolgt dabei durch Inaktivierung der Gerinnungsfaktoren Xa, IXa, XIa und XIIa. Außerdem hemmt es den Abbau von Thrombin und aktiviert die Endothelzellen zur Synthese von t-Plasminogenaktivator. AT III hat ein Molekulargewicht von 52 kDa und ist negativ geladen. Die Plasmakonzentration beträgt 18 bis 30 mg/dl. Beim nephrotischen Syndrom kommt es zum Verlust von Antithrombin III. Geht AT III verloren, tritt eine vermehrte Gerinnung des Blutes ein. Dies kann zu Thrombosen führen und so die Niereninsuffizienz beschleunigen.

#### 4.2.3 Funktion und Bedeutung von Haptoglobin

Haptoglobin ist ein Transport- und Akut-Phase Protein im Plasma und gehört zur Gruppe der  $\alpha_2$  Globuline. Es hat eine Molekularmasse von 39 kDa und ist negativ geladen. Haptoglobin wird in der Leber gebildet und ins Blut abgegeben. Es bindet und transportiert freies Hämoglobin im Blut (Langlois und Delanghe 1996), damit es im Normalfall nicht über die Niere ausgeschieden werden kann, da es als Komplex zu groß ist. Somit wird ein Eisenverlust verhindert. Durch die Bindung des Hämoglobins wird die Niere vor intravasaler Hämolyse geschützt (Polticelli et al. 2008). Als Akutphase-Protein ist es bei Entzündungen erhöht, verursacht durch die Wirkung von Interleukin-1, Interleukin-6 und Kortison. Des Weiteren findet man einen erhöhten Plasmahaptoglobinwert beim nephrotischen Syndrom vor. Haptoglobin hat einen besonderen Effekt auf die  $\text{TNF}\alpha$ -Konzentration. Es wird in neutrophilen Granulozyten gespeichert und bei der Bindung von  $\text{TNF}\alpha$  während einer Akut-Phase-Reaktion ausgeschüttet. Dies geschieht konzentrationsabhängig: je mehr  $\text{TNF}\alpha$  bindet, desto mehr Haptoglobin wird ausgeschüttet (Berkova et al. 1999). Eine effiziente Angiogenese ist ein wichtiger Vorgang bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen. Haptoglobin fördert Gefäßwachstum (proangiogenetische Wirkung) und vermindert dadurch hypoxiebedingte Schäden (Langlois und Delanghe 1996). Haptoglobin trägt dazu bei, nach Entzündungen (lokal oder systemisch) die Gewebshomöostase wieder herzustellen (Polticelli et al. 2008).

### 4.3 Wirkmodell des ACE-Hemmers beim Alport-Syndrom

Der Pathomechanismus, welcher zu einem nephrotischen Syndrom führt, kann durch unterschiedliche Modelle erklärt werden. Die Modelle beziehen sich vor allem auf den Verlust der Podozytenfunktion, welche mit Verlust der Filtrationsfunktion der glomerulären Basalmembran einhergeht. Dies führt zum Auftreten der Symptome Hämaturie und Proteinurie. Damit ACE-Hemmer Hämaturie und Proteinurie vermindern und somit auch den Progress der Erkrankung aufhalten, könnten sie an den sechs Schritten der Pathogenese ansetzen (Gross und Weber 2005). Am ersten Schritt, der Mutation, kann durch ACE-Hemmer kein Einfluss genommen werden, d.h. auch diese Behandlung ist keine ursächliche Therapieform. Der zweite Schritt, der falsche Aufbau des Kollagens, ist direkte Folge der Mutation und somit auch nur schwer zu beeinflussen. Erstmals ist im dritten Schritt, der Podozytenaktivierung, ein Einfluss des ACE-Hemmers möglich. Das Symptom der Proteinurie wird hervorgerufen durch den Funktionsverlust der Filtrationsbarriere des Glomerulus. An diesem Funktionsverlust ist vor allem der Podozyt beteiligt. Podozyten sind mit einer spezifischen Membrandomäne direkt auf der glomerulären Basalmembran aufgelagert und dort mit dieser verbunden. Die GBM-Podozyteninteraktion muss besonders stabil aber auch gleichzeitig flexibel sein, da die Verankerung der Podozyten in der GBM eine Voraussetzung für die Einhaltung eines exakten Abstandes zwischen benachbarten Podozyten an der Schlitzmembran darstellt. Außerdem muss der Podozyt gegen den transkapillären Ultrafiltrationsdruck im Glomerulus in der GBM verankert sein. Laminine sorgen für den Zusammenschluss zwischen den Basalmembranen. Sie interagieren mit Integrin, Dystroglykan und Proteoglykan. Die Verankerung der Podozyten in der GBM erfolgt ebenfalls über Integrin und Dystroglykan. Die Sekundärfortsätze der Podozyten sind über  $\alpha3\beta1$ -Integrin-Komplexe mit der Basalmembran verankert (Adler und Chen 1992, Korhonen et al. 1990).

Dystroglykane sind spezielle Muskelmoleküle, die nicht nur für die Adhärenz der Zellen an die glomeruläre Matrix, sondern auch für die Anordnung der Matrixmoleküle verantwortlich sind. Neben den Dystroglykanen ist auch das Cytoskelett der sekundären Podozyten-Fußfortsätze aus Actin-Filamenten mitverantwortlich für exakte Positionierung entlang der Schlitzmembran. Diese kontraktile Elemente könnten durch vasoaktive Substanzen wie Angiotensin II beeinflusst werden und auf den Ultrafiltrationskoeffizienten der Glomerula wirken.

Eine Ablösung der Podozyten von der GBM wird als ein Schlüsselereignis bei der Entwicklung der progredienten Glomerulosklerose angesehen. Eine Ursache für die Veränderungen der Podozytenfortsätze kann somit die gestörte Adhäsion der Podozyten an der GBM sein. Ein weiterer Aspekt ist die strukturelle Veränderung der GBM, an welcher die Podozyten nicht mehr so gut haften können wie zuvor (Barisoni und Mundel 2003). Die strukturelle Veränderung der GBM spielt vor allem beim Alport-Syndrom durch die Mutation des Kollagens eine wichtige Rolle. Die ultrastrukturelle Zusammensetzung der GBM ändert sich, indem die embryonalen Ketten eingebaut werden. Somit ist die GBM-Podozyteninteraktion gestört. Der Versuch der Reparatur über die vermehrte Expression von profibrotischen Faktoren, schlägt fehl. Veränderungen an der Podozyten-Schlitzmembran oder des podozytären Cytoskeletts führen zum Funktionsverlust der Filtrationsbarriere und hochmolekulare Proteine wie das Albumin können die Filtrationsbarriere passieren.

Diese zunächst kleineren Veränderungen an der podozytären Schlitzmembran gehen mit einer erhöhten Durchlässigkeit der Filtrationsbarriere und mit einem selektiven Austritt von Albumin in den Urin einher. Erst bei größeren Umstrukturierungen der Filtrationsbarriere kommt es zu einer unselektiven Proteinurie, bedingt durch die verminderte Fähigkeit der Rückresorption. Dies hat den Verlust weiterer Proteine zur Folge (Pavenstadt 2000).

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass Podozyten sowohl AT1- als auch AT2-Rezeptoren exprimieren (Durvasula et al. 2004, Wang et al. 2003). Das bedeutet, das Angiotensin II direkt auf den Podozyten wirken kann. Diese Wirkung ist unabhängig von der hämodynamischen Wirkung des Angiotensin II, da vergleichbare blutdrucksenkende Medikationen nicht die gleiche nephroprotektive Wirkung zeigen konnten wie ACE-Hemmer und AT1-Antagonisten (Kim und Iwao 2000).

