

Aus der Abteilung Nephrologie und Rheumatologie

(Prof. Dr. med. G. A. Müller)

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Detektion diagnostischer Frühmarker der
Nierenfibrose im Urin von Patienten mit
Alport-Syndrom mittels proteomischer
Methoden**

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

vorgelegt von
Volker Kuhlmann
aus
Freiburg im Breisgau

Göttingen 2024

Dekan:	Prof. Dr. med. W. Brück
Referent:	Prof. Dr. med. O. Gross
Ko-Referent/in:	PD Dr. med. L. Schlotawa

Datum der mündlichen Prüfung: 01.02.2024

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel " Detektion diagnostischer Frühmarker der Nierenfibrose im Urin von Patienten mit Alport Syndrom mittels proteomischer Methoden" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Langnau am Albis, den 17.01.2024

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Vererbung und Häufigkeit des Alport-Syndrom.....	2
1.2 Aufbau und Funktion der Niere	2
1.3 Molekulare Ebene des Nierenschaden	7
1.3.1 Mutation im Kollagen Typ-IV.....	7
1.3.2 Am Erkrankungsverlauf beteiligte Rezeptoren	10
1.3.3 Nephrosklerose und tubulointerstitielle Fibrose.....	14
1.4 Extrarenale Manifestation des Alport-Syndrom.....	16
1.5 Therapie des Alport-Syndrom	17
1.6 Zielsetzung.....	19
1.6.1 Biomarker.....	20
1.6.2 Biomarker + Proteomics	20
1.7 Hypothese	21

2	Material & Methoden	23
2.1	Materialien	23
2.1.1.	Urin	23
2.1.2.	Chemikalien	25
2.1.3.	Verbrauchsmaterialien	29
2.1.4.	Geräte	29
2.1.5.	Software	32
2.2	Methoden	33
2.2.1	Proteinbiochemische Vorbereitung der Gelelektrophorese	33
2.2.2	Proteinfällung	33
2.2.3	Proteinbestimmung	34
2.2.4	Zweidimensionale Elektrophorese in der Proteomforschung	35
2.2.5	Färbemethoden von Proteinen in 2D-Gelen	39
2.2.6	Trypsin-Verdau von Proteinen	41
2.2.7	Massenspektrometrie	42
2.2.8	Immunfluoreszenzfärbung der Nierengewebeschnitte aus einem Mausmodell mit Alportsyndrom	49
3	Ergebnisse	54
3.1	Präsentation der 2D-Gele	54
3.2	Identifikation der Urinproteine mit Hilfe von MALDI-TOF-MS und ESI-MS	57
3.3	Ergebnisse der ELISA	65
3.4	Auswertungen der gefärbten Nierenschnitten von Mäusen	67
4	Diskussion	73
4.1	Die potentiellen Biomarker	73

4.2	Limitationen und Schwächen	84
4.3.	Schlussfolgerung.....	85
5	Zusammenfassung	86
6	Literaturverzeichnis	88

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Nierenkörperchen und Tubulus-Segmente (modifiziert nach Lüllmann-Rauch 2003).....	3
Abbildung 2: Blut-Harnschanke im Schema (modifiziert nach Lüllmann-Rauch et al. 2003).....	5
Abbildung 3: Kollagenketten als Monomer und in der Tripelhelix (modifiziert nach Hudson et al. 2003).....	8
Abbildung 4: Einflüsse auf die Progression oder Regression der Nierenfibrose (modifiziert nach Chatziantoniou et al. 2005).....	15
Abbildung 5: Renin-Angiotensin-System (modifiziert nach Speckmann et al. 2008).....	18
Abbildung 6: Studiendesign der Early Pro-Tect Alport Studie (Gross et al. 2012).....	23
Abbildung 7: Stadieneinteilung des Alport-Syndroms (Gross et al. 2012).....	25
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Gelelektrophorese (modifiziert nach Schrattholz et al. 2001).....	37
Abbildung 9: Funktionselemente eines Massenspektrometers (modifiziert nach Schrattholz et al. 2001).....	43
Abbildung 10: Aufbau einer ESI-Ionenquelle (modifiziert nach Schrattholz et al. 2001).....	46
Abbildung 11: Schematische Darstellung des Prinzip eines Sandwich ELISA.....	Error! Bookmark not defined.
Abbildung 12: Aufbau eines Fluoreszenzmikroskopes.....	53
Abbildung 13: Mastergel der Kontrollproben.....	55
Abbildung 14: Urinproteomprofile der Alport-Patienten (blau) und der gesunden Kontrollgruppen (orange) im Vergleich.....	56
Abbildung 15:: 2D-Gel der Probe 93_05_01 (am Alport-Syndrom erkrankt).....	58
Abbildung 16: 2D-Gel der Probe 93_05_02 (am Alport-Syndrom erkrankt).....	59
Abbildung 17: 2D-Gel der Probe 93_05_03 (am Alport-Syndrom erkrankt).....	59
Abbildung 18: 2D-Gel der Probe 93_11_02 (am Alport-Syndrom erkrankt).....	60
Abbildung 19: 2D-Gel der Probe 93_13_02 (am Alport-Syndrom erkrankt).....	60
Abbildung 20: Standardkurve eines ELISA.....	65
Abbildung 21: ELISA Kit kurz vor der Auswertung durch den Computer.....	67
Abbildung 22: Nierenschnitt Maus, Wildtyp, 4½ Wochen alt, versetzt mit Antikörper gegen CSPG4.....	70

Abbildung 23: Nierenschnitt Maus, Wildtyp, 6 Wochen alt, versetzt mit Antikörper gegen MASP2.....	70
Abbildung 24: Nierenschnitt Maus, Wildtyp, 4½ Wochen alt, versetzt mit Antikörper gegen MMRN2.....	71
Abbildung 25: Nierenschnitt Maus, Wildtyp, 6 Wochen alt, versetzt mit Antikörper gegen PRDX2.....	71
Abbildung 26: Nierenschnitt Maus, Wildtyp 4½ Wochen alt, versetzt mit Antikörper gegen CLEC3B.....	72
Abbildung 27: Nierenschnitt Col4A3-Knockout-Maus, 4½ Wochen, zentrale periglomeruläre Aufhellung nach Zugabe des Antikörpers gegen Chondroitin sulfate proteoglycan 4.....	73
Abbildung 28: Nierenschnitt Col4A3-Knockout-Maus, 6 Wochen, Aufhellungen an vier Glomeruli nach Zugabe des Antikörpers gegen Chondroitin sulfate proteoglycan 4.....	71
Abbildung 29: Nierenschnitt Col4A3-Knockout-Maus, 6 Wochen, Aufhellungen an allen sichtbaren Glomeruli nach Zugabe des Antikörpers gegen Chondroitin sulfate proteoglycan 4.....	72
Abbildung 30: Schematischer Überblick über die Komplementaktivierung.....	79
Abbildung 31: Überblick über die einzelnen Komponenten der Komplementsystems und deren Auswirkungen (modifizierte nach Janeway et al., 2001).....	81
Abbildung 32: Schematische Darstellung des Plasminogenmolekül (modifiziert nach Syrovets et al., 2012).....	82
Abbildung 33: Eigenschaften des Plasmin neben der Fibrinolyse(modifiziert nach Frontiers in Bioscience, 1995).....	83

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien.....	25
Tabelle 2: Antikörper.....	26
Tabelle 3: ELISA.....	27
Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien.....	27
Tabelle 5: Geräte.....	28
Tabelle 6: Software.....	29
Tabelle 7: Bradford-Pipettierschema.....	32
Tabelle 8: Fokussierprogramm für die erste Dimension.....	36
Tabelle 9: Identifizierte Proteine mittels Proteomics und Massenspektromie.....	58
Tabelle 10: Ergebnisse der ELISA für Mannan-binding lectin serine protease 2.....	64
Tabelle 11: Ergebnisse der ELISA für Tetranectin.....	64

Abkürzungsverzeichnis

ACE	<i>angiotensin converting enzyme</i>
ADH	anti-diuretisches-Hormon
AKT	Proteinkinase B
BSA	bovines Serumalbumin
Chaps	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propan-sulfonat
CLEC3B	Tetranectin
CR	Komplement-Rezeptor
CSPG4	<i>chondroitin sulfate proteoglycan 4</i>
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
DDR	Discoidin-Domain-Rezeptor
DHB	Dihydroxybenzoesäure
DTT	Dithiothreitol
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>
ESI-MS	<i>elektrospray-ionisation-mass spectrometry</i>
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
GBM	glomeruläre Basalmembran
MALDI-TOF-MS	<i>matrix assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry</i>
MASP-2	<i>mannan-binding lectin serine protease 2</i>
MBL	<i>mannan-binding lectin</i>
MCP	Membran-Cofaktor-Protein
MMP	Matrix-Metalloprotease
MMRN2	Multimerin-2
NC	nichtkollagen
(t)PA	<i>(tissue-)</i> Plasminogen-Aktivator
PAI	Plasminogen-Aktivator inhibitor
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PI3K/AKT/mTOR	<i>phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin</i>
PRDX2	Peroxiredoxin-2
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i>
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor-beta</i>
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
VEGFA	<i>vascular endothelial growth factor A</i>

1 Einleitung

Im Jahre 1927 beschrieb Arthur Cecil Alport zum ersten Mal das Auftreten einer kongenitalen Erkrankung, die mit Nephritis und Taubheit einherging. Männer schienen von dieser Krankheit häufiger befallen zu sein als Frauen. Im Laufe der Zeit fand man heraus, dass diese progredient verlaufende Nierenerkrankung durch Mutation der $\alpha 3$ -, $\alpha 4$ - oder $\alpha 5$ -Ketten des Typ-IV Kollagen verursacht wird.

Hierdurch verändert sich die Zusammensetzung der glomerulären Basalmembran, was schließlich zu einer Proteinurie und Hämaturie führt. Neben den von Alport beschriebenen Veränderungen von Niere und Innenohr können auch die Augen betroffen sein, da an allen diesen Orten die $\alpha 3$ -, $\alpha 4$ - oder $\alpha 5$ - Ketten des Typ-IV Kollagen vorkommen.

Durch Fortschreiten der Krankheit kommt es zur glomerulären und interstitiellen Fibrose, was letztendlich im terminalen Nierenversagen endet und die Erkrankten somit dialysepflichtig werden (Gross et al. 2005).

Als diagnostische Mittel zum Nachweis des Alport-Syndroms stehen bisher nur die Nierenbiopsie oder die molekulargenetische Untersuchung zur Verfügung, die beide invasive und aufwendige Methoden darstellen.

Bisher ist keine kausale Therapie für diese Erkrankung bekannt. Es konnte aber am Tiermodell gezeigt werden, dass der *angiotensin converting enzyme*-Hemmer (ACE-Hemmer) Ramipril den Verlauf der Krankheit verlangsamt und die Überlebenszeit verlängert. Der Schaden an der glomerulären Basalmembran kann durch diese Therapie aber dennoch nicht behoben werden. Es wurde zudem beobachtet, dass der Beginn dieser Therapie ebenfalls ausschlaggebend für die Wirksamkeit ist. Je früher Ramipril gegeben wurde, desto besser konnte dieser seine nephroprotektive Wirkung entfalten und umso mehr wurde der Erkrankungsprozess verlangsamt (Gross et al. 2003).

Sollte dieser Ansatz nicht mehr wirksam sein, bleibt nur noch die Dialyse und/oder eine Nierentransplantation als Option.

Aufgrund dieser Tatsachen ist es das Ziel, möglichst einfache Diagnosemethoden zu etablieren, um die Erkrankung so früh wie möglich zu erkennen und folglich eine frühe Therapie zu starten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun der Urin von Alport-Patienten im Vergleich zu dem von Gesunden untersucht um hier potentielle Biomarker im Urin der Erkrankten zu finden, welche als diagnostische

Marker dienen könnten. Nachdem in einer vorhergehenden Arbeit die Suche an COL4A3-Knockout-Mäusen erfolgreich war, will man nun dieses Konzept auf den Menschen ausweiten.

1.1 Vererbung und Häufigkeit des Alport-Syndrom

Es gibt drei verschiedene Erbgänge für das Alport-Syndrom. Am häufigsten, zu etwa 85%, wird es X-chromosomal rezessiv vererbt. Hierbei ist das COL4A5-Gen betroffen, das für die $\alpha 5$ -Kette des Kollagens verantwortlich ist (Barker et al. 1990). Die Häufigkeit dieser Mutation beträgt etwa 1:5000 (Tryggvason et al. 1993). Dies erklärt auch, warum Männer schwerer von dieser Erkrankung betroffen sind als Frauen, da Männer nur ein X-Chromosom besitzen, während Frauen den Schaden durch ihr zweites X-Chromosom kompensieren. Insgesamt sind jedoch Frauen etwa doppelt so häufig von der Erkrankung betroffen als Männer.

Zu etwa 14% wird die Krankheit autosomal rezessiv vererbt, wobei hier entweder das COL4A3- oder das COL4A4-Gen defekt sein kann. Beide Gene liegen Kopf an Kopf auf dem Chromosom 2 (Mochizuki et al. 1994). Für diesen Erbgang müssen beide Elternteile Genträger der Mutation gewesen sein, meist ohne selbst Symptome zu zeigen.

Als letztes findet man zu etwa 1% einen autosomal-dominanten Erbgang, der ebenfalls das COL4A3 oder das COL4A4-Gen betrifft (van der Loop et al. 2000). Von diesem Erbgang betroffene Menschen zeigen einen deutlich milderen Verlauf als die beiden anderen. Es ist bislang nicht geklärt, woran dies liegt. Die Häufigkeit der beiden autosomalen Erbgänge beträgt etwa 1:50000 (Flinter et al. 1988).

1.2 Aufbau und Funktion der Niere

Anfangs wird die Funktion der Niere und ihr makro- und mikroskopischer Aufbau erläutert, bevor näher auf die Veränderungen der glomerulären Basalmembran (GBM) eingegangen wird.

Die Nieren sind paarig im Retroperitonealraum angelegt und sind für die Ausscheidung harnpflichtiger Stoffwechsel- und Abbauprodukte und an der Regulation des Wasser-, des Säure-Basen- und des Salzhaushalts zuständig.