Zudem ist bekannt, dass AT2-Rezeptoren verstärkt bei Gewebeschäden exprimiert werden. So könnten mehr AT Rezeptoren an den Podozyten exprimiert werden, wenn diese zu Grunde zu gehen drohen. Welche Wirkung der AT Rezeptor genau vermittelt, ist noch nicht geklärt und aktuelles Forschungsobjekt. Eine Blockade dieses Rezeptors durch ACE-Hemmer hat aber einen Einfluss auf die Podozytenfunktion. Womöglich werden weniger profibrotische Faktoren gebildet und der Fortschritt der Gomerulussklerose somit verlangsamt. Dies kann ein Hinweis auf mögliche Regenerationen einiger Abschnitte geben. Dies bedeutet, dass unter ACE-Hemmer-Therapie die Podozytenfunktion länger aufrechterhalten wird und es erst zu einem späteren Zeitpunkt zu einer Proteinurie kommt. Es würde auch erklären, warum unter Therapie die Proteomicmaps der gepoolten behandelten Mäuse weniger Proteine aufweisen als die unbehandelten Mäuse. Unter Behandlung werden die drei potenziellen Markerproteine Antithrombin III, Haptoglobin und Albumin weniger ausgeschieden, denn der Filtrationsschaden ist hier noch nicht so groß, wie bei den unbehandelten Mäusen. Die drei Proteine haben alle ein relativ großes Molekulargewicht, das heißt, sie werden auch bei kleinem Schaden relativ schnell, im Zeitverlauf früh, ausgeschieden. Das könnte bedeuten, dass es schon in einem frühen Krankheitsstadium möglich ist, eine Aussage über den möglichen Verlauf der Erkrankung und ebenso über den Verlauf der Therapie treffen zu können.

Im vierten Schritt der Pathogenese kommt es zur Akkumulation von extrazellulärer Matrix. Podozyten sind maßgeblich an der Synthese von extrazellulären Matrixproteinen für die GBM beteiligt und sind mitverantwortlich für die Strukturhaltung des Glomerulus. Ein Defekt der GBM führt reflektorisch zu einer verstärkten Synthese von Matrixproteinen (Kriz 1996) und führt zu einem fibrotischen Umbau des Glomerulus. Durch die Hemmung der Podozyten durch den ACE-Hemmer werden weniger extrazelluläre Matrixproteine gebildet und es kommt somit zur Verzögerung der Fibrose.

Im fünften Schritt erfolgt die Akkumulation und Aktivierung von Fibroblasten. Durch die verringerte Ausscheidung von Eiweißen kann die resultierende Freisetzung von chemotaktischen Substanzen und profibrotischen Zytokinen unterdrückt werden, die eine Entzündung im Tubulointerstitium mit anschließender tubulointerstitieller Fibrose verursacht (Wolf et al. 2003).

Im letzten Schritt steht die Regulierung über TGF- $\beta$  und Matrixmetalloproteinasen im Vordergrund. TGF- $\beta$  ist ein Wachstumsfaktor, der eine wichtige Rolle bei der embryonalen

Entwicklung der Differenzierung von Zellen und Geweben spielt. Der Mechanismus zur Aktivierung von TGF- $\beta$  bei Nierenerkrankungen ist nicht genau geklärt. Er gilt aber als entscheidender Faktor für die Vernarbungsreaktion. TGF- $\beta$  spielt eine bedeutende Rolle bei der Matrixsynthese in der Niere, indem es unter anderem die Produktion von Proteoglykanen und Kollagenen in Nierenzellen reguliert. TGF- $\beta$  stimuliert die Produktion von extrazellulärer Matrix in den Podozyten. Ablagerung von Matrix und die daraus entstehende Vernarbung werden von TGF- $\beta$  und CTGF reguliert. Der Verlust des Collagenrezeptor Integrin bewirkt einen Anstieg von TGF- $\beta$  und CTGF. Dadurch kommt es zu einer Verdickung der Basalmembran. Diese Veränderung der Basalmembran führt zur Proteinurie. TGF- $\beta$  führt am Podozyten zu einem Überwiegen der pro-apoptischen Signalkaskaden und darüber zu einem vermehrten Zelltod. Die TGF- $\beta$  Signaltransduktion in den Podozyten initiiert maßgeblich Podozytenschäden und führt zum Fortschreiten glomerulärer Erkrankungen. Die Schädigung oder der Untergang der Podozyten ist gekennzeichnet durch eine Verschmelzung der Fußfortsätze, das Verschwinden der Schlitzmembran und eine reflektorische Hypertrophie der Restpodozyten und partielle Vernarbung des Glomerulus (Neudecker et al. 2010). In Studien wurde gezeigt, dass auch Angiotensin II die Aktivierung von TGF- $\beta$  induzieren kann (Hugo et al. 1998). Bewirken ACE-Hemmer eine verminderte Aktivierung von Angiotensin II, so wird auch die Aktivierung von TGF- $\beta$  vermindert, so lässt sich schlussfolgern, dass es durch eine verminderte TGF- $\beta$ -Bildung zu einer verminderten Apoptose der Podozyten und zu weniger Produktion der extrazellulärer Matrix und damit zu einer Reduktion der Fibrose kommt. Die Podozyten werden in ihrer Funktion beeinträchtigt. Zum einen direkt über die Expression von AT1- und AT2-Rezeptoren, so dass weniger Angiotensin II weniger Wirkung zeigt. Und zum anderen indirekt, über eine verminderte Aktivierung von TGF- $\beta$  kommt es zu weniger Podozytenverlust. Durch die ACE-Hemmer wird die normale Podozytenfunktion länger aufrechterhalten und die Filtrationsbarriere bleibt länger intakt. Die Gele der mit ACE-Hemmer behandelten Mäuse zeigen eine Verringerung der Ausscheidung der Proteine Albumin, Antithrombin III und Haptoglobin, die als potentielle Markerkandidaten in Betracht kommen. In Abbildung 36, Abbildung 37, Abbildung 62 und Abbildung 63 wird das gewünschte charakteristische Verhalten der Proteine als potentielle Markerkandidaten sichtbar.

## 5. Fazit

Beim Alport-Syndrom mit dem Krankheitssymptom Proteinurie wurden in dieser Studie am Mausmodell durch Proteomanalysen aus über 150 Proteinen schrittweise 6 Proteine aus dem Urin herausgestellt, die als Prognosemarkerkandidaten fungieren könnten. Alle sechs Marker Kandidaten bestätigen die Diagnose der Krankheit Alport-Syndrom und den progredienten Krankheitsverlauf durch ansteigende Markerwerte.

Welche Aussagen liefern diese sechs Marker über den Therapieerfolg und Therapieverlauf unter ACE-Hemmer-Therapie mit *Ramipril*?

Im Therapieverlauf ist ein einheitliches Verhalten der Proteine aufgrund der Unterschiede in ihrer Bedeutung, Ladung und Größe nicht zu erwarten. Eine Betrachtung der Gesamtproteinmenge im Vergleich zum Krankheitsverlauf ist nicht ausreichend aussagefähig, da keine Heilung, sondern eine Verzögerung des Krankheitsverlaufes erfolgt und die Markerwerte nur optimalerweise alle abfallen.

Nur zwei Marker Kandidaten zeigen sowohl den Krankheitsverlauf als auch den Therapieverlauf charakteristisch an und sind damit klinisch relevant beim Markieren des Erfolges der *Ramipril* - Therapie. Das Verhalten von vier Marker Kandidaten scheint nicht geeignet, signifikante Aussagen über pathophysiologische Veränderungen während der Therapie zu ermöglichen.

Hat Haptoglobin das Potential eines „Regenerierungsmarkers“ aufgrund des stärksten Rückganges unter Therapie und weil er nach Entzündungen die Gewebshomöostase wiederherstellt?

Albumin als etablierter renaler Krankheitsmarker zeigt in sehr frühen Alport Syndrom-Therapiephasen Albuminurie und damit Potential als „glomerulärer Frühschadensmarker“, der auch unter *Ramipril* - Therapie im Verlauf abnimmt.

Die in dieser Studie identifizierten Marker Kandidaten Albumin, Haptoglobin und Antithrombin III vereinigen aussagefähiges Referenzverhalten der drei Markertypen ( Krankheitsverlauf, Therapieerfolg, Therapieverlauf ) in je einem Kandidaten in der *Ramipril* - Therapie der Krankheitsphasen 2 und 3 am Mausmodell.

Aufgrund dieser Studienlage ist eine kontrollierbare Übertragung der *Ramipril* - Therapie auf kindliche und jugendliche Patienten verschiedener Alport Syndrom - Typen im Rahmen der Zulassungsstudie „EARLY PROTECT Alport – Optimaler früher Therapiebeginn zur Verzögerung der Niereninsuffizienz und Medikamentensicherheit bei Kindern mit der erblichen Erkrankung Alport Syndrom: ACE-Hemmer *Ramipril* versus Placebo“ erfolversprechend. Sie erlaubt nicht nur die nichtinvasive Feststellung des Therapieerfolges im Sinne von Ja / Nein, sondern auch Aussagen zum Therapieverlauf bei eventuellen Dosisanpassungen für nicht erwachsene Patienten, sowie einen kontrollierten Therapiebeginn in frühen und späten Krankheitsstadien und unterschiedlichen Patientenalters.

Junge Patienten haben eine bedeutend längere und verbesserte Lebensqualität zu erwarten.



## 6. Zusammenfassung

Das Alport-Syndrom ist eine progressive hereditäre Nephropathie, die mit Hämaturie und Proteinurie, Innenohrschwerhörigkeit, typischen Augenveränderungen sowie charakteristischen Veränderungen der glomerulären Basalmembran einhergeht und im weiteren Verlauf zur chronisch progredienten Nierenfibrose und zur terminalen Niereninsuffizienz führt (Gross und Kashtan 2009).

Der Gendefekt im Kollagen Typ IV der glomerulären Basalmembran führt zu einem fibrotischen Umbau der Niere und damit zum Verlust der Filtrationsfunktion. Der Therapieerfolg von ACE-Hemmern beim Alport-Syndrom konnte sowohl anhand von Tierstudien, als auch durch die Auswertung des seit 2006 geführten europäischen Patientenregisters nachgewiesen werden (Gross et al. 2003, Gross et al. 2012b). Diese Erfolge führten dazu, dass die ACE-Hemmer-Therapie mit *Ramipril* heute bei Kindern mit Alport-Syndrom weltweit Standard-off label - Therapie geworden ist.

Ziel der Arbeit war es, potentielle nichtinvasive Biomarker im Urin bei knockout-Mäusen unter nephroprotektiver Therapie mit dem ACE-Hemmer *Ramipril* bei chronischer Nierenfibrose am Beispiel des Alport-Syndroms zu identifizieren. Die nachgewiesenen spezifischen Proteinexpressionsmuster bei Behandlung mit *Ramipril* dienten als Basis zur Identifizierung spezifischer Marker, welche sich in Krankheitsverlaufsmarker, Therapieerfolgsmarker und Therapieverlaufsmarker unterscheiden lassen. Ein Markerkandidat, der möglichst die drei Markertypen in sich vereint, sollte gefunden werden.

Mit proteomicsbasierten Methoden wurden Proteine als mögliche Markerkandidaten aus dem Mausurin herausgefiltert. Von den erhaltenen Fraktionen wurden diejenigen mittels Westernblot weiter analysiert, welche signifikante Unterschiede zwischen den Proteinkonzentrationen der Mäuse mit und der Mäuse ohne ACE-Hemmer-Therapie aufwiesen. Hierzu wurden sechs Biomarkerkandidaten, Amyloid-Precursor, Antithrombin III, Haptoglobin, Parvalbumin, Plasminogen und Serpin A3K, betrachtet. Die ausgewählten Proteine, die schon in vorangegangenen Studien das Krankheitsbild von Alport-Syndrom dokumentierten, bestätigen sich in dieser Arbeit.

Das Verhalten der Proteine ist unterschiedlich bezüglich ihrer Ausscheidung unter ACE-Hemmer-Therapie und ist abhängig von ihrer Ladung, Größe und Bedeutung. Die Proteine Antithrombin III und Haptoglobin bildeten den Krankheitsverkauf, den Therapieerfolg und den Therapieverlauf adäquat ab und würden sich als potentielle Markerkandidaten eignen.

Eine besondere Rolle wurde Albumin zugesprochen. Albumin im Urin zählt bei Nierenerkrankungen als Frühmarker, da es bereits schon bei Mikroproteinurie ausgeschieden wird, dies konnte auch beim Alport-Syndrom bestätigt werden.

Allgemein lässt sich formulieren, je positiver ein Protein geladen ist, desto besser wird es bei intakter GBM filtriert. Geht die Struktur der GBM und somit ihre negative Ladung verloren, werden die positiv geladenen Proteine weniger filtriert. Die negativ geladenen Proteine, welche zuvor bei intakter GBM von dieser abgestoßen wurden, werden bei Funktionsverlust der GBM mehr filtriert.

Damit ACE-Hemmer den Progress des Alport-Syndroms verzögern können, müssen sie an einem der sechs Schritte der Pathogenese ansetzen (Gross und Weber 2005). Der Verlust der Podozytenfunktion, welcher mit Verlust der Filtrationsfunktion der glomerulären Basalmembran einhergeht, wird hier als Schlüsselereignis betrachtet. Eine Ursache für den Funktionsverlust ist die gestörte Adhäsion der Podozyten an der GBM durch deren strukturelle Veränderung hervorgerufen durch die Kollagenmutation.

Ein weiterer wichtiger Aspekt der ACE-Hemmer-Wirkung ist, dass Podozyten sowohl AT1- als auch AT2-Rezeptoren exprimieren (Durvasula et al. 2004, Wang et al. 2003). Das bedeutet, dass Angiotensin II direkt auf den Podozyten wirken kann. Zudem ist bekannt, dass AT2-Rezeptoren verstärkt bei Gewebeschaden exprimiert werden. So könnten mehr AT-Rezeptoren an den Podozyten exprimiert werden, wenn diese zu Grunde zu gehen drohen. Eine Blockade dieses Rezeptors durch ACE-Hemmer hat aber einen Einfluss auf die Podozytenfunktion.

TGF- $\beta$  führt am Podozyten zu einem Überwiegen der pro-apoptischen Signalkaskaden und darüber zu einem vermehrten Zelltod. Es wurde gezeigt, dass die TGF- $\beta$ -Signaltransduktion in Podozyten maßgeblich Podozytenschäden initiiert und zum Fortschreiten glomerulärer Erkrankungen führt. Es konnte in Studien gezeigt werden, dass auch Angiotensin II die Aktivierung von TGF- $\beta$  induzieren kann (Hugo et al. 1998). Bewirken ACE-Hemmer eine verminderte Aktivierung von Angiotensin II, so wird auch die Aktivierung von TGF- $\beta$  vermindert, so lässt sich schlussfolgern, dass es durch eine verminderte TGF- $\beta$  Bildung zu einer verminderten Apoptose der Podozyten und zu weniger Produktion von extrazellulärer Matrix und damit zu einer Reduktion der Fibrose kommt.

Durch die ACE-Hemmer wird die normale Podozytenfunktion länger aufrechterhalten und die Filtrationsbarriere bleibt länger intakt. Dies lässt sich auch anhand der Ergebnisse der drei Markerkandidaten Albumin, Antithrombin III und Haptoglobin sehen.

Die identifizierten Markerkandidaten Albumin, Antithrombin III und Haptoglobin gelten für das Mausmodell des Alport-Syndroms. Anhand von Urin von Patienten mit Alport-Syndrom müssen diese Marker validiert und bestätigt werden.

Innerhalb der Zulassungsstudie „EARLY PROTECT“ (Gross et al. 2012b) können diese Marker anhand des Urins der Kinder mit und ohne Behandlung untersucht werden und somit später eine Möglichkeit sein, den Krankheitsverlauf, Therapieerfolg und Therapieverlauf bei am Alport-Syndrom erkrankten Kindern zu verfolgen.

Eine medikamentöse Prävention beim Alport-Syndrom schon im frühen Kindesalter verzögert die Fibrose und somit den Fortschritt der Erkrankungen und die Patienten haben eine längere verbesserte Lebensqualität zu erwarten.

## 7. Publikation zum Thema der Dissertation

Das Poster „Evaluation von diagnostischen Frühmarkern vor dem Auftreten der Mikroalbuminurie und von Therapiemarkern im COL4A3-knockout Tiermodell der chronisch progredienten Nierenfibrose“ wurde auf dem Deutschen Internistenkongress in Wiesbaden im April 2012, dem Deutschen Nephrologenkongress in Hamburg im September 2012 und dem Europäischen Nephrologenkongress ERA-EDTA in Paris 2012 präsentiert.

Posterabstrakt:

### **Evaluation von diagnostischen Frühmarkern vor dem Auftreten der Mikroalbuminurie und von Therapiemarkern im COL4A3-knockout Tiermodell der chronisch progredienten Nierenfibrose**

Oliver Gross, Diana Rubel, Gry H. Dihazi, Asimal Bibi, Johanna Temme, Imke Schmidt-Eylers, Lydia Wiemer, Gerhard-Anton Müller, Hassan Dihazi

Abt. Nephrologie&Rheumatologie, Universitätsmedizin Göttingen, Göttingen

**Einführung:** Die erbliche Nierenerkrankung Alport Syndrom führt durch eine progrediente Nierenfibrose unbehandelt im jungen Alter zur Dialyse. ACE-Hemmer verzögern das Nierenversagen – abhängig vom Therapiestart – um Jahrzehnte hinaus und verbessern so die Lebenserwartung der Patienten. Dies erhöht den Druck auf eine frühzeitige Diagnose bei noch oligosymptomatischen Kindern. In der aktuellen Studie suchten wir daher im Alport Mausmodell nach Frühmarkern noch vor Auftreten der Mikroalbuminurie und Therapiemarkern.