Bei der Produktion des Harns entsteht zunächst durch Filtration des Blutes in einem Kapillarknäuel im Glomerulum der Niere der sogenannte Primärharn. Dieser wird dann in einem System aus hintereinander geschalteten Kanälen, dem Tubulussystem der Niere, konzentriert und in seiner Zusammensetzung stark verändert. Dies geschieht vor allem durch Wasserentzug und Sekretions- und Resorptionsvorgänge. Letztendlich wird er als sogenannter Endharn ausgeschieden (Aumüller et al. 2007).

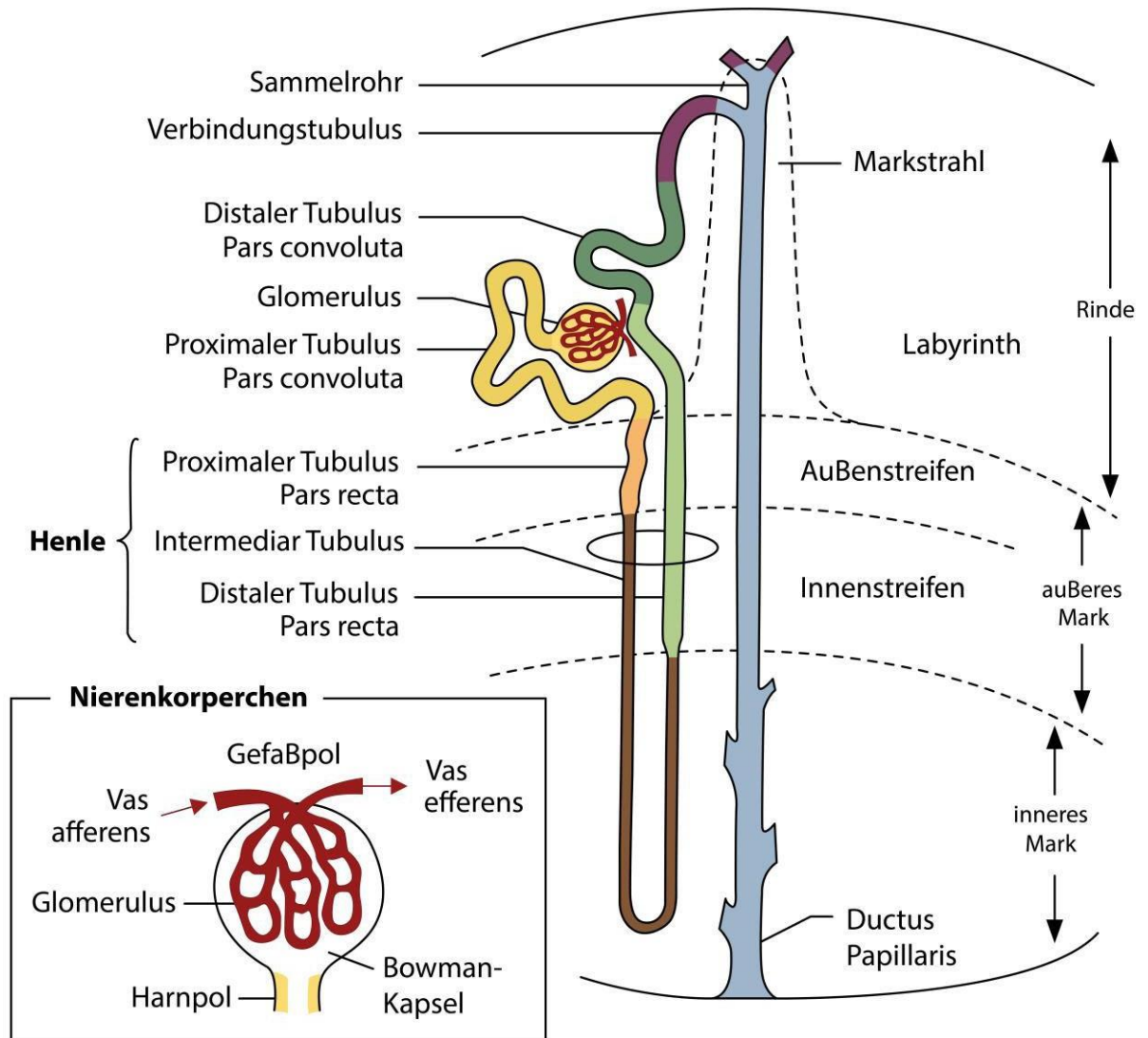


Abbildung 1: Nierenkörperchen und Tubulus-Segmente (modifiziert nach Lüllmann-Rauch 2003)

Des Weiteren produzieren die Nieren das Hormon Erythropoetin, welches bei der Produktion der Erythrozyten bedeutsam wird. Durch Beteiligung am Vitamin-D Stoffwechsel regulieren sie den Kalziumhaushalt. Darüber hinaus sind die Nieren in der Lage, durch renale Autoregulation Einfluss auf den systemischen Blutdruck zu nehmen (Aumüller et al. 2007).

Die Nieren sind sowohl von einer bindegewebigen Kapsel als auch einer Fettkapsel umgeben. Makroskopisch lassen sich die Nieren in Rinde und Mark unterteilen. Das Mark besitzt eine pyramidenförmige Form, dessen Spitze (Papilla renalis) in einen Kelch des Nierenbeckens ragt, an welchem der konzentrierte Endharn mündet. Die Rinde schließt sich nach außen hin dem Mark an und setzt sich als Columnae renales auch zwischen den Markpyramiden fort, von denen aus Markstrahlen in die Rinde ragen. Die Mark-freien Areale werden insgesamt als Rindenlabyrinth bezeichnet (Lüllmann-Rauch 2003).

Die mikroskopisch wichtigen Bauelemente sind die Nierenkörperchen (Corpusculus renalis), die Nierenkanälchen (Tubulus renalis) und die Blutgefäße im Interstitium, welche die wesentlichen Strukturen des Nierenparenchyms darstellen (Lüllmann-Rauch 2003).

Das im Rindenlabyrinth befindliche Nierenkörperchen fungiert als Verbindungsstück zwischen den Gefäßen und dem Tubulussystem. Es besteht aus einer zentral mehrfach gewundenen Gefäßschlinge, dem Glomerulum, und einer sie umgebenden doppelwandigen Kapsel, das parietale Blatt der Bowman-Kapsel (Schünke et al. 2005).

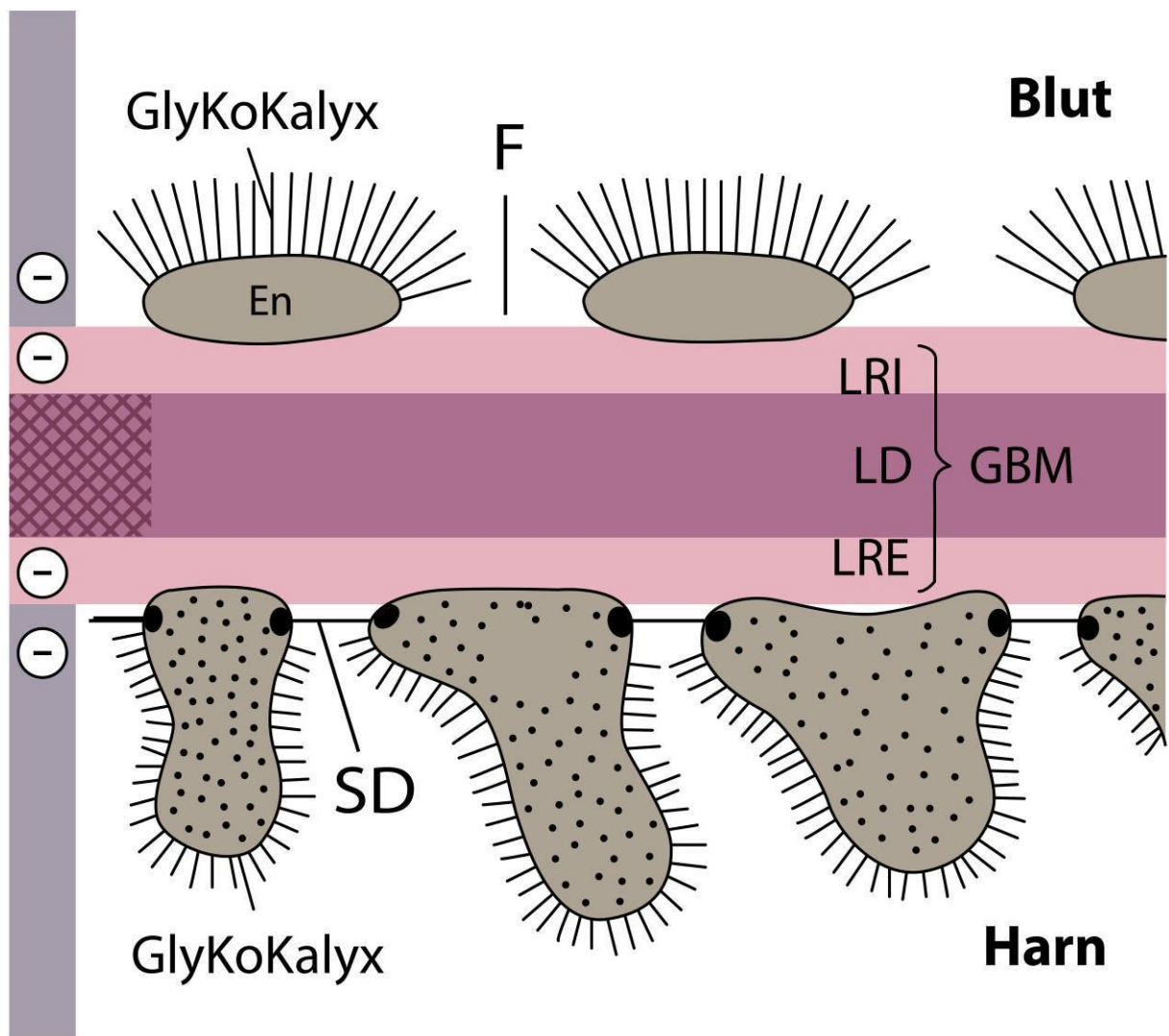


Abbildung 2: Blut-Harnschranke im Schema (modifiziert nach Lüllmann-Rauch et al. 2003)

Zum Glomerulum werden in der anatomischen Terminologie neben der Gefäßschlinge noch weitere Strukturen gezählt: GBM, Podozyten und Mesangium. Die Podozyten bestehen aus spezialisierten Epithelzellen und entsprechen dem viszeralen Blatt der Bowman-Kapsel. Das Mesangium ist kontraktile und dient insbesondere der Stabilisierung der Gefäßschlinge. Zum glomerulären Filter werden das Kapillarendothel, die GBM und die Podozytenfüße gezählt, welche zusammen die Blut-Harn-Schranke bilden (Lüllmann-Rauch 2003).

Dabei ist das Endothel fenestriert mit einem jeweiligen Durchmesser von 50 - 100nm ohne Diaphragma. Die zum Lumen gerichtete Plasmamembran trägt eine negativ geladene Glykokalyx, welche etwa 400 - 500nm dick ist und die Fensteröffnungen bedeckt. Der Zelleib der Podozyten befindet sich im Harnraum

seitlich der GBM. Von dem Zelleib gehen Primärfortsätze ab, von welchen sich die Sekundärfortsätze, die sogenannten Podozytenfüße, abzweigen. Mit diesen haftet er an der GBM. Die Gesamtheit der Podozytenfüße bildet eine fast vollständige Abdeckung der GBM, es verbleiben lediglich schmale etwa 40nm breite Filtrationsschlitze, die von einem Schlitzdiaphragma überbrückt sind. Neben anderen Proteinen kommt dem Transmembranprotein Nephrin eine besondere Rolle zu. Die langen Nephrinmoleküle benachbarter Podozytenfortsätze durchspannen den Filtrationsschlitz so, dass sie sich nach Art eines Reißverschlusses in der Mitte des Schlitzes verzahnen. Beidseits der Mitte lassen sie jedoch Filtrationsporen frei (Lüllmann-Rauch 2003).

Wie bereits beschrieben, liegt zwischen dem Kapillarendothel bzw. Mesangium und den Podozyten die GBM. Ihr Grundgerüst wird von der Lamina densa gebildet, welche aus einem molekularen Netz aus u.a. Kollagen Typ IV, Laminin 11 und Proteoglykanen besteht. Beidseits wird die Lamina densa von den Laminae rarae umgeben; so wird die Lamina densa auf der Endothelseite von der Lamina rara interna und auf Seite der Podozyten von der Lamina rara externa umschlossen.

In die Laminae rarae ragen Zelladhäsionsproteine, wie zum Beispiel Integrine, die der Verankerung der Endothelzellen und Podozyten dienen. Weiterhin befestigen negativ-geladene Heparansulfat-Proteoglykane die Lamina densa mit den Laminae rarae, sodass die GBM stark negativ geladen ist. Für die Neusynthese der GBM sind in erster Linie die Podozyten, in zweiter Linie die Mesangiumzellen verantwortlich. Die $\alpha 3$ -, $\alpha 4$ - und $\alpha 5$ -Ketten des Typ-IV Kollagen werden hingegen ausschließlich von den Podozyten gebildet, während für den Abbau beide gleichermaßen zuständig sind (Lüllmann-Rauch 2003; Abrahamson et al. 2009).

Der glomeruläre Filter besitzt die Aufgabe Makromoleküle zu selektieren. Entscheidende Kriterien für die Filtrierbarkeit eines großen Moleküls sind seine Größe und elektrische Ladung. Die Sortierung nach Größe erfolgt hauptsächlich durch die Lamina densa und die Poren im Schlitzdiaphragma. Für die Ladungsselektion werden die anionischen Bestandteile des Filters und zwar insbesondere die Glykokalyx des Kapillarendothels verantwortlich gemacht. So sind anionische Moleküle, wie beispielsweise das Albumin, sehr viel schlechter filtrierbar als neutral geladene Moleküle gleicher Größe, da negativ geladene

Moleküle von der ebenfalls negativ geladenen Glykokalyx abgestoßen werden (Lüllmann-Rauch 2003).

1.3 Molekulare Ebene des Nierenschaden

1.3.1 Mutation im Kollagen Typ-IV

Zuerst wird der allgemeine Aufbau der Kollagen Typ-IV beschrieben und anschließend sein Zusammenhang mit dem Alport-Syndrom.

Kollagen ist ein wichtiges Strukturprotein des Binde- und Stützgewebes und ein Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix. Es gehört zur Familie der Glykoproteine, was bedeutet, dass der Proteinanteil größer ist als sein Kohlenhydratanteil. Es sind derzeit etwa 25 verschiedene Kollagen- α -Ketten beschrieben. Hierbei wird jede einzelne Kette von einem eigenen Gen kodiert. Aus diesen Ketten werden die aktuell 28 bekannten Kollagen-Typen gebildet (I-XXVIII). Jede Kollagen- α -Kette besteht aus einer linksgängigen Helix. Jeweils drei dieser Helices lagern sich zu einer rechtsgängigen Tripelhelix zusammen, dem Kollagen (Rassow et al. 2008).

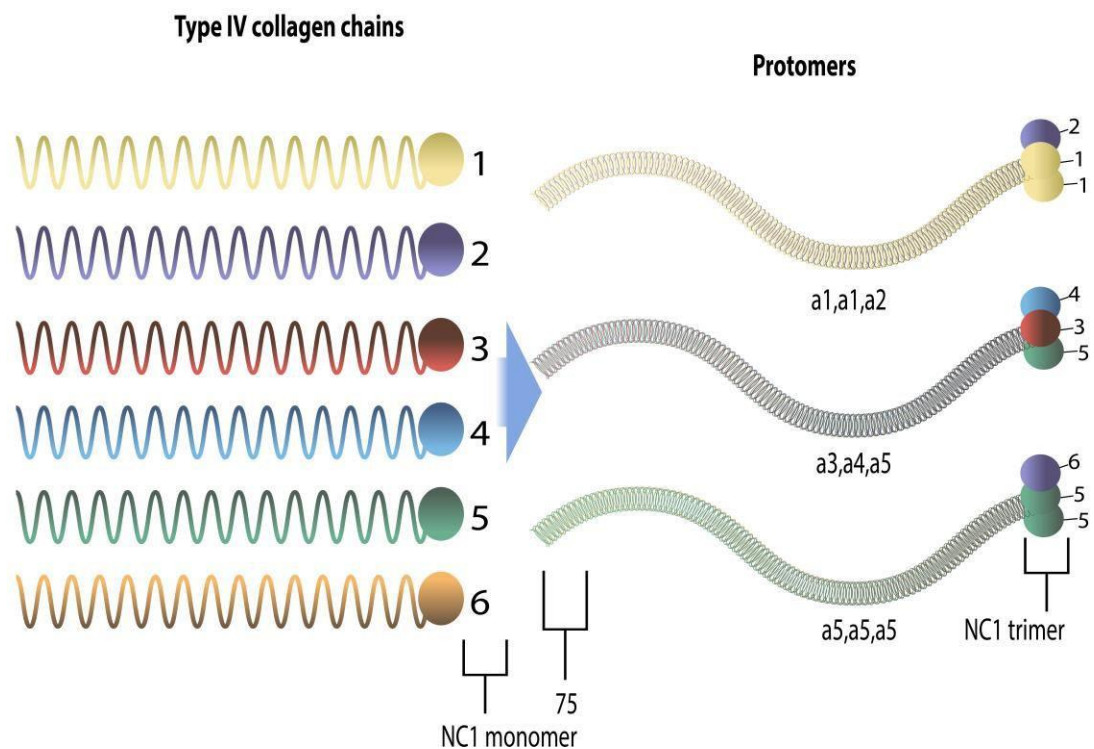


Abbildung 3: Kollagenketten als Monomer und in der Tripelhelix (modifiziert nach Hudson et al. 2003)

Das Kollagen Typ-IV gehört zur Gruppe der netzbildenden Kollagene und ist Hauptbestandteil aller Basalmembranen. Es gibt sechs verschiedene Kollagen Typ-IV Ketten, $\alpha 1$ - $\alpha 6$. Jede dieser Ketten hat den gleichen Grundaufbau. An seinem N-terminalen Ende befindet sich die 7S-Domäne, die für die Vernetzung wichtig ist. Im Typ-IV Kollagen lagern sich immer vier 7S-Domänen zusammen. Den größten Anteil am Kollagen besitzt der lange Kollagenschwanz in der Mitte des Moleküls. Am C-terminalen Ende findet man eine evolutionär hochkonservierte nichtkollagene Domäne, die sogenannte NC1-Domäne. Die Verbindung zweier NC1-Domänen unterstützt ebenfalls die Vernetzung. Die Kollagen Typ-IV Ketten lagern sich zu drei verschiedenen Tripelhelices zusammen, $\alpha 1/\alpha 1/\alpha 2$, $\alpha 3/\alpha 4/\alpha 5$ oder $\alpha 5/\alpha 5/\alpha 6$. Die $\alpha 1/\alpha 1/\alpha 2$ -Kette findet man ubiquitär in allen Basalmembranen, während die $\alpha 3/\alpha 4/\alpha 5$ -Kette vorwiegend nur in der Niere (und hier in der glomerulären Basalmembran), dem Innenohr und den Augen vorkommt. (Hudson et al. 1993; Hudson et al. 2003; Löffler et al. 2003).

Eine Besonderheit lässt sich in der Aminosäuresequenz der Kollagen-Ketten

finden. Diese besteht aus dem sich wiederholenden Triplett Glycin-X-Y. In dieser Einheit steht X meistens für Prolin und Y meist für Hydroxyprolin (Rassow et al. 2008). Der Grund für diese sich wiederholende Abfolge ist einfach zu erklären. Da sich die Kollagen-Ketten zu Tripel-Helices zusammen lagern, passt Glycin als kleinste Aminosäure in die innere Windung und ermöglicht so den korrekten Aufbau. Eine Windung einer Helix umfasst immer drei Aminosäuren und somit befindet sich Glycin an jeder dritten Stelle. Darüber hinaus unterstützt es noch den Zusammenhalt der Kollagen-Stränge. Die freien Ketten werden unter anderem durch Wasserstoffbrücken zusammengehalten. Den hierfür notwendigen Wasserstoff stellt die Aminogruppe des Glycins zur Verfügung, während die Carboxylgruppe der Aminosäuren X und Y einer anderen Kette das jeweilige Sauerstoffatom bereitstellt (Stryer 1991; Hudson et al. 1993).

Wie bereits erwähnt, steht an Position X meist die Aminosäure Prolin. Diese weist ebenfalls eine Besonderheit auf und zwar ist sie die einzige Aminosäure, bei der die Seitenkette nicht nur mit dem chiralen Kohlenstoffatom verbunden ist, sondern auch mit der Aminogruppe. Hierdurch entwickelt sich eine Ringstruktur, die ebenfalls für den Kollagenaufbau nützlich ist, da sie einen natürlichen Knick aufweist und so die Helixbildung erleichtert. Das an Position Y häufig vorkommende Hydroxyprolin kann weitere Wasserstoffbrücken zu anderen Strängen ausbilden und somit die Stabilität erhöhen. Darüber hinaus werden die Kollagen-Stränge zusätzlich noch durch mehrere Disulfidbrücken verstärkt. Speziell das $\alpha 3$ -/ $\alpha 4$ -/ $\alpha 5$ -Netzwerk weist eine besonders hohe Anzahl davon auf, wodurch es deutlich stabiler ist als die anderen beiden Kollagen Typ-IV Netzwerke. Eine weitere Aminosäure, die gelegentlich an Position Y vorkommen kann, ist Hydroxylysin, das zur Glykosylierung der Kollagen-Ketten dient (Stryer 1991; Löffler et al. 2003; Rassow et al. 2008).

Die Kollagen-Ketten kodierenden Gene sind immer paarweise angeordnet und liegen Kopf an Kopf auf dem jeweiligen Chromosom. So findet man COL4A1 und COL4A2 auf Chromosom 13, COL4A3 und COL4A4 auf Chromosom 2 und COL4A5 und COL4A6 auf dem X-Chromosom (Hudson et al. 1993).

Während der Embryonalphase und auch noch bei Geburt bestehen alle Basalmembranen aus dem $\alpha 1$ / $\alpha 1$ / $\alpha 2$ -Netzwerk, auch die glomeruläre Basalmembran. Erst ab dem vierten Tag nach der Geburt werden die Gene für die $\alpha 3$ -, $\alpha 4$ - und $\alpha 5$ -Kette aktiviert. Nun beginnt der Umbau von der embryonalen

glomerulären Basalmembran hin zur adulten glomerulären Basalmembran (Miner et al. 1994). Während die α 1- und die α 2-Ketten von Endothelzellen, Podozyten und Mesangiumszellen gebildet werden, können die α 3-, α 4- und α 5-Ketten nur von den Podozyten produziert werden (Abrahamson et al. 2009). Beim Alport-Syndrom kann auf Grund des Gendefektes dieser Umbauprozess nicht stattfinden, sodass die embryonalen Kollagen-Ketten erhalten bleiben. Diese besitzen aber weniger Disulfidbrücken und somit weniger Stabilität. Dies wirkt sich wiederum negativ auf die Filtration aus, da sie dem hohen Pensum nicht gerecht werden kann. Darüber hinaus ist die embryonale glomeruläre Basalmembran anfälliger gegenüber Matrix-Metalloproteasen (Kalluri et al. 1997; Gunwar et al. 1998).

Am häufigsten liegt der Krankheit eine Punktmutation zu Grunde, die sich entweder in einer *missense*- oder einer *nonsense*-Mutation darstellt. Es werden aber auch Deletionen oder Insertionen beobachtet, genauso wie Splice-Site-Mutationen. (Gross et al. 2002). Hierdurch kommt es zum Abknicken der Tripelhelix, was zu einem falschen Aufbau der glomerulären Basalmembran führt und in Aufsplitterung und Lamellierung dieser endet. (Gross et al. 2003). Durch diese Schäden werden Proteine in den Primärurin filtriert, die normalerweise diese Barriere nicht überwinden können. Somit werden vermehrt Eiweiße über das Tubulussystem transportiert und mit dem Urin ausgeschieden. Die Art und der Ort der Mutation haben starken Einfluss auf das Ausmaß der Erkrankung. Fehlen große Stücke des Kollagenstranges, ergibt sich eine *frameshift* Mutation. Betrifft die Mutation die NC-1 Domäne, dann ist der Erkrankte deutlich schwerer betroffen als bei den anderen Mutationen (Gross et al. 2002).

1.3.2 Am Erkrankungsverlauf beteiligte Rezeptoren

Das mutierte Kollagen steht im Kontakt mit mehreren anderen Bestandteilen der glomerulären Basalmembran, wie zum Beispiel dem Laminin oder dem Nidogen. Ebenso auch mit benachbarten Zellen, wie Podozyten, Mesangiums- oder Endothelzellen, über verschiedene Rezeptoren. Hier sind vor allem die Discoidin-Domain-Rezeptoren (DDR), wie DDR1, und die Integrin-Rezeptoren wie die α 1 β 1, α 2 β 1-, α 3 β 1- und α 5 β 1-Integrine zu erwähnen. Der über diese Rezeptoren registrierte Defekt des Kollagen führt zu einer Hochregulierung von profibrotischen Faktoren wie beispielsweise *transforming growth factor-beta* (TGF- β), *platelet-*

derived growth factor (PDGF) und *connective tissue growth factor* (CTGF). Darüber hinaus wird noch die Aktivierung mehrerer Matrix-Metalloprotease gefördert (Fogo et al. 1999; Cosgrove et al. 2000; Gross et al. 2004).

Discoidin-Domain-Rezeptoren

Discoidin-Domain-Rezeptoren (DDR) gehören zur Klasse der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen. Es sind Transmembran-Rezeptoren, die durch Kollagen aktiviert werden. Typ-IV Kollagen ist in der Lage, DDR1 zu aktivieren, jedoch nicht DDR2 (Vogel et al. 1997; Vogel et al. 2000). DDR's sind für die Regulation von Zelladhäsion, Proliferation und dem Umbau der extrazellulären Matrix zuständig (Vogel et al. 2006).

In der Niere ist DDR1 auf der Basalseite der Podozytenfußfortsätzen zu finden, genau zwischen der glomerulären Basalmembran und dem Schlitzdiaphragma (Gross et al. 2010). DDR's schließen sich zu Dimeren zusammen; dieser Vorgang geschieht unabhängig von Liganden. Zur Aktivierung dieser Rezeptoren ist eine Leucin-Zipper Abfolge notwendig, die in der Transmembran-Domäne der DDR's gefunden wird (Noordeen et al. 2006). Für diesen Vorgang sind zwei Cysteine essentiell (Abdulhussein et al. 2008). Zusätzlich werden für die Aktivierung vier benachbarte Kollagenschleifen benötigt, die auf der Oberfläche exponiert werden (Abdulhussein et al. 2004).

Hier kommt den Podozyten eine weitere zentrale Rolle zu neben der Bildung der α 3-, α 4- und α 5-Kette des Typ-IV Kollagen. Aufgrund des Fortbestehen der embryonalen glomerulären Basalmembran kommt es zu einem veränderten Signal, das die Podozyten mit ihren DDR1 aufnehmen und darauf mit einer Hochregulation von profibrotischen Faktoren, wie TGF- β , reagieren (Gross et al. 2010).

Erhöhte Level von TGF- β wiederum sorgen für eine vermehrte Bildung und Ablagerung von Extrazellulärer Matrix, wie dem Fibronectin (Nakamura et al. 1992) oder Laminin-1 (Cosgrove et al. 1996). Durch diese Ablagerungen wird die glomeruläre Basalmembran verdickt und aufgesplittet (Gross et al. 2003). Im weiteren Verlauf der Erkrankung führt diese erhöhte Produktion auch zur tubulointerstitiellen Fibrose (Sayers et al. 1999).