**Methoden:** Ein Teil der Alport-Mäuse wurde ab der 4. Woche mit 10mg/kg Körpergewicht Ramipril therapiert. Mittels differential 2D gel electrophoresis (DIGE) wurden Urinproteine von Alport Mäusen im präklinischen Stadium der Nierenfibrose und von therapierten Mäusen nach Molekulargewicht und Ladung aufgetrennt und mit gesunden Kontrollen verglichen. Aus den über 200 auffälligen Punkten im DIGE wurden differentiell exprimierte Proteine mittels Massenspektroskopie identifiziert und durch Western Blot validiert.

**Ergebnisse:** Noch vor dem Beginn einer Mikroalbuminurie scheiden die Alport Mäuse für die Erkrankung möglicherweise charakteristische niedermolekulare, aber auch hochmolekulare Proteine im Urin aus: im DIGE und Western Blot sind beispielsweise Plasminogen, Antithrombin III, Parvalbumin, Serpin A3K, Haptoglobin und das Amyloid Precursor Protein 1 mindestens 5-fach hochreguliert im Vergleich zu gesunden Kontrollen.

**Schlussfolgerungen:** Im Alport-Tiermodell konnten wir erstmals für die Erkrankung spezifische Frühmarker noch vor dem Auftreten der Mikroalbuminurie finden. Diese Marker könnten bei Kindern mit Alport Syndrom der Frühdiagnose noch vor dem Auftreten eines strukturellen Nierenschadens dienen und so eine frühzeitige nephroprotektive Therapie ermöglichen. Die Marker haben zudem das Potential, ohne Nierenbiopsie das erfolgreiche Ansprechen der Therapie zu messen. Die Marker werden nun prospektiv im Rahmen der EARLY PRO-TECT Alport Studie bei 120 Kindern mit Alport Syndrom untersucht.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACE-Hemmer	Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmer
ACN	Acetonitril
Ambic	Ammoniumperoxiddisulfat
AS	Alport-Syndrom
AT III	Antithrombin III
BSA	Bovines Serum-Albumin
CAPS	Chloramphenicol
CTGF	<i>Connective Tissue Growth Factor</i>
2D	zwei-dimensional
Da	Dalton
DIGE	Differentielle Gel-Elektrophorese
DTT	Dithiothreitol
ESI-Q-TOF MS	<i>Electro Spray Ionisation-Time-of-Flight Mass Spectrometry</i>
GBM	glomeruläre Basalmembran
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
kDa	kiloDalton
LPG-Streifen	Immobilisierte pH-Gradienten-Streifen
MALDI	<i>Matrix-assisted Laser desorption/Ionization</i>
MALDI-TOF MS	<i>Matrix-assisted Laser desorption/Ionization Time-of-Flight Massenspektrometrie</i>
MW	<i>Molecular Weight</i>
Pas-Färbung	Periodic acid-Schiff -Färbung
pH	potentia Hydrogenii
pI	Isoelektrischer Punkt
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UMG	Universitätsmedizin Göttingen
z. B.	zum Beispiel

## 9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Aufbau eines Nephrons .....	3
Abbildung 2 Aufbau Filtrationsschranke (li) und sklerosiertes Gomerulum (re) nach Ingelfinger (2003 S.99) .....	4
Abbildung 3 Podozyt mit Fortsätzen .....	4
Abbildung 4 Systematik der Glomerulonephritiden .....	5
Abbildung 5 Systematik der Proteinurien .....	6
Abbildung 6 Diagnostik des Alport-Syndroms.....	7
Abbildung 7 Beispielstammbaum für das .....	8
Abbildung 8 Beispielstammbaum für das autosomal rezessive Alport-Syndrom.....	8
Abbildung 9 Häufigkeit der Vererbungsmodi beim Alport-Syndrom.....	8
Abbildung 10 Pathogenese der Nierenfibrose beim Alport-Syndrom und daraus resultierende Ansatzpunkte zur Nephroprotektion aus Gross und Weber (2005 S.830) .....	9
Abbildung 11 Aufbau und Organisation eines Typ IV Kollagens des glomerulären Basalmembran.....	10
Abbildung 12 Therapieerfolg ACE-Hemmer bei Alport-Syndrom aus Gross et al. (2012b S.498) .....	12
Abbildung 13 Signalkaskade des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems.....	13
Abbildung 14 HE-Schnitt 6 Wochen ohne <i>Ramipril</i> .....	34
Abbildung 15 HE-Schnitt 6 Wochen mit <i>Ramipril</i> .....	34
Abbildung 16 HE-Schnitt 7,5 Wochen ohne <i>Ramipril</i> .....	34
Abbildung 17 HE-Schnitt 7,5 Wochen mit <i>Ramipril</i> .....	34
Abbildung 18 PAS-Schnitt 6 Wochen ohne <i>Ramipril</i> .....	35
Abbildung 19 PAS-Schnitt 6 Wochen mit <i>Ramipril</i> .....	35
Abbildung 20 PAS-Schnitt 7,5 Wochen ohne <i>Ramipril</i> .....	35
Abbildung 21 PAS-Schnitt 7,5 Wochen mit <i>Ramipril</i> .....	35
Abbildung 22 Versuchsaufbau .....	36
Abbildung 23 Proteommap 6 Wochen Placebo .....	38
Abbildung 24 Proteommap des 6-Wochen-ACE-Hemmerstadiums .....	41
Abbildung 25 Proteommap des 7,5-Wochen-Placebostadiums .....	43
Abbildung 26 Proteommap des 7,5-Wochen-ACE-Hemmerstadiums .....	45
Abbildung 27 Überlappung der Proteomprofile der 6-Wochen-Placebo- und 6-Wochen-ACE- Hemmerstadien.....	46
Abbildung 28 Überlappung der Proteomprofile der 7,5-Wochen-Placebo- und 7,5-Wochen- ACE-Hemmerstadien .....	47
Abbildung 29 Überlappung der Proteomprofile der 6-Wochen-Placebo- und 7,5-Wochen- Placebostadien .....	48
Abbildung 30 Überlappung der Proteomprofile der 6-Wochen-ACE-Hemmer- und 7,5- Wochen-ACE-Hemmerstadien .....	49
Abbildung 31 Proteomprofil der 6-Wochen-Placebo- und 6-Wochen-ACE-Hemmerstadien .	50
Abbildung 32 Proteomprofil der 7,5-Wochen-Placebo- und 7,5-Wochen-ACE-Hemmerstadien .....	51
Abbildung 33 Proteomprofil mit markierten Spots .....	52
Abbildung 34 Darstellung der Expressionsunterschiede von Amyloid-Precursor mit und ohne Behandlung im 6-Wochen- und 7,5-Wochen-Stadium. ....	53