Ein weiterer Effekt des erhöhten TGF- β -Levels ist sein Effekt auf das Plasmin

Protease System. TGF- β reduziert die Aktivität des Plasminogen-Aktivator (PA), welches Plasminogen in das aktive Plasmin umwandelt. Im Gegenzug erhöht es den Level des Plasminogen-Aktivator inhibitor (PAI), welcher das genau Gegenteil bewirkt (Tomooka et al. 1992). Die Protease Plasmin wiederum ist durch die Aktivierung der Matrix-Metalloprotease-2 (MMP-2) an der Gewebereparatur beteiligt. MMP-2 ist am Kollagenumbau direkt involviert (Baricos et al. 1999). Das Gleichgewicht zwischen Kollagenaufbau und -abbau ist präzise reguliert, da es andernfalls zur proteolytischen Destruktion der GBM führt. DDR1 reguliert die Aktivität von zwei Matrix-Metalloproteasen, MMP-2 und MMP-9, die für diesen Prozess zuständig sind (Hou et al. 2002). Des Weiteren induziert erhöhtes TGF- β die Apoptose von Podozyten über die Aktivierung von p38 MAP-Kinase und Caspase-3 (Schiffer et al. 2001). Dadurch wird die Filtrationsbarriere weiter zerstört und der Austritt von Proteinen erleichtert.

Integrin-Rezeptoren

Integrine gehören zur Familie der Glycoproteine. Sie sind heterodimere Oberflächenrezeptoren, jeweils bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit. Hierbei ist die β -Untereinheit in der Lage, mit mehreren α -Untereinheiten einen Komplex einzugehen. Integrine stehen mit der Extrazellulären Matrix und anderen Oberflächenrezeptoren in Kontakt. Sie kontrollieren somit verschiedene Aktivitäten der Zelle, wie zum Beispiel Zellmigration oder Zelladhäsion. Sie spielen ebenfalls eine Rolle in mehreren Signalkaskaden (Hynes 1992; Kreidberg et al. 1996).

α 1 β 1-Integrine sind vor allem auf Mesangiumzellen zu finden, α 2 β 1-Integrine bevorzugt auf den Endothelzellen, dazu auch im distalen Tubulus und im Sammelrohr, α 3 β 1-Integrine sind hauptsächlich auf den Podozyten lokalisiert, α 5 β 1-Integrine wurden ebenfalls auf Mesangiumszellen nachgewiesen (Korhonen et al. 1990; Cosgrove et al. 2000; Matsumoto et al. 2003). Die Integrinexpression auf den Zellen wird durch TGF- β noch erhöht (Border et al. 1992). Durch Strukturänderung der glomerulären Basalmembran kommt es zu einem Verlust der direkten Interaktion zwischen α 1 β 1-Integrin und seinem Liganden Kollagen IV, welches wiederum zur Mesangiumzellexpansion führt (Kashtan 1999). Durch diese Signalveränderung beeinflusst α 1 β 1-Integrin auch die Expression von

mehreren Matrix-Metalloproteasen (MMP), namentlich MMP-2, MMP-9 und MMP-14 und hemmt die Bildung von deren Gegenspielern, den *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMP), besonders TIMP-1 und TIMP-3 (Cosgrove et al. 2008). TIMP-1 und TIMP-3 haben eine hohe Affinität zu MMP-2 und MMP-9 (Goldberg et al. 1992), wobei TIMP-3 der Hauptregulator von MMP's ist. Jedoch hat die Anwesenheit von MMP-9 keinen Einfluss auf die Entwicklung des Alport-Syndrom (Andrews et al. 2000). Die primäre Aufgabe von MMP's ist der kontrollierte Abbau von Matrix- und Nicht-Matrixmolekülen im Rahmen der Gewebereparatur und des Umbauprozesses (Nagase et al. 2006). Wird dieser präzise regulierte Prozess jedoch gestört und die Konzentration der MMP's ist erhöht, wie es beim Alport-Syndrom der Fall ist, unterstützt dies die Progression der Erkrankung durch vermehrten Abbau (Zeisberg et al. 2006). Durch diese proteolytische Degradierung der Matrix wird die Verdickung, Aufsplitterung und Lamellierung der glomerulären Basalmembran weiter unterstützt (Rao et al. 2006). Diese Veränderungen der Basalmembran werden noch dadurch verstärkt, dass die embryonalen $\alpha1/\alpha1/\alpha2$ -Ketten, die bei dieser Krankheit erhalten bleiben, anfälliger sind gegenüber MMP's als die $\alpha3/\alpha4/\alpha5$ -Ketten (Kalluri et al. 1997). Vergleicht man die beiden Netzwerke miteinander, erkennt man, dass es in der $\alpha1/\alpha1/\alpha2$ -Helix deutlich weniger Disulfidbrücken gibt als in der $\alpha3/\alpha4/\alpha5$ -Helix. Die $\alpha3$ -/ $\alpha4$ -/ $\alpha5$ -Ketten sind daher vor der endoproteolytischen Spaltung durch MMP's resistenter (Gunwar et al. 1998).

Neben dem $\alpha1\beta1$ -Integrin kommt auch dem $\alpha5\beta1$ -Integrin eine besondere Rolle zu. Das durch das mutierte Kollagen Typ-IV veränderte Signal auf diesen Rezeptor erhöht die Produktion von TGF- β und Plasminogen-Aktivator inhibitor 1 (PAI-1) (Matsumoto et al. 2003). Wie bereits beschrieben, erhöht TGF- β die Produktion von extrazellulärer Matrix, was die Glomerulosklerose und die Verdickung der glomerulären Basalmembran vorantreibt (Nakamura et al. 1992; Baricos et al. 1999). PAI-1 hemmt den Plasminogen-Aktivator, so dass Plasminogen nicht mehr in das aktive Plasmin umgebaut werden kann. Plasmin unterstützt im Gesunden den Kollagenumbau. Diese Funktion wird durch seine Hemmung aufgehoben (Tomooka et al. 1992; Baricos et al. 1999).

$\alpha2\beta1$ -Integrin kommt hauptsächlich auf den Endothelzellen und auch auf der Basalseite der Podozytenfußfortsätzen vor. Durch das Wegfallen des normalen Kollagen Typ-IV Signals kommt es zu einer Stimulation der Produktion von TGF- β

und CTGF. Sie ähneln in dieser Hinsicht den DDR1. Durch die überschüssigen profibrotischen Faktoren wird wiederum die Bildung der extrazellulären Matrix angeregt. Diese verdickt dann wieder die glomeruläre Basalmembran und führt zum Fortschreiten der Erkrankung (Cosgrove et al. 2000; Girgert et al. 2010). $\alpha 3\beta 1$ -Integrine sind innerhalb der Niere bevorzugt auf den Podozyten lokalisiert. Diese sind vielseitig an der Pathogenese des Alport-Syndroms beteiligt. Sie sind für die Produktion der mutierten $\alpha 3$ -/ $\alpha 4$ -/ $\alpha 5$ -Ketten zuständig. Sie beeinflussen die Hochregulierung von TGF- β und sie bewirken pleiotrope Effekte auf MMP's und TIMP's. Zudem bedingt es im Verlauf der Krankheit den Verlust des Schlitzdiaphragmas. Kommt es nun aufgrund der Mutation zu einem veränderten Rezeptorsignal des $\alpha 3\beta 1$ -Integrins, so führt dies zum Verlust der Podozytenfußfortsätze und somit zum partiellen Verlust der Podozytenschlitzmembran. Diese stellt in der gesunden Niere eine wichtige Filterbarriere dar, die große Proteine zurückhält (Kreidberg et al. 1996).

1.3.3 Nephrosklerose und tubulointerstitielle Fibrose

Auf den entstandenen glomerulären Schaden reagiert der Körper mit der Hochregulierung von profibrotischen Faktoren wie TGF- β oder MMP's, um das Gewebe zu reparieren (Border et al. 1992). Da aber beim Alport-Syndrom auf Grund des Gendefekt kein $\alpha 3$ -/ $\alpha 4$ -/ $\alpha 5$ -Netzwerk gebildet werden kann, scheitert der Heilungsversuch (Gross et al. 2005). Da das Scheitern aber nicht registriert wird, resultiert daraus ein überschießender Heilungsprozess. In diesem kommt es zu einer vermehrten Bildung von extrazellulärer Matrix und durch bereits beschriebene Signalkaskaden zum Untergang der Podozyten und der Podozytenschlitzmembran. Der Podozytenuntergang wird noch verstärkt durch die Anwesenheit von Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α). Es wurde gezeigt, dass dieser im Alport-Syndrom exprimiert wird, bevorzugt von Podozyten. Diese gehen daraufhin zugrunde und fördern die Sklerosierung (Ryu et al. 2011). Das Absterben der Podozyten durch TNF- α wird durch eine verminderte Nephrinexpression erreicht. Nephrin ist auf dem Schlitzdiaphragma zwischen den Podozytenfußfortsätzen lokalisiert und essentiell für die korrekte Filterbarriere (Ruotsalainen et al. 1999; Doublie et al. 2001). Somit können Proteine, die bisher

wegen ihrer Größe oder ihrer Ladung diese Barriere nicht passieren konnten, ungehindert die glomeruläre Basalmembran überwinden und in den Urin gelangen.

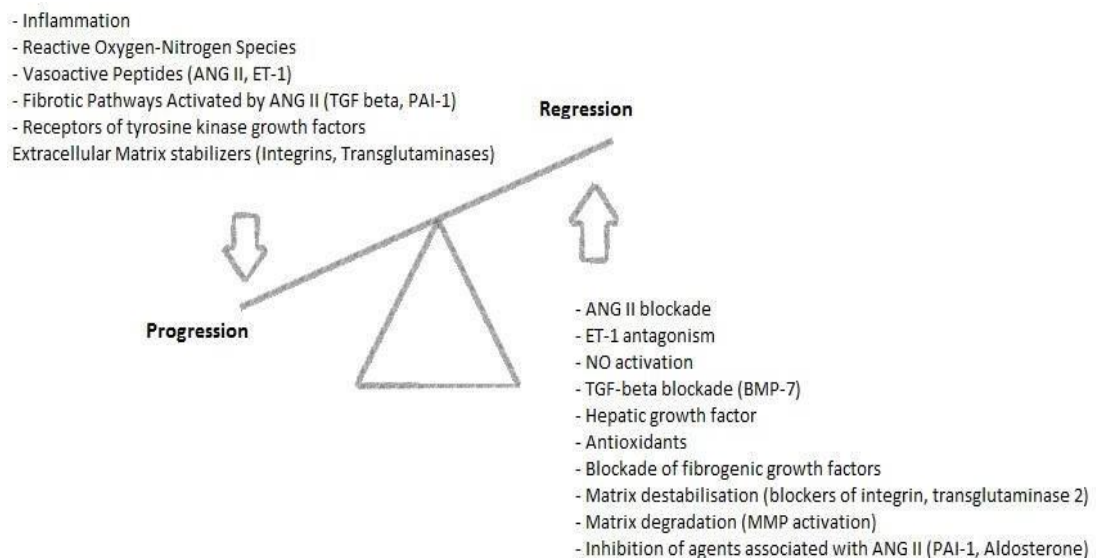


Abbildung 4: Einflüsse auf die Progression oder Regression der Nierenfibrose (modifiziert nach Chatziantoniou et al. 2005)

Die Aktivierung des Komplementsystems ist aus unbekanntem Gründen auch noch an der Proteinurie beteiligt. Der Komplement-Rezeptor-1 (CR1) ist auf Podozyten des gesunden Glomerulum exprimiert (Pavenstädt et al. 2003). Dieser Rezeptor wirkt als Co-Faktor, genauso wie das Membran-Cofaktor-Protein (MCP), für den Faktor I. Faktor I wiederum hemmt die aktiven Komplementfaktoren C3b und C4b (Nangaku 1998). Durch die Apoptose der Podozyten fällt diese Hemmung weg, und die nun aktiv arbeitenden Komplementfaktoren unterstützen die Proteinurie. Neben Proteinen können jetzt auch Erythrozyten die glomeruläre Schranke passieren, so dass es ebenfalls zur Hämaturie kommt (Alport 1927). Aus bisher

ungeklärten Gründen wird hierauf die Gerinnung aktiviert und es kommt zur Ablagerung von Fibrin (Deguchi et al. 1989; Ono et al. 1991). An der Gerinnung sind die beiden Serinproteasen Kallikrein und Thrombin beteiligt (Stryer 1991). Das gebildete Thrombin stimuliert sowohl die Produktion von TGF- β als auch die Synthese von Plasminogen-Aktivator (PA) und Plasminogen-Aktivator Inhibitor-1 (PAI-1) aus Mesangiumzellen und Podozyten, auf die bereits eingegangen wurde (Iwamoto et al. 1990; Villamediana et al. 1990; Tsunoda et al. 2001). Die Sekretion von PA und PAI-1 wird zusätzlich noch von TNF- α stimuliert (Iwamoto et al. 1990). PAI-1 hemmt die Fibrinolyse und steht so im Sinne einer Progression der Nierenfibrose, da es dadurch der Wundheilung entgegenwirkt (Chatziantoniou et al. 2005). Durch die ungenügende Plasminbildung kann es sich weder aktiv an der Fibrinolyse noch am Umbau des Kollagens beteiligen (Saksela 1985; Villamediana et al. 1990).

Somit kommt es zu vermehrter Fibrinablagerung, die zusammen mit der Akkumulation der extrazellulären Matrix und den Zytokinen die Nephrosklerose und die tubulointerstitielle Fibrose fördert und vorantreibt. Dieser Prozess führt somit letztendlich zum terminalen Nierenversagen (Tsuonda et al. 2001; Gross et al. 2003).

1.4 Extrarenale Manifestation des Alport-Syndrom

Das Alport-Syndrom betrifft nicht nur die Nieren. Die α 3-/ α 4-/ α 5-Ketten sind auch auf den Basalmembranen im Innenohr und im Auge zu finden (Kashtan et al. 1996; Hudson et al. 2003). Durch Mutation dieser Ketten kommt es im Rahmen des Alport-Syndrom häufig zur progredienten, beidseitigen, sensorineuralen Innenohrschwerhörigkeit im Bereich von 2000 bis 8000 Hz (Alport 1927; Williamson 1961; Johnsson et al. 1981). Im Auge finden sich typische Veränderungen wie Lentikonus anterior und Fundus albipunctatus (Thompson et al. 1987). Gelegentlich kann es vorkommen, dass Alport-Patienten auch an einer diffusen Leiomyomatose des Ösophagus leiden. Dies liegt an der Benachbarung der Gene für die α 5- und α 6-Kette des Kollagen Typ-IV. Sind durch größere Deletionen beide Gene betroffen, kommt es zu dieser Erkrankung (Oohashi et al. 2011).

1.5 Therapie des Alport-Syndrom

Es gibt zurzeit keine kausale Therapie für das Alport-Syndrom. Stattdessen werden Medikamente eingesetzt, die symptomatisch wirken und solche, die die Progression der Erkrankung verlangsamen. Die aktuell anerkannte Therapie der ersten Wahl ist der ACE-Hemmer Ramipril (Kashtan et al. 2012). Es gehört zur Gruppe der Antihypertensiva und ist für die Therapie der arteriellen Hypertonie, Herzinsuffizienz, diabetischen Nephropathie mit Mikroalbuminurie und zur Prävention der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität beim Erwachsenen zugelassen. ACE-Hemmer wirken symptomatisch und sind, wie der Name schon sagt, Inhibitoren des sogenannten *angiotensin converting enzym* (ACE) und haben somit einen Einfluss auf das Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) (Kasper et al. 2005). Im Folgenden wird kurz auf das RAAS eingegangen und die wichtigsten Punkte werden erläutert. Angiotensinogen ist ein Polypeptid, das in der Leber produziert wird. Dieses wird durch das in der Niere gebildete Renin in das Dekapeptid Angiotensin I gespalten. Renin wird aus der Niere ausgeschieden, wenn dort entweder ein verminderter Blutdruck oder ein Abfall des Blutvolumens gemessen wird. Der Abfall des Blutvolumens wird durch einen erniedrigten Salzgehalt im Blut festgestellt. Angiotensin I wird nun wiederum durch das *angiotensin converting enzym* (ACE) in das aktive Oktapeptid Angiotensin II umgewandelt. ACE ist insbesondere in Endothelien der Nierengefäße und auf der Oberfläche von Endothelzellen der Lunge lokalisiert. Diesen Prozess verhindert der ACE-Hemmer, so dass Angiotensin II nicht mehr entstehen und seine Wirkung nicht mehr entfalten kann. Ohne diese Hemmung wirkt es vasokonstriktorisch durch Bindung an die Angiotensin 1- und Angiotensin 2-Rezeptoren, was blutdrucksteigernd ist und in einer gesteigerten Durchblutung des Körpers und insbesondere der Nieren resultiert (Speckmann et al. 2008).

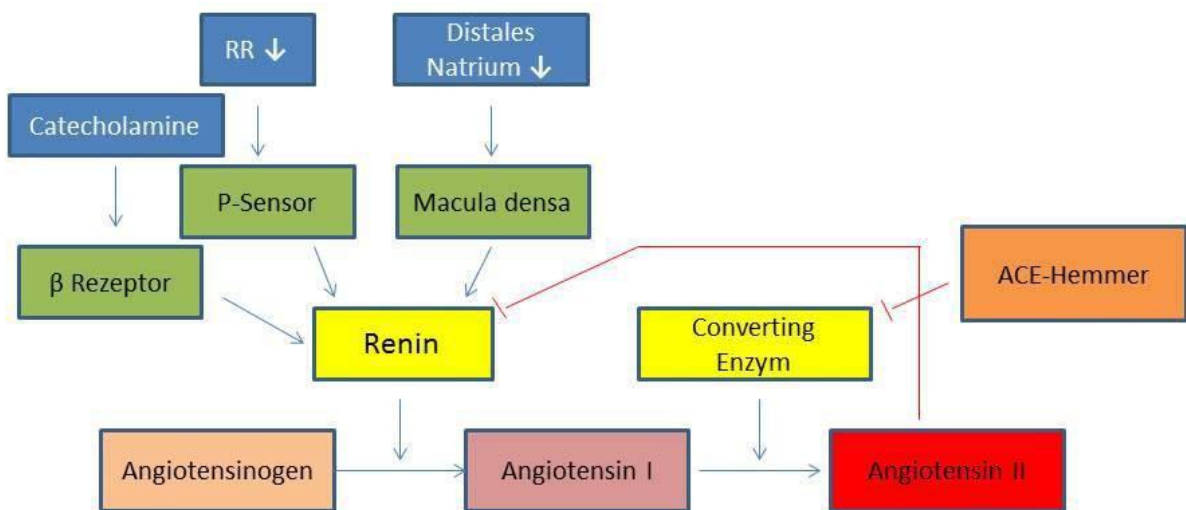


Abbildung 5: Renin-Angiotensin-System (modifiziert nach Speckmann et al. 2008)¹

Zudem bewirkt Angiotensin II die Freisetzung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde. Dadurch werden eine erhöhte Rückresorption von Natrium- und Chloridionen und eine vermehrte Ausscheidung von Kaliumionen durch das Tubulussystem der Niere erreicht. Dem resorbierten NaCl folgt osmotisch Wasser mit, so dass auf diese Weise das Blutvolumen erhöht wird und folglich der Blutdruck gesteigert wird. Eine weitere Eigenschaft des Angiotensin II ist eine gesteigerte Freisetzung des Anti-Diuretischen-Hormons (ADH) aus dem Hypophysenhinterlappen. Wie der Name des Hormons schon sagt, vermindert es die Diurese, und ermöglicht dem Körper, so mehr Wasser zu resorbieren und auf diese Weise Blutvolumen und Blutdruck zu steigern (Speckmann et al. 2008).

Es ist bisher nicht genau geklärt, in welcher Weise Ramipril auf die Pathogenese des Alport-Syndroms wirkt. Es konnte bisher gezeigt werden, dass es nephroprotektiv und antifibrotisch wirkt und die Überlebensdauer verlängert (Gross et al. 2003). Es wurde am Mausmodell gezeigt, dass unbehandelte Mäuse an einer massiven Proteinurie, Glomerulosklerose und tubulointerstitiellen Fibrose mit komplettem Verlust der glomerulären Funktion litten. Innerhalb von 10 Wochen hatten sie ein terminales Nierenversagen erreicht und starben anschließend. Wurden diese Mäuse jedoch mit Ramipril behandelt, konnte gezeigt werden, dass

die Proteinurie deutlich gesenkt werden konnte und sich die Überlebenszeit verlängerte. Der Vergleich zwischen frühem (4 Wochen) und spätem (7 Wochen) Therapiebeginn zeigte sowohl im Ausmaß der Proteinurie als auch in der Überlebenszeit einen deutlichen Vorteil zugunsten des frühen Beginns. Es konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass die frühe Gabe des ACE-Hemmers die Konzentration von TGF- β um 200% und die von CTGF um 400% reduzierten. Es konnte jedoch kein Unterschied in den strukturellen Schäden der glomerulären Basalmembran zwischen den behandelten und unbehandelten Mäusen gezeigt werden (Gross et al. 2003; Gross et al 2004).

Zu den allgemeinen Nebenwirkungen gehören trockener Husten, symptomatische Hypotonie, Schwächegefühl, Geschmacksstörungen bedingt durch orale Aphten, Nierenfunktionsstörung im Sinne eines akuten Nierenversagens, Hyperkaliämie oder Exantheme und angioneurotisches Ödem. Ramipril sollte nicht während der Schwangerschaft eingesetzt werden, da es Knochen- und Wachstumsstörungen hervorrufen kann (Kasper et al. 2005).

ACE-Hemmer werden im Laufe ihrer Behandlung aufdosiert, um einen bestmöglichen Effekt erreichen zu können. Beim Menschen wird die maximale Blutdrucksenkung bei 5 mg, die maximale nephroprotektive Wirkung unter 10 mg erreicht. ACE-Hemmer werden oft als Ester hergestellt, in der Leber durch Esterasen zum aktiven Metaboliten umgewandelt und schließlich über die Nieren ausgeschieden (Kasper et al. 2005).

1.6 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist es, Biomarker im Urin von Alport-Patienten zu finden, bei denen sich die Krankheit in einem frühen Stadium (Stadium 0 oder I) befindet. Da auf Grund der Mutation die glomeruläre Basalmembran nicht korrekt aufgebaut werden kann, geht die natürlich Filtrationsbarriere der Niere zu Grunde. Somit können Proteine in den Urin gelangen, die normalerweise nicht filtriert werden würden. Nachdem die Suche am Mausmodell erfolgreich war (Doktorarbeit Imke Schmidt-Eylers 2012), wird in dieser Arbeit nun die Suche auf den Menschen ausgeweitet.

Es wurde der Urin von erkrankten Kindern mit dem Urin von gesunden Kindern untersucht und verglichen. Die Zielsetzung lag darin, im Urin der Kranken Proteine

zu finden, die klinisch relevant hochreguliert und spezifisch für das Alport-Syndrom sind.

Zum Schluss werden dann diese klinisch relevant hochregulierten Proteine biochemisch diskutiert, sodass im Idealfall ein Zusammenhang zur Pathogenese des Alport-Syndroms hergestellt werden kann.

1.6.1 Biomarker

Ein Biomarker, der im klinischen Bereich Anwendung finden soll, muss einfach, kostengünstig, risikoarm und nicht-invasiv vom Patienten zu gewinnen sein. Da zur Diagnose des Alport-Syndrom bisher nur die Nierenbiopsie oder die genetische Untersuchung zur Verfügung stehen, versucht man hierfür einfachere Diagnosemittel zu finden (Kashtan et al. 2012). Eine Biopsieentnahme ist schmerzhaft für den Patienten, aufwendig und mit Komplikationen, (wie Infektion oder Nachblutung) verbunden. Aus diesem Grund konzentriert sich die heutige Forschung unter anderem auf die Entdeckung von Biomarkern aus leichter zugänglichen Medien wie Blut, Urin oder Speichel. Für das Alport-Syndrom sind bislang keine solche Marker bekannt. Da aber durch die Erkrankung vermehrt Proteine über den Urin ausgeschieden werden, auch schon bevor die Sklerosierung des Glomerulum einsetzt, erhofft man sich hier Proteinmarker für eine frühe Diagnosestellung zu finden. Je früher die Diagnose gestellt werden kann, desto eher kann mit der Therapie begonnen werden und umso besser ist deren Erfolg (Gross et al. 2003). Es wird zudem aktuell versucht, Biomarker für das Alport-Syndrom aus Blutseren zu finden (Baum et al. 2008).

1.6.2 Biomarker + Proteomics

In den letzten Jahren haben sich die leistungsfähigen massenspektrometrischen Verfahren zur Proteinanalyse immer stärker durchgesetzt (Schrattenholz 2001).

Durch diese rasante Entwicklung ist die Detektion von Biomarkern eine der Hauptaufgaben in der Proteomforschung geworden. Hierbei stellt die Untersuchung in leicht zugänglichen Medien wie Urin einen der aussichtsreichsten Ansätze zur Identifikation von Biomarkern dar (Aebersold et al. 2003).

Der Begriff Proteom setzt sich aus den Wörtern Protein und Genom zusammen

und beschreibt die Gesamtheit aller Proteine in einer Zelle, einem Organismus oder einem Medium zu einem bestimmten Zeitpunkt (Wilkins et al. 1996).

Man muss hier aber zwischen dem Genom und dem Proteom unterscheiden. Während das Genom eines Organismus festgelegt ist, kann das Proteom sich je nach Lage und Stimulus verändern. So kann sich das Proteinmuster auf veränderte Umweltbedingungen des Zellmilieus, Temperatur, Stress oder Gewebestruktur und -eigenschaften hin ändern. Wurde früher noch postuliert, dass ein Gen nur ein Protein kodiert, weiß man heute, dass durch ein Gen mehrere Proteine entstehen können (Müller et al. 2007).

Proteine werden in ihrer Entstehung durch Umwelteinflüsse und Modifizierungen verändert und lassen sich nur durch quantitative Proteomanalysen erfassen. In dieser Arbeit sollen Proteine durch etablierte proteomische Verfahren identifiziert werden, die im Urin von Alport-Patienten klinisch relevant hochreguliert sind und somit im Rahmen dieser Erkrankung als Biomarker fungieren können. Die Grundlage hierfür stellt die Kopplung von zweidimensionaler Elektrophorese zusammen mit einem hochauflösenden Massenspektrometer dar. Mithilfe von Proteomics soll die Analyse von einem Körpermedium, wie in diesem Fall Urin, die krankheitsbedingten Proteinveränderungen des Alport-Syndrom widerspiegeln.

1.7 Hypothese

Das Alport-Syndrom ist eine kongenitale Erkrankung, die zu einer überwiegend autosomal rezessiven Mutation der $\alpha 3$ -, $\alpha 4$ - oder $\alpha 5$ -Ketten des Typ-IV Kollagen führt. Diese Kollagenketten sind in der Niere, dem Innenohr und den Augen zu finden. Unbehandelt führt dies zu einer glomerulären und interstitiellen Fibrose und Schwerhörigkeit. Eine kausale Therapie ist bisher nicht bekannt, jedoch verzögert die Einnahme eines ACE-Hemmers die Krankheitsprogredienz. Zudem hat sich gezeigt, dass ein möglichst früher Beginn der Therapie zu einem besseren Überleben führt. Bisher sind die diagnostischen Methoden für das Alport-Syndrom aufwendig und mit hohen Kosten verbunden. Aufgrund der ausgeprägten Proteinurie, die bei der Erkrankung auftritt, wurde die Hypothese aufgestellt, dass spezielle Proteine im Urin ausgeschieden werden, die bei Gesunden nicht filtriert werden und dass man sich diese Proteine als sogenannte Biomarker zur

einfacheren und somit frühen Diagnostik zu Nutzen machen kann. Es stellten sich zusammenfassend folgende Fragen:

- 1) gibt es Proteine im Urin an Alport-Syndrom erkrankter Kinder, die beim Gesunden nicht vorkommen?
- 2) Sind diese Proteine spezifisch für das Alport-Syndrom oder sind sie bei anderen Erkrankungen ebenfalls zu finden?
- 3) Lassen sich diese Proteine neben den proteomischen Methoden auch in einem ELISA-Test bestätigen?
- 4) sind die Proteine in einem größeren Klientel nachweisbar?

2 Material & Methoden

2.1 Materialien

Um sauberes und reines Arbeiten zu garantieren und Kontaminationen zu vermeiden wurden alle Materialien als Einwegartikel verwendet. Alle anderen Verbrauchsmaterialien wurden hierfür, wenn nötig, mit einem Wasserdampfdruck von 2 Bar bei 121°C für 20 Minuten autoklaviert.