---

Abbildung 35 Darstellung der Expressionsunterschiede von Antithrombin III mit und ohne Behandlung im 6-Wochen- und 7,5-Wochenstadium. ....	53
Abbildung 36 Darstellung der Expressionsunterschiede von Haptoglobin mit und ohne Behandlung im 6-Wochen- und 7,5-Wochen-Stadium. ....	54
Abbildung 37 Darstellung der Expressionsunterschiede von Parvalbumin mit und ohne Behandlung im 6-Wochen- und im 7,5-Wochen-Stadium. ....	54
Abbildung 38 Darstellung der Expressionsunterschiede von Plasminogen mit und ohne Behandlung im 6-Wochen- und im 7,5-Wochen-Stadium. ....	54
Abbildung 39 Darstellung der Expressionsunterschiede von Serpin A3K mit und ohne Behandlung im 6-Wochen- und 7,5-Wochen-Stadium. ....	54
Abbildung 40 Darstellung der Expressionsunterschiede von Amyloid-Precursor ohne Behandlung im 6-Wochen- und 7,5-Wochen-Stadium. ....	55
Abbildung 41 Darstellung der Expressionsunterschiede von Antithrombin III ohne Behandlung im 6-Wochen- und 7,5-Wochen-Stadium. ....	55
Abbildung 42 Darstellung der Expressionsunterschiede von Haptoglobin ohne Behandlung im 6-Wochen- und 7,5-Wochen-Stadium. ....	56
Abbildung 43 Darstellung der Expressionsunterschiede von Parvalbumin ohne Behandlung im 6-Wochen- und 7,5-Wochen-Stadium. ....	56
Abbildung 44 Darstellung der Expressionsunterschiede von Antithrombin ohne Behandlung im 6 und 7,5 Wochen Stadium. ....	56
Abbildung 45 Darstellung der Expressionsunterschiede von Plasminogen ohne Behandlung im 6 und 7,5 Wochen Stadium. ....	56
Abbildung 46 Darstellung der Expressionsunterschiede von Amyloid-Precursor mit Behandlung im 6-Wochen- und 7,5-Wochen-Stadium. ....	57
Abbildung 47 Darstellung der Expressionsunterschiede von Antithrombin III mit Behandlung im 6 und 7,5 Wochen Stadium. ....	57
Abbildung 48 Darstellung der Expressionsunterschiede von Haptoglobin mit Behandlung im 6-Wochen- und 7,5-Wochen-Stadium. ....	57
Abbildung 49 Darstellung der Expressionsunterschiede von Parvalbumin mit Behandlung im 6-Wochen- und 7,5-Wochen-Stadium. ....	57
Abbildung 50 Darstellung der Expressionsunterschiede von Plasminogen mit Behandlung im 6-Wochen und 7,5-Wochen-Stadium. ....	57
Abbildung 51 Darstellung der Expressionsunterschiede von Serpin A3K mit Behandlung im 6-Wochen- und 7,5-Wochen-Stadium. ....	57
Abbildung 52 Westernblot für Antithrombin III im 6-Wochen-Stadium ....	59
Abbildung 53 Westernblot für Antithrombin III 7,5-Wochen-Stadium ....	59
Abbildung 54 Westernblot für Haptoglobin im 6-Wochen-Stadium ....	60
Abbildung 55 Westernblot für Haptoglobin im 7,5-Wochen-Stadium ....	60
Abbildung 56 Westernblot für Parvalbumin im 6-Wochen-Stadium. ....	61
Abbildung 57 Westernblot für Parvalbumin im 7,5-Wochen-Stadium. ....	61
Abbildung 58 Westernblot für Plasminogen im 6-Wochen-Stadium ....	62
Abbildung 59 Westernblot für Plasminogen im 7,5-Wochen-Stadium ....	62
Abbildung 60 Westernblot für Serpin A3K im 6-Wochen-Stadium. ....	63
Abbildung 61 Westernblot für Serpin A3K im 7,5-Wochen-Stadium. ....	63
Abbildung 62 2D-Westernblot für Albumin im 4,5-Wochen-Placebostadium und 4,5-Wochen-ACE-Hemmerstadium. ....	65
Abbildung 63 2D-Westernblot für Albumin im 6-Wochen-Placebostadium und 6-Wochen-ACE-Hemmerstadium. ....	66

## 10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Phasen einer klinischen Studie .....	1
Tabelle 2 Chronic Kidney Disease Stadien aus Kasiske (2003 S.10) .....	6
Tabelle 3 Diagnosekriterien Alport-Syndrom aus (Gross et al. 2004a).....	7
Tabelle 4 Typen des X-chromosomalen Alport-Syndroms (Gross et al. 2002, Jais et al. 2003). 9	
Tabelle 5 Spannungsschritte bei der Isoelektrischen Fokussierung .....	24
Tabelle 6 Spannungsschritte Isoelektrische Fokussierung DIGE .....	25
Tabelle 7 Parameter zum Abgleich der MS-spektren mit der Swis-Prot Proteindatenbank ...	28
Tabelle 8 Antikörper in verwendeter Verdünnung .....	30
Tabelle 9 Spannungsschritte Isoelektrische Fokussierung 2D-Westernblot.....	30
Tabelle 10 Liste aller identifizierten Proteine aus Mäuse-Urinproteom im 6-Wochen- Placebostadium gemessen mit MALDI-TOF MS und ESI MS/MS. ....	39
Tabelle 11 Liste aller identifizierten Proteine des Mäuse-Urinproteom im 6-Wochen-ACE- Hemmerstadiums gemessen mit MALDI-TOF MS und ESI MS/MS.....	41
Tabelle 12 Liste aller identifizierten Proteine aus Mäuse-Urinproteom des 7,5-Wochen- Placebostadiums gemessen mit MALDI-TOF MS und ESI MS/MS. ....	44
Tabelle 13 Liste aller identifizierten Proteine aus Mäuse-Urinproteom des 7,5-Wochen-ACE- Hemmerstadiums gemessen mit MALDI-TOF MS und ESI MS/MS.....	45
Tabelle 14 Regulation der sechs Proteine im Vergleich behandelt und unbehandelt anhand der Quantifizierung der 2D Gele .....	64
Tabelle 15 Regulation der sechs Proteine im Vergleich Placebo im 6-Wochen- und 7,5- Wochen-Stadium und ACE-Hemmer im 6-Wochen- und 7,5-Wochen-Stadium anhand der Quantifizierung der 2D Gele .....	64
Tabelle 16 Regulation der fünf Proteine im Vergleich behandelt und unbehandelt anhand der Quantifizierung der Westernblots .....	64

---

## 11. Literaturverzeichnis

**Abrahamson DR, Prettyman AC, Robert B, St John PL (2003):** Laminin-1 reexpression in Alport mouse glomerular basement membranes. *Kidney Int* 63, 826-834

**Adler S, Chen X (1992):** Anti-Fx1A antibody recognizes a beta 1-integrin on glomerular epithelial cells and inhibits adhesion and growth. *Am J Physiol* 262, F770-776

**Alport AC (1927):** Hereditary familial congenital haemorrhagic nephritis. *Br Med J* 1, 504-506

**Arnott EJ, Crawford MD, Toghil PJ (1966):** Anterior lenticonus and Alport's syndrome. *Br J Ophthalmol* 50, 390-403

**Barisoni L, Mundel P (2003):** Podocyte biology and the emerging understanding of podocyte diseases. *Am J Nephrol* 23, 353-360

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

**Berkova N, Gilbert C, Goupil S, Yan J, Korobko V, Naccache PH (1999):** TNF-induced haptoglobin release from human neutrophils: pivotal role of the TNF p55 receptor. *J Immunol* 162, 6226-6232

**Bradford MM (1976):** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254

**Chen D, Jefferson B, Harvey SJ, Zheng K, Gartley CJ, Jacobs RM, Thorner PS (2003):** Cyclosporine a slows the progressive renal disease of alport syndrome (X-linked hereditary nephritis): results from a canine model. *J Am Soc Nephrol* 14, 690-698

**Cosgrove D (2012):** Glomerular pathology in Alport syndrome: a molecular perspective. *Pediatr Nephrol* 27, 885-890

**Cosgrove D, Meehan DT, Grunkemeyer JA, Kornak JM, Sayers R, Hunter WJ, Samuelson GC (1996):** Collagen COL4A3 knockout: a mouse model for autosomal Alport syndrome. *Genes Dev* 10, 2981-2992

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

**Cosgrove D, Kalluri R, Miner JH, Segal Y, Borza DB (2007):** Choosing a mouse model to study the molecular pathobiology of Alport glomerulonephritis. *Kidney Int* 71, 615-618

**de Hoog CL, Mann M (2004):** Proteomics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 5, 267-293



**Dihazi H, Dihazi GH, Nolte J, Meyer S, Jahn O, Muller GA, Engel W (2009):** Multipotent adult germline stem cells and embryonic stem cells: comparative proteomic approach. *J Proteome Res* 8, 5497-5510

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

**Flinter FA, Cameron JS, Chantler C, Houston I, Bobrow M (1988):** Genetics of classic Alport's syndrome. *Lancet* 1988,2, 1005-1007

**Gloy J, Henger A, Fischer KG, Nitschke R, Bleich M, Mundel P, Schollmeyer P, Greger R, Pavenstadt H (1998):** Angiotensin II modulates cellular functions of podocytes. *Kidney Int Suppl* 67, S168-170

**Greer KA, Higgins MA, Cox ML, Ryan TP, Berridge BR, Kashtan CE, Lees GE, Murphy KE (2006):** Gene expression analysis in a canine model of X-linked Alport syndrome. *Mamm Genome* 17, 976-990

**Gross O, Weber M (2005):** [From the molecular genetics of Alport's syndrome to principles of organo-protection in chronic renal diseases]. *Med Klin (Munich)* 100, 826-831