2.1.1. Urin

Bei dieser Arbeit wurden Proben verwendet, die bei der Early Pro-Tect Alport Studie gewonnen wurden. Ziel dieser Studie ist es herauszufinden, ob die frühe Gabe von Ramipril zur Behandlung des Alport-Syndroms vorteilhaft ist und wann der ideale Therapiestartpunkt ist. Ebenfalls wurden nach potentiellen Biomarker im Urin zur Früherkennung der Erkrankung gesucht. Abbildung 6 zeigt den Aufbau der Studie.

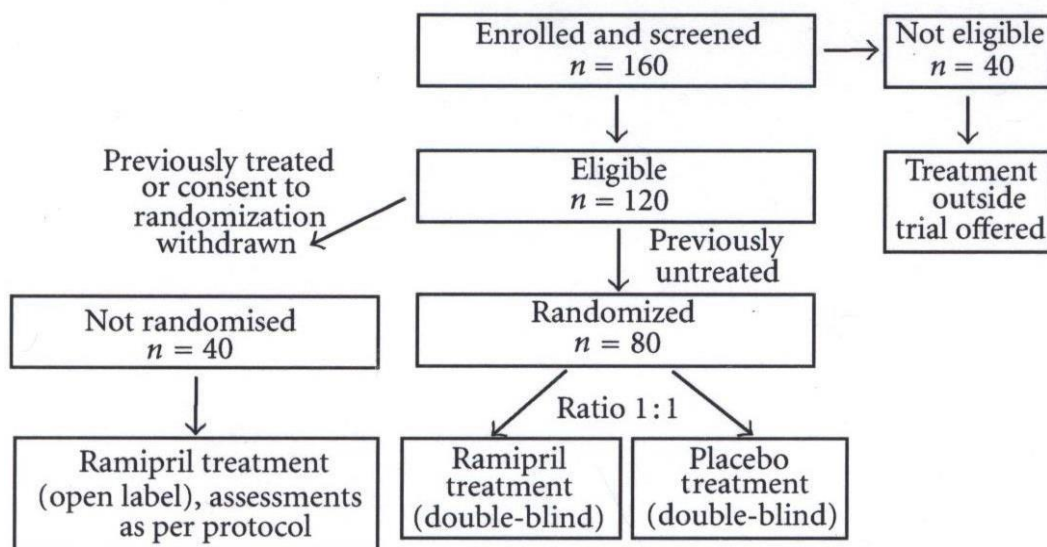


Abbildung 6: Studiendesign der Early Pro-Tect Alport Studie (Gross et al. 2012)

Für diese Arbeit wurde der Urin von Kindern mit nachgewiesenem Alport-Syndrom zwischen 2-18 Jahren mit dem von gesunden Kindern analysiert. Dabei waren die erkrankten Kinder alle mit dem ACE-Hemmer Ramipril vorbehandelt, da bei ihnen die Erkrankung bekannt war, und deshalb eine frühzeitige Therapie begonnen werden konnte.

Einschlusskriterien zur Teilnahme an der Studie waren

- a. Alter ≥ 24 Monate bis < 18 Jahre,
- b. gesicherte Diagnose des Alportsyndroms aufgrund einer Nierenbiopsie oder einer genetischen Untersuchung,
- c. Anamnesekriterien wie positive Familienanamnese, Augen- oder Innenohrveränderungen,
- d. Alport-Level 0-I bei Einschluss in die Studie,
- e. schriftliche Einwilligung des Patienten und/oder der Eltern oder der Bevollmächtigten.

Ausschlusskriterien waren

- a. ungesicherte Diagnose,
- b. Alport-Level II, III oder IV,
- c. Allergien oder Intoleranz gegenüber der Medikation,
- d. Kontraindikation gegen ACE-Hemmer,
- e. andere zusätzliche Erkrankungen (kardial, pulmonal, renal, hepato oder andere),
- f. bestehende Schwangerschaft oder Stillzeit g) Alkohol- oder Drogenabhängigkeit.

Die Ethikkommission der Universität Göttingen hat die Studie unter der Antragsnummer 11/6/11 und die Registersuche unter der Antragsnummer 10/11/06 genehmigt.

Abbildung 7 zeigt die aktuell gültige Stadieneinteilung für das Alport-Syndrom.

Stage	Definition
0	Microhaematuria without microalbuminuria (usually at birth)
I	Microalbuminuria (30–300 mg albumin/gCrea)
II	Proteinuria >300 mg albumin/gCrea
III	>25% decline of normal renal function (creatinine clearance)
IV	End-stage renal failure (ESRF)

Abbildung 7: Stadieneinteilung des Alport-Syndroms (Gross et al. 2012)

An dieser deutschlandweiten Studie nahmen 13 Universitätskliniken teil, jeder Patient mit Alport-Syndrom konnte an dieser Studie teilnehmen, sofern er die Kriterien erfüllte und bereit war, sich in eine der 13 Kliniken zu begeben. Der Urin wurde jeweils vor Ort durch eine geschulte Mitarbeiterkraft abgenommen. Hierfür wurde ein Urinbecher mit Mittelstrahlurin gefüllt, insgesamt 10 - 30ml pro Patient. Dieser Urin wurde dann für 10 Minuten bei 1000 G und 20 °C zentrifugiert, um Zellreste zu entfernen. Der Überstand wurde dann portionsweise zu 3 - 5ml in mehrere saubere Urinmonovetten umgefüllt und schnellstmöglich bei -20 °C (ideal -80 °C) eingefroren. Diese Proben wurden dann tiefgefroren in Trockeneis/Styroporbox nach Göttingen transportiert und dort bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C gelagert.

2.1.2. Chemikalien

Die nachfolgend aufgeführten Chemikalien, Antikörper, Verbrauchsmaterialien, Geräte und wissenschaftliche Software wurden für diese Arbeit verwendet. Sie wurden von verschiedenen Firmen bezogen, die im Einzelnen in den nachfolgenden Tabellen aufgelistet sind.

Tabelle 1: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
1,4 Dithiothreit	Roth, Karlsruhe
2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Acetonitril 99,5%	Roth, Karlsruhe
Ammoniumbicarbonat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampuwa	Fresinus Kabi, Bad Homburg
Bio-Lyte 3/10 Ampholyte	Bio Rad, Hercules, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
BSA (bovines Albuminserum) Standard	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Chaps (3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propan-sulfonat)	Merck, Darmstadt
Chloroform 99%	Merck, Darmstadt
Citrat Puffer Dako REAL (10x)	Dako, Glostrup, Dänemark
Coomassie Brilliant Blue G-250	Bio-Rad, München
Criterion XT MOPS (3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure) <i>running buffer</i> 20x	Bio Rad, Hercules, USA
Destilliertes Wasser	Laboreigene Herstellung
Essigsäure 99%	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Flamingo Farbstoff (<i>orale fluoreszent gel stain</i>) 10x	Bio Rad, Hercules, USA
Glycerin 87%	Merck, Darmstadt
Glycin 99%	Roth, Karlsruhe
Iodacetamid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Methanol >99%	Roth, Karlsruhe

Tabelle 1: Chemikalien

Mineralöl	Bio Rad, Hercules, USA
<i>precision plus protein standards</i>	Bio Rad, Hercules, USA
Markerprotein	
Protein Assay (Farbstoffkonzentrat)	Bio Rad, München
Roti-Blue (5xKonzentrat)	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
<i>sequencing grade modified trypsin</i>	Promega, Madison, USA
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
<i>sodium dodecyl sulphate, ultra pure</i>	Roth, Karlsruhe
Trifluoressigsäure	Merck, Darmstadt
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth, Karlsruhe
Pufferan 99,9%	
<i>urea for electrophoresis</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<i>vectashield mounting medium for fluorescence with Dapi</i>	Vector Laboratories, Inc, Burlingame, USA
Xylol	ThGeyer GmbH, Renningen

Tabelle 2: Antikörper

Antikörper	Herstellungstier	Hersteller
<i>anti-chondroitin sulfate proteoglycan 4 antibody</i> (Verdünnung 1:25)	Hase	LifeSpan Biosciences, Inc. Seattle, USA
<i>anti-mannan binding lectin serine peptidase 2 antibody</i> (Verdünnung 1:10)	Hase	GeneTex, Inc. San Antonio, USA
<i>anti-multimerin-2 antibody</i> (Verdünnung 1:10)	Ziege	Santa Cruz Biotech. Inc. Santa Cruz, USA
<i>anti-peroxiredoxin 2 antibody</i> (Verdünnung 1:1000)	Hase	Abcam, Cambridge, UK
<i>anti-tetranectin antibody</i> (Verdünnung 1:100)	Hase	LifeSpan Biosciences, Inc. Seattle, USA
<i>alexa flour 488 goat anti rabbit</i> (Verdünnung 1:1200)	Ziege	Invitrogen, Darmstadt
<i>alexa flour 488 donkey anti goat</i> (Verdünnung 1:400)	Esel	Invitrogen, Darmstadt

Tabelle 3 ELISA

ELISA	Hersteller
Chondroitin sulfate proteoglycan 4 ELISA Kit	Cusabio Biotech, Wuhan, China
Mannan binding lectin serine peptidase 2 ELISA Kit	USCN Life Science Inc., Houston, USA
Multimerin-2 ELISA Kit	USCN Life Science Inc., Houston, USA
Peroxiredoxin 2 ELISA Kit	USCN Life Science Inc., Houston, USA
Tetranectin ELISA Kit	USCN Life Science Inc., Houston, USA

2.1.3. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Criterion XT Precast Gel 12% BIS-Tris IPG + 1 Well comb	Bio-Rad, München
Eppendorf Cups	Eppendorf AG, Hamburg
Gelfärbeschalen	Roth, Karlsruhe
<i>Gentle Skin</i> Handschuhe	Meditrade, Kiefersfelden
Halb-Mikroküvetten 10 x 4 x 45 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Menzel-Deckgläser 24x60mm	Menzel GmbH, Braunschweig
Model 583 Gel Dryer Filter Paper	Bio-Rad, München
Pipettenspitzen weiß 10 µl, gelb 100 µl, blau 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
ReadyStrip IPG Strips 11cm, pH 4-7	Bio-Rad, München
Reaktionsgefäße 0,6ml DNase-, RNAsefrei	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Rührspatel	Sarstedt, Nümbrecht
Serological Pipette 10ml	Sarstedt, Nümbrecht
SuperFrost Objektträger 76x26mm	R. Langenbrinck, Emmendingen
Tube 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.4. Geräte

Tabelle 5: Geräte

Geräte	Modell	Hersteller
Auto-Cut Schneidegerät	2040	Reichert-Jung, Heidelberg
Dako Pen		Dako, Glostrup, Dänemark
<i>electrophoresis power supply</i>	PS 3002	Life technologies, Carlsbad, Californien, USA
Gelelektrophoresesystem	13 cm x 8 cm	Bio-Rad, München
Isoelektrisches Fokussiersystem	Protean IEF Cell	Bio-Rad, München
Kühlbare Tischzentrifuge	Sigma1-15PX, Rotor 12132H	Sigma, Osterode
Lab-Therm	Kühner	Braun, Burladingen
Magnetrührer	Ikamag RCT	IKA-Werke GmbH, Staufen
Massenspektrometer	Voyager DE-STR MALDI-TOF	Applied Biosystems, California, USA

Tabelle 5: Geräte

Multi Gourmet Dampfgarer		Braun GmbH, Kronberg
PH-Meter	PB-11	Sartorius, Göttingen
Photometer	Lambda 25 UV/VIS	
Spektrometer	Perkin-Elmer	LASGmbH, Rodgau
Sartorius Laborwaage	Universal	Sartorius, Göttingen
Scanner	Fluorescent Image Analizing System FLA-5100	Fujifilm, Düsseldorf
Spectra Mini ELISA Messgerät		Tecan, Männedorf, Schweiz
Speed-Vakuumzentrifuge	Univapo 150 H	UniEquip Laborgerätebau- und Vertriebs GmbH, Planegg
Ultraschallbad	Sonorex Super	Bandelin electronic, Berlin
Ungekühlte Tischzentrifuge	Centrifuge 5415D, Rotor 14198	Eppendorf, Hamburg
Vortexer	Reax 2000	Heidolph Instruments, Schwabach
Wärmebad	GFL 1083	GFL, Burgwedel

2.1.5. Software

Tabelle 6: Software

Software	Hersteller
Adobe Acrobat Reader	Adobe Systems GmbH
Data Explorer TM	Matrix Science
Decodon Delta2D 4.3	Decodon GmbH, Greifswald
Image Reader FLA 5000 V 3.0	Fujifilm, Düsseldorf
Lambda 25	Perkin-Elmer, Rodgau Jügesheim
Mascot Wizzard	Matrix Science
Microsoft Excel	Microsoft Deutschland GmbH

2.2 Methoden

2.2.1 Proteinbiochemische Vorbereitung der Gelelektrophorese

Die Probenvorbereitung ist ein essentieller Schritt in dem Prozess der Biomarkersuche, da hier die Grundlage für die gesamte Arbeit gelegt wurde. Die Urinproben mussten sorgfältig bearbeitet werden, um etwaige Kontamination von außen zu verhindern. Andererseits durfte die Bearbeitung auch nicht zu lange dauern, da sonst ein Proteinverlust durch Verdauung oder eine Modifizierung stattfinden konnte (Westermeier et al. 2002).

Um dafür zu sorgen, dass alle kovalenten und nicht-kovalenten Bindungen zwischen den einzelnen Proteinen und zwischen den Proteinen und Nicht-Proteinanteilen gelöst waren, wurde jede Urinprobe vor jeder Trennung der Proteine einer kompletten Denaturierung und Solubilisierung unterzogen. Hierdurch wurde auch die Aktivität von Proteasen, Phosphatasen und Glykosidasen gehemmt.

Durch diese Vorbereitung wurden die einzelnen Proben derart aufgearbeitet und gereinigt, dass ein ideales Weiterarbeiten möglich war (Schrattenholz 2001).

2.2.2 Proteinfällung

Die durchgeführte Proteinfällung erfolgte nach Wessel und Flügge (1984). Die im nachfolgenden beschriebene Fällung eines Methanol-Chloroform- Gemisches bezieht sich auf eine 100 µl Probe. Bei davon abweichenden Mengen der einzelnen Urinproben wurden die anderen Substanzen dementsprechend angepasst.

Einer 100 µl Probe Urin wurden zuerst 400 µl Methanol zugefügt und kurz mit dem Vortexer geschüttelt. Anschließend erfolgte hierzu die Gabe von 100 µl Chloroform und ebenfalls wurde dies kurz mit dem Vortexer geschüttelt. Als letztes wurde 300 µl destilliertes Wasser zugefügt, das Gemisch erneut kurz mittels des Vortexers geschüttelt und abschliessend für 1 Minute bei 14.000 G und bei 4 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation befanden sich die Proteine zwischen den beiden Phasen,

so dass die obere Phase vorsichtig abpipettiert werden konnte. Hiernach wurde dem Rest erneut 400 µl Methanol hinzugegeben und anschließend mit dem Vortexer kurz geschüttelt. Danach wurde das Gemisch wieder zentrifugiert, diesmal für 2 Minuten bei 14.000 G und 4 °C. Diesmal lagerte sich das Proteinpellet am Boden des Gefäßes ab, war aber instabil, so dass bei der Abnahme der darüber liegenden Phase Vorsicht angesagt war.

Ein letztes Mal wurden 400 µl Methanol hinzugegeben, das Gemisch kurz mit dem Vortexer geschüttelt und erneut für 2 Minuten bei gleichen Einstellungen zentrifugiert. Darauf folgend wurde wieder vorsichtig die obere flüssige Phase abpipettiert und das Proteinpellet für 15 - 20 Minuten unter dem Abzug getrocknet, bis die letzte Flüssigkeit verdampft war.

2.2.3 Proteinbestimmung

Für die 2D-Gelelektrophorese wurden 150 µg Protein benötigt. Um die unbekannt Proteinkonzentration der Probe, die in µg/µl angegeben wird zu bestimmen, bediente man sich photometrischer Techniken. In diesem Fall benutzte man die Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford 1976).

Coomassie Brilliant Blau G-250®, ein Triphenylmethanfarbstoff, bildet in saurer Lösung mit kationischen, nichtpolaren und hydrophoben Aminosäureketten der Proteine einen Komplex. Dies verursacht eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 zu 595 nm. Bei dieser Wellenlänge werden Extinktionsänderungen im Photometer gemessen, die die Grundlage für die Errechnung der Proteinkonzentration bilden.

Als erstes wurde eine Färbelösung im Verhältnis 1:5 angesetzt (10 ml Farbstoff und 40 ml destilliertes Wasser). Diese verdünnte Färbelösung wurde nach Tabelle 7 in Halbmikroküvetten gegeben und mit BSA gemischt. Zur Fehlerreduzierung wurde immer eine Doppelbestimmung angesetzt. Nach der Zugabe von BSA wurde das Gemisch kurz umgerührt und danach für 10 Minuten stehen gelassen, so dass die Reaktion stattfinden konnte. Nach Ablauf der Zeit wurden die Proben gemessen mit dem Programm Lambda 25 und der Methode: Wp HST_PROT.MWP 595nm.

Tabelle 7: Bradford-Pipettierschema

Färbelösung [μ l]	BSA [μ l]
1000	0
998	2
996	4
994	6
992	8
990	10

Mit Hilfe der Absorptionsergebnisse des Photometers und der bekannten BSA-Konzentrationen konnte eine Kalibrierkurve und somit mittels linearer Regression eine Funktionsgleichung erstellt werden. Mit Hilfe dieser Gleichung ließ sich die Proteinkonzentration der unbekanntenen Urinproben errechnen. Hierfür wurde zu dem getrocknete Proteinpellet 10 μ l Lysepuffer (bestehend aus 9,5 M Urea (28,8 g), 2% Chaps (1 g), 10 mM PMSF, 2% Ampholyte (20 μ l in 1000 μ l) und 1% DTT (10 mg in 1000 μ l)) gegeben und gerührt, bis alles vollständig gelöst und die Lösung klar war. Für die Proteinbestimmung betrug das Probenvolumen 1 - 2 μ l, welches auf 1000 μ l mit der zuvor benutzten Färbelösung gemischt wurde. Erneut wurde das Gemisch kurz umgerührt und 10 Minuten gewartet, so dass die Reaktion stattfinden konnte. Anschließend wurde die Extinktion gemessen und die Proteinkonzentration mit Hilfe der Funktionsgleichung berechnet.

2.2.4 Zweidimensionale Elektrophorese in der Proteomforschung

2.2.4.1 Allgemeine Grundlagen

Die zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist nach wie vor das am besten geeignete Verfahren zur Auftrennung und Differenzierung von vielen Proteinen. Das Grundprinzip jeder Elektrophorese ist die Wanderung elektrisch geladene Teilchen in einem elektrischen Feld. Da jedes Teilchen, in diesem Fall jedes Protein, eine ganz spezielle Wanderungsgeschwindigkeit hat, können so die

unterschiedlichen Proteine getrennt werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit setzt sich aus drei Merkmalen zusammen, auf die im Folgenden kurz eingegangen wird (Schrattenholz 2001).

Ladungsunterschiede und pI-Wert

Jedes Protein hat eine spezielle Aminosäuresequenz. Einige Aminosäuren sind saurer, andere sind basischer Natur. Somit hat jedes Protein sein eigenes Muster aus geladenen Aminosäuren, es sind Polyelektrolyte. Der pI-Wert ist der pH-Wert, an dem das Protein neutral geladen ist, da sich die positiven und negativen Ladungen der Aminosäurereste gegenseitig aufheben. An diesem sogenannten isoelektrischen Punkt bewegt sich das Protein nicht im elektrischen Feld (Schrattenholz 2001).

Massenunterschiede

Ein zweiter wichtiger Unterschied zwischen den einzelnen Proteinen ist ihre Masse. Aufgrund der unterschiedlichen Länge der Aminosäuresequenz der Proteine besitzt jedes eine eigene molekulare Masse (Mr). Diese Massenunterschiede und die daraus resultierenden Größenunterschiede macht man sich zu Nutze, da diese sich in unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten ausdrücken (Schrattenholz 2001).

Chemisch-physikalische Unterschiede

Die bereits erwähnten unterschiedlichen Eigenschaften der Aminosäurereste drücken sich auch in der Beschaffenheit der Oberfläche eines Proteins aus. Verschiedene Wechselwirkungen der Proteine mit der Matrix beeinflussen ebenfalls seine Wanderung. Diese Interaktionen drücken sich als Affinitäts-, Retentions- oder Bindungseigenschaften aus.

Die ebenfalls zu diesem Feld gehörenden Eigenschaften, wie die Konformation oder die räumliche Struktur, spielen für die hier beschriebene Methode eine untergeordnete Rolle. (Schrattenholz 2001).

2.2.4.2 Die erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Bei der isoelektrischen Fokussierung nutzt man die Tatsache, dass jedes Protein eine eigene Ladungseigenschaft hat. In einem elektrischen Feld wandert jedes einzelne Protein an den Ort, an dem es seinen isoelektrischen Punkt (pI-Wert) erreicht hat und seine Ladung gleich Null ist und somit auch seine Mobilität. Durch dieses Verfahren erreicht man, dass sich das Protein an einem Ort anreichert (Schrattenholz 2001).

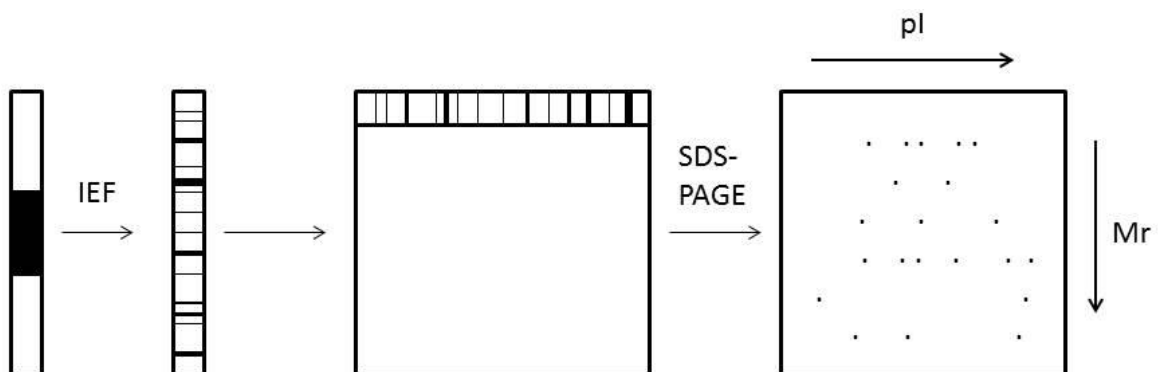


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Gelelektrophorese (modifiziert nach Schrattholz et al. 2001)

Die Durchführung der ersten Dimension erfolgte nach dem gängigen Arbeitsprotokoll (Dihazi et al. 2005). Als erstes nahm man die IPG-Streifen (11 cm, pH 4-7) aus dem Kühlfach und legte sie auf ein Papiertuch, damit sie auftauten. Derweil wurde die Fokussierkammer gründlich mit 70% Ethanol und destilliertem Wasser gereinigt und trocknete es im Anschluss, um Verunreinigungen zu vermeiden. Als nächstes bereitete man den Rehydratationspuffer vor, bestehend aus 8 M Urea, 1% Chaps, 2,15 mg (15 mM) DTT, 0,2% (2 μ l) Ampholyte (pH 3-10) und 2% (2 μ l) Bromphenolblau. DTT wurde zur Herstellung reduzierender Bedingungen und zur

Spaltung von Disulfidbrücken zwischen den Aminosäureresten benutzt (Schrattenholz 2001).

Um später ein gutes Ergebnis zu bekommen, wurden 150 µg Protein benötigt. Durch die Proteinbestimmung konnte man errechnen, wieviel µl von dem gelösten Protein benötigt wurde, um die gewünschte Menge zu erhalten. Diese Menge wurde mit dem Rehydratationspuffer zu einem Endvolumen von 175 µl verdünnt und vorsichtig in die Fokussierkammer gegeben. Hierbei sollte keine Blasenbildung entstehen, da diese den weiteren Prozess stören würden. Anschließend wurde vorsichtig der IPG-Streifen mit der Gelseite voraus auf die Flüssigkeit gelegt. Dabei war wichtig zu beachten, dass Plus- und Minuspol des Streifens und der Kammer übereinstimmten und wiederum keine Blasen entstanden. Damit der Streifen die Lösung absorbieren konnte, ließ man die Kammer für ca. 20-30 Minuten bei Raumtemperatur stehen bis die gesamte Flüssigkeit eingezogen war. Als nächstes wurden 2 ml Mineralöl auf den Streifen gegeben, um eine Austrocknung während der Fokussierung zu vermeiden. Anschließend deckte man die Kammer mit einem Deckel zu und stellte diese in das Fokussiergerät. Der anschließende Vorgang dauerte etwas 18 - 22 Stunden. Er begann mit einer passiven Rehydratationszeit, die 11 Stunden dauerte und bei der kein Strom floss. Der anschließende aktive Ablauf ist in Tabelle 8 aufgelistet. Nach der vollständigen Fokussierung nahm man die Streifen vorsichtig aus der Kammer heraus und ließ das Mineralöl auf einem Filterpapier abtropfen. Wichtig bei diesem Vorgang war, dass die Gelseite nicht kontaminiert wurde. Anschließend wurden die Streifen equilibriert.

Tabelle 8: Fokussierprogramm für die erste Dimension

Schritt	Spannung [V]	Gradient	Dauer	Funktion
1	200	linear	1 h	Proteineintritt
2	500	rapid	1 h	Proteineintritt
3	1000	rapid	1 h	Proteineintritt
4	2000	rapid	1 h	Fokussierung
5	8000	rapid	50000 Vhrs	Fokussierung
6	500	rapid	12 h	Step and Hold

2.2.4.3 Equilibrierung

Die Equilibrierung war aus mehreren Gründen notwendig. Zum einen mussten Stoffe, die für die isoelektrische Fokussierung notwendig waren, entfernt werden, da diese sonst die Wechselwirkungen mit der Gelmatrix stören würden. Zum anderen musste darauf geachtet werden, dass oxidative Prozesse verhindert werden, vor allem die Reoxidation freier Sulfidgruppen zu Disulfidbrücken.

Daher wurde in einem ersten Schritt 10 ml Equilibrierpuffer I (6 M Urea, 30% Glycerol (w/v), 2% SDS (w/v), 0,05 M Tris-HCl, 2% (100 mg) DTT und 0,25% (50 µl) Bromphenolblau) auf den Streifen gegeben. Der Farbstoff war notwendig, um in der zweiten Dimension den Verlauf anzuzeigen.

Nachdem der Streifen 20 Minuten lang in dem Puffer geschüttelt wurde, kippte man diesen vorsichtig ab und gab 10 ml Equilibrierpuffer II (6 M Urea, 30% Glycerol (w/v), 2% SDS (w/v), 0,05 M Tris-HCl, 2,5% (400 mg) Iodacetamid und 0,25% (50 µl) Bromphenolblau) auf den Streifen und ließ ihn erneut für 20 Minuten schütteln. Durch das Iodacetamid wurden die Cystinreste alkyliert, und es konnten sich keine neuen Disulfidbrücken ausbilden (Schrattenholz 2001).

2.2.4.4 Die zweite Dimension:

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei diesem Verfahren wurden alle Proteine nach kompletter Denaturierung in einheitliche, vollständig entfaltete Polypeptidketten mit gleichartigen Ladungseigenschaften überführt. Erreicht wurde dies durch Natriumdodecylsulfat (SDS), welches ein negativ geladenes und stark denaturierendes Detergens ist. Es hebt alle nicht-kovalenten Bindungen der Proteine auf. Dadurch konnte eine Trennung der Proteine nach ihrer Masse erreicht werden. Kleinere Proteine wanderten schneller durch die Gelmatrix als größere, da jene weniger Wechselwirkungen eingingen (Schrattenholz 2001).

Für den Ablauf der zweiten Dimension wurde sich dem gängigen Protokoll bedient (Dihazi et al. 2005).