**Gross O, Kashtan CE (2009):** Treatment of Alport syndrome: beyond animal models. *Kidney Int* 76, 599-603

**Gross O, Netzer KO, Lambrecht R, Seibold S, Weber M (2002):** Meta-analysis of genotype-phenotype correlation in X-linked Alport syndrome: impact on clinical counselling. *Nephrol Dial Transplant* 17, 1218-1227

**Gross O, Beirowski B, Koepke ML, Kuck J, Reiner M, Addicks K, Smyth N, Schulze-Lohoff E, Weber M (2003):** Preemptive ramipril therapy delays renal failure and reduces renal fibrosis in COL4A3-knockout mice with Alport syndrome. *Kidney Int* 63, 438-446

**Gross O, Schulze-Lohoff E, Koepke ML, Beirowski B, Addicks K, Bloch W, Smyth N, Weber M (2004a):** Antifibrotic, nephroprotective potential of ACE inhibitor vs AT1 antagonist in a murine model of renal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant* 19, 1716-1723

**Gross O, Beirowski B, Harvey SJ, McFadden C, Chen D, Tam S, Thorner PS, Smyth N, Addicks K, Bloch W et al (2004b):** DDR1-deficient mice show localized subepithelial GBM thickening with focal loss of slit diaphragms and proteinuria. *Kidney Int* 66, 102-111

**Gross O, Koepke ML, Beirowski B, Schulze-Lohoff E, Segerer S, Weber M (2005):** Nephroprotection by antifibrotic and anti-inflammatory effects of the vasopeptidase inhibitor AVE7688. *Kidney Int* 68, 456-463

**Gross O, Friede T, Hilgers R, Gorlitz A, Gavenis K, Ahmed R, Durr U (2012a):** Safety and Efficacy of the ACE-Inhibitor Ramipril in Alport Syndrome: The Double-Blind, Randomized,

---

Placebo-Controlled, Multicenter Phase III EARLY PRO-TECT Alport Trial in Pediatric Patients. ISRN *Pediatr* 2012, 436046

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

**Gubler M (2008)**: Inherited diseases of the glomerular basement membrane. *Nat Clin Pract Nephrol* 4, 24-37

**Gubler M, 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. *Am J Med* 70, 493-505

**Heidet L, Borza DB, Jouin M, Sich M, Mattei MG, Sado Y, Hudson BG, Hastie N, Antignac C, Gubler MC (2003)**: A human-mouse chimera of the alpha3alpha4alpha5(IV) collagen protomer rescues the renal phenotype in Col4a3<sup>-/-</sup> Alport mice. *Am J Pathol* 163, 1633-1644

**Hortin GL (2006)**: The MALDI-TOF mass spectrometric view of the plasma proteome and peptidome. *Clin Chem* 52, 1223-1237

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

**Hugo C, Shankland SJ, Pichler RH, Couser WG, Johnson RJ (1998)**: Thrombospondin 1 precedes and predicts the development of tubulointerstitial fibrosis in glomerular disease in the rat. *Kidney Int* 53, 302-311

**Ingelfinger JR (2003)**: Is microanatomy destiny? *N Engl J Med* 348, 99-100

**Jais JP, Knebelmann B, Giatras I, De Marchi M, Rizzoni G, Renieri A, Weber M, Gross O, Netzer KO, Flinter F et al (2003)**: X-linked Alport syndrome: natural history and genotype-phenotype correlations in girls and women belonging to 195 families: a "European Community Alport Syndrome Concerted Action" study. *J Am Soc Nephrol* 14, 2603-2610

**Kashtan CE (1999a)**: Alport syndrome: is diagnosis only skin-deep? *Kidney Int* 55, 1575-1576

**Kashtan CE (1999b)**: Alport syndrome. An inherited disorder of renal, ocular, and cochlear basement membranes. *Medicine (Baltimore)* 78, 338-360

**Kashtan CE (2005)**: Familial hematurias: what we know and what we don't. *Pediatr Nephrol* 20, 1027-1035

**Kashtan CE (2006)**: Renal transplantation in patients with Alport syndrome. *Pediatr Transplant* 10, 651-657

**Kashtan CE, Kim Y (1992)**: Distribution of the alpha 1 and alpha 2 chains of collagen IV and of collagens V and VI in Alport syndrome. *Kidney Int* 42, 115-126

**Kashtan CE, Michael AF (1996):** Alport syndrome. *Kidney Int* 50, 1445-1463

**Kasiske B, Blanche C, Mark R, Robert F, Suzanne S (2003):** Clinical Practice Guidelines for Bone Metabolism and Disease in Chronic Kidney Disease. *American Journal of Kidney Disease* 42, 1-201

**Kerjaschki D, Sharkey DJ, Farquhar MG (1984):** Identification and characterization of podocalyxin--the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell. *J Cell Biol* 98, 1591-1596

**Killingsworth LM (1982):** Clinical applications of protein determinations in biological fluids other than blood. *Clin Chem* 28, 1093-1102

**Kim S, Iwao H (2000):** Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev* 52, 11-34

**Koepke ML (2005):** Antifibrotic effect of the HMG-CoA-reductase inhibitor cerivastatin in a mouse model of progressive renal fibrosis. *Kidney Int* 2005:in press

**Koepke ML, Weber M, Schulze-Lohoff E, Beirowski B, Segerer S, Gross O (2007):** Nephroprotective effect of the HMG-CoA-reductase inhibitor cerivastatin in a mouse model of progressive renal fibrosis in Alport syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 22, 1062-1069

**Korhonen M, Ylanne J, Laitinen L, Virtanen I (1990):** The alpha 1-alpha 6 subunits of integrins are characteristically expressed in distinct segments of developing and adult human nephron. *J Cell Biol* 111, 1245-1254

**Kriz W (1996):** Progressive renal failure--inability of podocytes to replicate and the consequences for development of glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 11, 1738-1742

**Laemmli UK (1970):** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685

**Langlois MR, Delanghe JR (1996):** Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clin Chem* 42, 1589-1600

**Lee Sa (2004):** Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches. *J Biochem Mol Biol* 37, 35-44

**Lees GE, Helman RG, Kashtan CE, Michael AF, Homco LD, Millichamp NJ, Ninomiya Y, Sado Y, Naito I, Kim Y (1998):** A model of autosomal recessive Alport syndrome in English cocker spaniel dogs. *Kidney Int* 54, 706-719

**Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD (1993):** The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N Engl J Med* 329, 1456-1462

**Melican K, Sandoval RM, Kader A, Josefsson L, Tanner GA, Molitoris BA, Richter-Dahlfors A (2011):** Uropathogenic Escherichia coli P and Type 1 fimbriae act in synergy in a living host to facilitate renal colonization leading to nephron obstruction. *PLoS Pathog* 7, e1001298

**Mezzano SA, Ruiz-Ortega M, Egido J (2001):** Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension* 38, 635-638

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

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

**Muller GA, Muller CA, Dihazi H (2007):** Clinical proteomics--on the long way from bench to bedside? *Nephrol Dial Transplant* 22, 1297-1300

**Neudecker S, Walz R, Menon K, Maier E, Bihoreau MT, Obermuller N, Kranzlin B, Gretz N, Hoffmann SC (2010):** Transgenic overexpression of Anks6(p.R823W) causes polycystic kidney disease in rats. *Am J Pathol* 177, 3000-3009

**Ninichuk V, Gross O, Reichel C, Khandoga A, Pawar RD, Ciubar R, Segerer S, Belemezova E, Radomska E, Luckow B et al (2005):** Delayed chemokine receptor 1 blockade prolongs survival in collagen 4A3-deficient mice with Alport disease. *J Am Soc Nephrol* 16, 977-985

**Pavenstadt H (1998):** The charge for going by foot: modifying the surface of podocytes. *Exp Nephrol* 6, 98-103

**Pavenstadt H (2000):** Roles of the podocyte in glomerular function. *Am J Physiol Renal Physiol* 278, F173-179

**Peng J, Gygi SP (2001):** Proteomics: the move to mixtures. *J Mass Spectrom* 36, 1083-1091

**Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS (1999):** Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20, 3551-3567

**Pescucci C, Mari F, Longo I, Vogiatzi P, Caselli R, Scala E, Abaterusso C, Gusmano R, Seri M, Miglietti N et al (2004):** Autosomal-dominant Alport syndrome: natural history of a disease due to COL4A3 or COL4A4 gene. *Kidney Int* 65, 1598-1603

**Polticelli F, Bocedi A, Minervini G, Ascenzi P (2008):** Human haptoglobin structure and function--a molecular modelling study. *FEBS J* 275, 5648-5656

**Rao VH, Meehan DT, Delimont D, Nakajima M, Wada T, Gratton MA, Cosgrove D (2006):** Role for macrophage metalloelastase in glomerular basement membrane damage associated with alport syndrome. *Am J Pathol* 169, 32-46

**Reiser J, Kriz W, Kretzler M, Mundel P (2000):** The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction. *J Am Soc Nephrol* 11, 1-8

**Ruggenti P, Perna A, Gherardi G, Gaspari F, Benini R, Remuzzi G (1998):** Renal function and requirement for dialysis in chronic nephropathy patients on long-term ramipril: REIN follow-up trial. Gruppo Italiano di Studi Epidemiologici in Nefrologia (GISEN). Ramipril Efficacy in Nephropathy. *Lancet* 352, 1252-1256

**Schrattenholz A:** Methoden der Proteomforschung - Molekulare Analyse der Proteinexpression; in: hrsg. v. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin 2001,

**Sugimoto H, Mundel TM, Sund M, Xie L, Cosgrove D, Kalluri R (2006):** Bone-marrow-derived stem cells repair basement membrane collagen defects and reverse genetic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7321-7326

**van der Loop FT, Heidet L, Timmer ED, van den Bosch BJ, Leinonen A, Antignac C, Jefferson JA, Maxwell AP, Monnens LA, Schroder CH et al (2000):** Autosomal dominant Alport syndrome caused by a COL4A3 splice site mutation. *Kidney Int* 58, 1870-1875

**Vogel W, Gish GD, Alves F, Pawson T (1997):** The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. *Mol Cell* 1, 13-23

**Vora JP, Ibrahim HA, Bakris GL (2000):** Responding to the challenge of diabetic nephropathy: the historic evolution of detection, prevention and management. *J Hum Hypertens* 14, 667-685

**Wagner M, Rhodes G, Wang E, Pruthi V, Arif E, Saleem M, Wean S, Garg P, Verma R, Holzman L et al (2008):** Ischemic Injury to Kidney Induces Glomerular Podocyte Effacement and Dissociation of Slit Diaphragm Proteins Neph1 and ZO-1. *J Biol Chem* 283, 35579–35589

**Wang L, Flannery PJ, Spurney RF (2003):** Characterization of angiotensin II-receptor subtypes in podocytes. *J Lab Clin Med* 142, 313-321

**Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL, Humphery-Smith I (1995):** Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 16, 1090-1094

**Welsch U:** Niere; in: Lehrbuch Histologie, hrsg. v. Elsevier, München 2006, 449-470

**Wessel D, Flugge UI (1984):** A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* 138, 141-143

**Wester DC, Atkin CL, Gregory MC (1995):** Alport syndrome: clinical update. *J Am Acad Audiol* 6, 73-79

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

---

**Wolf G (2005):** The renin-angiotensin-aldosterone system -- more complex as previously thought. *Med Klin* 100, 471-477

**Wolf G, Butzmann U, Wenzel UO (2003):** The renin-angiotensin system and progression of renal disease: from hemodynamics to cell biology. *Nephron Physiol* 93, P3-13

**Zeisberg M, Khurana M, Rao VH, Cosgrove D, Rougier JP, Werner MC, Shield CF, 3rd, Werb Z, Kalluri R (2006):** Stage-specific action of matrix metalloproteinases influences progressive hereditary kidney disease. *PLoS Med* 3, e100

**Zhou H, Pisitkun T, Aponte A, Yuen PS, Hoffert JD, Yasuda H, Hu X, Chawla L, Shen RF, Knepper MA et al (2006):** Exosomal Fetuin-A identified by proteomics: a novel urinary biomarker for detecting acute kidney injury. *Kidney Int* 70, 1847-1857

## 12. Anhang: Tabellen

mean 6 W ACE	mean 6 W Placebo	ratio 6 W Placebo / 6 W ACE	t-Test	Volume Spots	Protein
0,11056	0,04879	0,37823	49,39058	0,04182	Plasminogen
0,04558	0,01734	0,39811	89,34556	0,01814	Plasminogen
0,07499	0,14664	0,9904	76,98233	0,07427	Serotransferin
0,40352	0,49313	1,26804	44,23377	0,51168	Serum Albumin
0,22451	0,80085	3,46442	86,57825	0,77778	Serum Albumin
0,19249	0,52713	2,80527	81,29839	0,53999	Serum Albumin
0,07927	0,55484	6,91555	77,80621	0,54817	Serum Albumin
0,00747	0,10067	10,71319	94,40104	0,08004	Serum Albumin
0,1774	0,78964	4,19674	70,8013	0,7445	Serum Albumin
0,12422	0,17832	1,73165	39,8525	0,21511	Amyloid-Prec
0,17963	0,03647	0,6345	98,56101	0,11398	Serum Albumin
0,20978	0,18086	0,76366	59,00816	0,1602	Retinol-binding Protein 4
0,20732	0,10263	0,52525	64,01482	0,10889	Serum Albumin
0,43447	1,67889	3,7224	94,69105	1,61727	Apolipoprotein
0,12346	0,07687	0,83507	42,50831	0,1031	Serum Albumin
0,0977	0,20032	2,3925	63,84178	0,23375	Apolipoprotein
0,01252	0,05695	4,53162	56,74016	0,05672	Alpha-1-Antitrypsin
0,00789	0,02048	2,13483	64,71555	0,01685	Serum Albumin
0,10854	0,72571	6,59384	83,6356	0,71571	Transtyretin
0,00482	0,04975	8,9902	85,23404	0,04336	Serpin A3K
1,22142	0,27057	0,76315	87,75247	0,93212	MUP 3
0,15583	1,46217	6,89626	92,73531	1,07465	Serum Albumin
0,05394	0,13298	1,74193	67,98	0,09396	Serum Albumin
9,4167	6,99441	1,10632	59,92303	10,41789	MUP 2
0,41323	0,0401	0,6532	91,15771	0,26992	MUP 20
0,02041	0,08743	3,75725	83,94768	0,07667	Alpha-1-Antitrypsin
0,06105	0,01657	0,50074	65,14687	0,03057	Alpha -1-Antitrypsin
0,09031	0,02052	0,73096	80,51802	0,06601	Alpha-Fetoprotein
0,3688	0,09096	0,59793	98,99314	0,22051	Protein AMBP
0,19688	0,05813	0,654	99,13585	0,12876	Serum Albumin
0,05063	0,08597	1,14735	68,02331	0,05809	Serum Albumin
0,0229	0,0462	2,05938	73,60882	0,04715	Serum Albumin
0,03547	0,09729	2,82194	59,2099	0,10009	Reg1
0,15845	0,00159	0,75963	80,57772	0,12036	MUP 20
0,02765	0,15367	5,8039	80,49667	0,16047	Parvalbumin
0,02725	0,10997	3,80896	74,43392	0,1038	Serotranferin
0,4503	2,79002	4,28586	89,17756	1,92991	Serum Albumin
0,02195	0,05118	2,51743	69,69147	0,05527	Alpha-fetoprotein
0,09921	0,12359	1,44775	32,61903	0,14364	Serum Albumin
0,00839	0,0399	3,89456	57,68628	0,03266	Alpha-1-Antitrypsin
26,91015	29,69885	0,93493	34,99553	25,15905	Serum Albumin
0,18587	0,16551	0,45525	19,39704	0,08462	Hemopexin
0,26198	0,74595	1,69056	90,74731	0,44289	Vitamin D-binding Protein
0,06439	0,37239	5,08001	84,586	0,32709	Serum Albumin
0,12351	0,20515	1,39541	43,12288	0,17235	Serum Albumin
0,04033	0,1237	2,02331	87,48045	0,08159	Serum Albumin
0,01145	0,07201	4,86305	77,51722	0,0557	Serum Albumin
0,02181	0,43243	18,30812	93,96064	0,39931	Serum Albumin
0,13775	0,17873	0,79864	24,73393	0,11001	Serum Albumin

0,06608	0,03692	0,48763	38,72834	0,03222	Serum Albumin
0,13231	0,13641	0,53931	3,09946	0,07136	Serum Albumin
0,31899	0,12605	0,4858	81,45254	0,15497	Serpin A3K
0,62303	1,15606	1,13568	71,5806	0,70756	Kininogen
5,3912	6,98018	1,54806	40,69467	8,3459	Alpha-1-Antitrypsin
0,0466	0,03769	0,66705	31,3807	0,03108	Antithrombin III
0,0361	0,0278	0,78232	79,45046	0,02824	Antithrombin III
1,3197	0,79757	0,61043	60,83742	0,80558	Alpha-1-Amntitrypsin
0,1477	0,35111	1,79773	97,47031	0,26553	Alpha 2-HS-Glycoprotein
0,22511	0,21779	0,85654	4,08546	0,19282	Alpha 2-HS-Glycoprotein
0,1213	0,04648	0,72256	59,29203	0,08764	Alpha-1-Antitrypsin
0,44377	0,48191	0,65223	9,29799	0,28944	Serum Albumin
0,05023	0,05367	1,14693	11,50119	0,05761	Haptoglobin
0,07498	0,15592	1,71374	85,1862	0,12849	Haptoglobin
0,05331	0,184	2,72217	97,3482	0,14511	Haptoglobin
0,02928	0,11267	3,08835	95,19804	0,09041	Haptoglobin

Vergleich des 6-Wochen-ACE-Hemmestadiums mit dem 6-Wochen-Placebostadium:  
mean (Mittelwert), Ratio (Quotient der Mittelwerte der Vergleichsgruppen). Spotquantitäten  
sind in Volumen-Prozent angegeben.

mean 7.5 W Placebo	mean 7.5 W ACE	ratio 7.5 W ACE / 7.5 W Placebo	t-Test	Volumen Spot	Protein
0,46557	0,27354	0,58754	81,37765	0,45033	Serum Albumin
0,05761	0,02576	0,44707	89,89746	0,0352	Serum Albumin
0,03704	0,02362	0,63783	95,02928	0,024	Serum Albumin
0,06422	0,06285	0,97865	3,7602	0,05394	Serum Albumin
0,41111	0,29738	0,72334	51,45736	0,47204	Serum Albumin
0,08739	0,06068	0,69435	37,67414	0,0921	Serum Albumin
0,08012	0,01241	0,15485	83,53179	0,06819	Serum Albumin
0,08513	0,00651	0,07649	86,31098	0,06623	Serum Albumin
0,16918	0,09673	0,57176	54,0755	0,21916	Serum Ablumin
0,06266	0,00585	0,09332	87,1081	0,04515	Serum Albumin
0,84001	0,33456	0,39827	78,57814	0,86986	Reg 1
0,6389	0,24481	0,38318	78,57563	0,65494	Albumin
0,15252	0,14482	0,94951	25,61255	0,15624	Apoal Protein
0,98086	0,0653	0,06657	86,17106	0,8392	Transthyretin
0,1147	0,08439	0,73576	31,08944	0,14344	Serin Protease Inhibitor A3K
0,27195	0,28956	1,06476	9,8289	0,37647	Pravalbumin
0,45644	0,26641	0,58367	96,61864	0,40047	Protein AMBP
0,13071	3,77076	28,84865	85,55566	1,17811	MUP 2
0,11297	0,06534	0,57841	75,48824	0,07538	Apolipoprotein
0,17528	0,13479	0,76898	45,19941	0,13031	Fibrinogen beta Chain
0,25695	0,2491	0,96944	6,00666	0,27346	Protein AMBP
0,48545	0,25918	0,5339	65,90253	0,49898	Amyloid Prec.
2,16188	0,99788	0,46158	80,19885	1,984	Apolipoprotein
0,57893	0,27334	0,47215	78,57481	0,55585	Apolipoprotein
0,13677	0,07114	0,52014	92,84412	0,10085	Serum Albumin
0,17112	0,09374	0,54781	67,04629	0,12802	Alpha-1-Antitrypsin



0,0259	0,02898	1,11909	14,90171	0,03055	Serum Albumin
0,01837	0,05175	2,81734	72,89192	0,04554	Serum Albumin
0,1049	0,1335	1,2727	41,58501	0,14579	Alpha-fetoprotein
0,07086	0,10265	1,4486	82,88668	0,07892	Serum Albumin
0,0804	0,10024	1,24677	22,65761	0,14264	Serum Albumin
0,79039	0,02979	0,03769	99,17439	0,48609	Retinol-binding Protein 4
0,1542	0,12007	0,77865	23,63497	0,21522	Plasminogen
0,09207	0,06135	0,6664	33,65461	0,11325	Plasminogen
39,73894	47,19611	1,18765	76,60985	47,79749	Serum Albumin
8,45481	6,28743	0,74365	35,79513	10,02856	Serum Albumin
5,3885	3,47397	0,6447	57,29478	3,54895	Serum Albumin
4,74913	2,04406	0,43041	84,45908	2,64976	Kininogen
1,14469	0,25394	0,22184	99,98139	0,68919	Serum Albumin
0,12103	0,05144	0,42499	76,2253	0,05191	Antithrombin III
0,25703	0,05598	0,21779	99,77051	0,11741	Hemopexin
0,09217	0,0435	0,47197	81,1044	0,06756	Serum Albumin
0,23195	0,27479	1,18471	29,28395	0,21852	Serum Albumin
0,55117	0,734	1,33171	19,62523	0,21016	Alpha-2-HS-Glycoprotein
0,23784	0,11312	0,47564	67,4653	0,1541	Serum Albumin
0,56889	0,03759	0,06608	99,99107	0,30458	Alpha-2-HS-Glycoprotein
0,73051	0,14219	0,19465	98,44347	0,33519	Alpha-2-HS-Glycoprotein
0,48974	0,04925	0,10057	99,97808	0,27273	Alpha-2-HS-Glycoprotein
0,17228	0,96333	5,59161	64,94241	0,14581	Alpha-1-Antitrypsin
0,15966	0,16338	1,02334	16,31217	0,16858	Serum Albumin
0,05943	0,04945	0,83196	42,32302	0,05951	Serum Albumin
0,17921	0,1614	0,90064	25,89681	0,19061	Serum Albumin
0,12042	0,02292	0,19031	93,10236	0,05594	Haptoglobin
0,12077	0,05492	0,4548	75,18786	0,04568	Haptoglobin
0,19726	0,06133	0,31091	86,51978	0,08015	Haptoglobin
0,18016	0,04803	0,26661	86,18359	0,07066	Haptoglobin
0,50047	0,14409	0,28791	94,09745	0,37061	Serotransferin
0,06564	0,08545	1,30182	57,02288	0,08886	Serum Albumin
0,13006	0,20314	1,56184	51,66623	0,2468	Serum Albumin
0,32225	0,27572	0,85559	29,39672	0,32675	Serum Albumin
0,25063	0,17779	0,70934	41,33494	0,18954	Serum Albumin
0,11693	0,10775	0,92155	12,25655	0,09583	Serum Albumin
0,125	0,20298	1,62387	73,29155	0,19374	Serum Albumin
0,14235	0,13447	0,94471	19,66729	0,11285	Serum Albumin
0,11403	0,27115	2,37796	83,73169	0,27808	Serum Albumin

Vergleich des 7,5-Wochen-ACE-Hemmerstadiums mit dem 7,5-Wochen-Placebostadium: mean (Mittelwert), Ratio (Quotient der Mittelwerte der Vergleichsgruppen). Spotquantitäten sind in Volumen-Prozent angegeben.

### **Danksagung**

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. G. A. Müller bedanken, mir die Möglichkeit gegeben zu haben, diese Arbeit in seiner Abteilung durchzuführen.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Oliver Gross bedanken, der mir das Thema dieses Projektes freundlicherweise zur Verfügung gestellt hat und mir während der Zeit durch seine kompetente Betreuung und hilfreichen Gespräche zur Seite stand.

Ich bedanke mich sehr bei meinem Betreuer Prof. Dr. rer. nat. Hassan Dihazi und der Arbeitsgruppe der Proteomics Arbeitsgemeinschaft der UMG für die freundliche und stets konstruktive Zusammenarbeit. Prof. Dr. rer. nat. Dihazi hatte immer ein offenes Ohr für meine Probleme, Fragen und Sorgen und versuchte, gemeinsam mit mir Lösungen zu finden.

Außerdem danke ich Elke Brunst-Knoblich, die während der Einarbeitung und Durchführung meiner Laborarbeiten mich stets hilfsbereit und zuverlässig unterstützt hat.

Constanze Altubar, Asima Bibi, Gry Helene Dihazi, Marwa Eltoweissy, Micheal Maring und Imke Schmidt-Eylers gilt mein Dank für die freundliche Atmosphäre im Labor.

Des Weiteren danke ich Dipl. Biologin Diana Rubel für die gute Zusammenarbeit bei dem tierexperimentellen Teil dieser Arbeit.

Andrea Bernhard danke ich für die Anfertigung und die Bereitstellung der histologischen Bilder der Nierenschnitte.