Für die Durchführung der zweiten Dimension wurden kommerziell verfügbare Criterion®-Gele (12%ige Bis-Tris-Gele mit einer Vertiefung für die 11 cm langen IPG-Streifen) verwendet. Diese wurden in die Elektrophoresebox gegeben und mit

einer Flüssigkeit bestehend aus 50 ml Criterion XT MOPS Laufpuffer und 950 ml destilliertem Wasser gefüllt. Anschließend wurde die Box komplett mit Eis umgeben, damit die Gele optimale Bedingungen hatten, da bei dem Vorgang Wärme entstand. In den als Standardbereich gekennzeichneten Ort der Gele wurden 7 µl Markerprotein gegeben. Danach legte man vorsichtig die fertigequilibrierten IPG-Streifen in die Vertiefung der Gelkammern, so dass der Pluspol dem Markerprotein anlag. Für die folgende Auftrennung nach dem Molekulargewicht wurde für etwa 60 Minuten eine Spannung von 200 V auf die Elektrophoresebox gegeben. Das bei der Equilibrierung dazugegebene Bromphenolblau diente hierbei als Verlaufsparemeter.

Nach Beendigung des Vorganges mussten die Gele fixiert werden, da sonst kontraproduktive Prozesse der SDS-solubilisierten Proteine begannen, die das Ergebnis verändert hätten (Schrattenholz 2001).

Hierfür wurden die Gele für 1 - 2 Stunden in eine Fixierlösung gegeben, die aus 500 ml Methanol, 120 ml Essigsäure und 380 ml destilliertem Wasser bestand, und auf die Schüttelwaage gestellt (Pesic et al. 2011).

2.2.5 Färbemethoden von Proteinen in 2D-Gele

Um die aufgetrennten Proteine sichtbar zu machen, wurden mehrere Färbungsmethoden angewandt, die im Folgenden kurz dargestellt werden.

Floureszenzfärbung

Die Flamingo®-Färbung dient der fluoreszenzmarkierten Färbung der Proteine. Hierfür wurde eine 1:10 Verdünnung mit 20 ml Flamingo®-Färbelösung und 180 ml destilliertem Wasser angesetzt und diese anschließend auf das Gel gegossen, nachdem die Fixierlösung vorher entfernt wurde. Das Ganze wurde mit Alufolie umhüllt, damit kein Licht an den Farbstoff kommen konnte, und über Nacht auf die Schüttelwaage gestellt. Am nächsten Tag konnte das 2D-Gel bei 700 V mit dem Fuji FLA-5100 Scanner digitalisiert werden (Pesic et al. 2011).

Coomassiefärbung

Nach dem Scannen wurden die Gele über Nacht in eine Coomassie-Färbelösung gegeben. Diese bestand aus 120 ml destilliertes Wasser, 40 ml Methanol und 40 ml Roti-Blue®-Farbstoff. Durch diesen Prozess konnten die einzelnen Proteine für den weiteren Vorgang visualisiert werden (Pesic et al. 2011).

2.2.6 Trypsin-Verdau von Proteinen

Nachdem man nun in den vorangegangenen Schritten die Proteine aus dem Urin nach Ladung und Masse aufgetrennt hatte, konzentrierten sich die folgenden Schritte auf die Identifizierung der einzelnen Proteine. Hierzu wurden zunächst die mit Coomassie angefärbten Spots aus den Gelen ausgestochen, anschließend eluiert und zuletzt mit Hilfe des Protease Trypsin enzymatisch gespalten. Dieses spaltet die Proteine immer spezifisch nach den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin, sodass für jedes Protein eine ganz eigene Polypeptidzusammensetzung entsteht (Schrattenholz 2001).

Der Ablauf des Trypsinverdaues wird im Folgenden erläutert (Hellman et al. 1995; Dihazi et al. 2009).

Jeder Gelspot, der ein zu identifizierendes Protein darstellt, wurde mit Hilfe einer 1,5 mm Stanze ausgestochen und in ein neues, sauberes Eppendorf-Gefäß überführt. Die Gelstückchen wurden dann dreimal mit Ampuwa-Wasser umspült. Als nächstes wurde dem Spot 15 µl 50%iges Acetonitril zugeführt, in dem es dann für 15 Minuten lag. Nach der Entfernung der 50%igen Lösung gab man die gleiche Menge an 100%igem Acetonitril hinzu, in dem sich das Gelstück anschließend für 1 Stunde befand. Nach Ablauf dieser Zeit entfernte man die Flüssigkeit wieder und gab stattdessen 15 µl 100 mM Ammoniumbikarbonat hinzu und ließ es für 5 Minuten inkubieren. Danach pipettierte man noch einmal 15 µl 100%iges Acetonitril hinzu und wartete 15 Minuten. Anschließend wurden beide Flüssigkeiten entfernt, sodass nur noch das Gelstück zurückblieb. Anschliessend wurde das Gelstück für 20 Minuten unter dem Abzug getrocknet. Dieser Vorgang

diente dazu, zum einen die blaue Coomassie-Färbung aus dem Gelspot zu entfernen und zum anderen, diesen für das kommende Trypsin empfänglich zu machen.

Der nächste Schritt beinhaltete die eigentliche Verdauung der Proteine. Hierfür wurde zunächst ein Verdauungspuffer angesetzt bestehend aus 1940 µl destilliertem Wasser, 10 µl Calciumchlorid und 50 µl 1 M Ammoniumbikarbonat. Wichtig hierbei war die Endkonzentration der beiden letztgenannten Komponenten. Aus diesem Puffer wurden nun 100 µl zu 12,5 µl Trypsin gegeben. Trypsin wurde seinerseits vom Hersteller schon mit einem Puffer geliefert. Dabei wurde Trypsin in 200 µl von diesem Puffer gelöst, sodass eine Trypsinkonzentration von 0,1 µg/µl entstand. Von diesem Trypsin-Puffer-Gemisch wurden nun 7 µl auf jedes getrocknete Gelstück gegeben und ließ dieses für 45 Minuten auf Eis inkubieren. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Flüssigkeit abpipettiert und durch 10 µl Verdauungspuffer ohne Trypsin ersetzt, sodann für 24 Stunden in den Inkubator bei 37°C gestellt.

Am folgenden Tag wurde der inkubierte Verdauungspuffer in neue Eppendorf-Gefäße abpipettiert. Zu dem Gelspot wurde 20 µl einer Lösung aus 30% Acetonitril und 70% Trifluoressigsäure gegeben und anschließend für 30 Minuten in ein Ultraschallbad gestellt. Danach wurde diese Lösung wieder abgenommen und gab sie in das Eppendorf-Gefäß zu der ersten. Auf das Gelstück wiederum gab man diesmal 20 µl von einer Lösung bestehend aus 60% Acetonitril und 40% Trifluoressigsäure und stellte das Gemisch erneut für 30 Minuten in das Ultraschallbad. Nach Ablauf dieser Zeit gab man die Flüssigkeit zu den ersten beiden und konnte das Gelstück jetzt verwerfen. Die Eppendorf-Gefäße mit den aus dem Verdau entstandenen Peptidfragmenten, die bis dahin noch in Flüssigkeit gelöst waren, wurden nun in der Speed-Vakuumzentrifuge getrocknet. Die Proben wurden nach der Trocknung bis zur weiteren Bearbeitung eingefroren, sofern sie nicht sofort weiterverwendet wurden.

2.2.7 Massenspektrometrie

2.2.7.1 Grundprinzipien

Die Massenspektrometrie ist nach wie vor eine der wichtigsten analytischen

Methoden und wird unter anderem auch für die Identifikation von Proteinen benutzt. Obwohl es viele verschiedene Arten von Massenspektrometern gibt, ist der Grundaufbau bei allen gleich. Dieser wird im Folgenden kurz erläutert. Es gibt vier Grundelemente, die man in jedem Massenspektrometer findet. Als erstes gibt es die Probenschleuse/das Einlasssystem, durch welche die zu identifizierende Probe in ein Hochvakuumssystem gegeben wird. Das Vakuumsystem ist notwendig, um Stoßreaktionen der Ionen mit Luftpartikeln zu vermeiden. Diese Stoßreaktionen hätten eine geringere Nachweisempfindlichkeit zur Folge. Als nächstes gibt es die Ionenquelle, deren Aufgabe die Erzeugung und Beschleunigung von Ionen ist. Diese Ionen sind vor allem durch ihre spezifische Ladung m/z und ihre Geschwindigkeit v charakterisiert. Danach ist ein Massenanalysator dazwischengeschaltet. Er ist für die Massentrennung der Ionen zuständig, die nach ihrem m/z -Verhältnis geteilt werden. Dies erreicht er durch elektrische oder magnetische Felder. Als letztes kommt der Detektor, der die Qualität der dort ankommenden Ionenströme aufzeichnet. Die Informationen aus der Ionenquelle, dem Analysator und dem Detektor werden zur Messsteuerung und Datenprozessierung an den Computer weitergeleitet (Schrattenholz 2001).

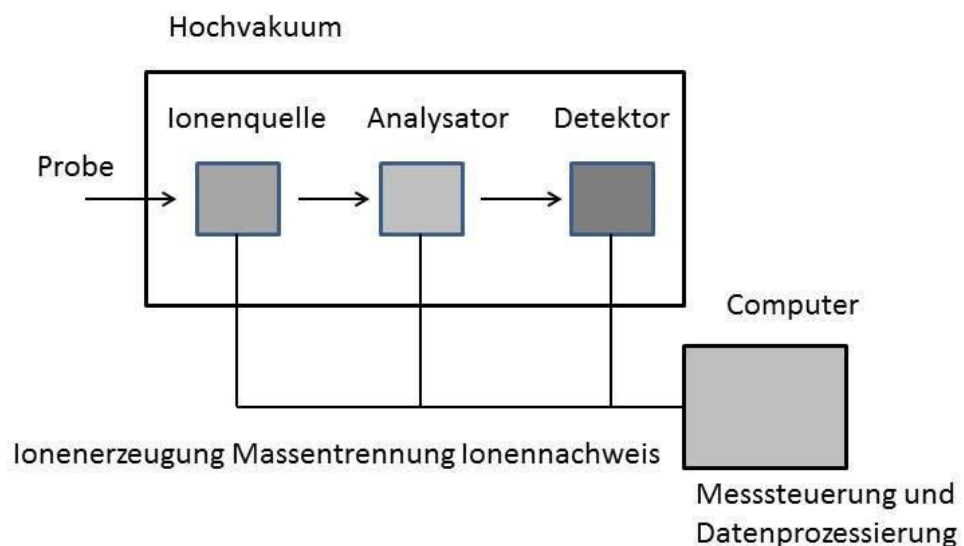


Abbildung 9: Funktionselemente eines Massenspektrometers (modifiziert nach Schrattholz et al. 2001)

2.2.7.2 MALDI-TOF-MS

Die MALDI-TOF-MS (*matrix assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry*) wurde für die Identifizierung der Proteine verwendet. Sie ist eine schnelle und sehr sensitive Methode. Es ist zudem ein schonendes Verfahren, da die Moleküle beim Ionisierungsprozess nicht zerstört werden. Bei der MALDI-TOF-MS wird die zu untersuchende Probe in eine kristalline Matrix eingebunden. Diese Matrix ist so gewählt, dass sie beim Bestrahlen mit einem UV-Laser das Laserlicht stark aufnimmt, was zur Verdampfung der Matrix führt. Dadurch werden die eingeschlossenen Moleküle frei und können schonend und fragmentierungsarm in die Gasphase überführt werden. Die Analyse von Peptidgemischen mittels MALDI-TOF-MS ergibt Spektren, die mit einem Fingerabdruck verglichen werden können, und so kann durch einen Vergleich mit einer Datenbank das richtige Protein identifiziert werden (Schrattenholz 2001).

2.2.7.3 Vorbereitung des Probenträgers

Der Probenträger wurde abwechselnd gründlich mit Methanol, 50%igem Acetonitril und 100%igem Acetonitril gewaschen. Hiernach wurde es komplett mit System A, einer 0,3%igen Trifluoressigsäure, bedeckt und für 5 Minuten stehen gelassen, sodass sie einziehen konnte. Abschließend wurde der Probenträger noch einmal mit 50 und 100%igem Acetonitril abgespült und danach trocknen lassen. Derweil wurden die Peptidfragmente in 4 µl System A gelöst. Anschließend wurde 0,7 µl DHB (2,5-Dihydroxybenzoesäure), welches die Matrix darstellt, auf den vollständig getrockneten Probenträger gegeben. Dazu wurde jeweils 1,4 µl von dem gelösten Protein gegeben. Nachdem alles auskristallisiert war, konnte die Messung im MALDI-TOF-MS beginnen. Der Probenträger war selbst mit Nummern versehen, so dass es pro Nummer ein zu untersuchendes Protein war und man dieses in Tabellen übernehmen konnte (Hellman et al. 1995; Dihazi et al. 2009).

2.2.7.4 Spektrenerfassung und Proteinidentifikation

Mit dem Voyager-DE-STR-Massenspektrometer der Firma Applied Biosystems erfolgte die massenspektrometrische Analyse des Proteinverdaus. Dabei wurde

mit einer Beschleunigungsspannung von 20 kV gemessen.

Nach mehrfacher Messung und Anhäufung einzelner Spektren jedes Gelspots fand die Proteinidentifizierung durch die Datenbank SwissProt statt. Dabei wurde die Vorverarbeitung der Spektren von dem halbautomatischen Programm Mascot Wizzard übernommen. Der Signifikanzwert (p-Wert) wurde auf $<0,05$ festgelegt. Ein Protein galt als identifiziert, wenn es in der SwissProt-Datenbank die Signifikanzgrenze von 55 überschritten hatte (Takemori et al. 2006).

2.2.7.5 ESI-MS

Die ESI-MS (*electrospray-ionisation-mass spectrometry*) wurde ebenfalls zur Identifikation der Proteine eingesetzt. Genauso wie das MALDI-TOF-MS ist auch diese eine schonende Methode, durch die die Moleküle beim Ionisierungsprozess nicht zerstört werden.

Unter Atmosphärendruck wird die zu untersuchende Probenlösung durch eine dünne Kapillare gesprüht (ca. 5 $\mu\text{l}/\text{Minuten}$), auf der ein Potential von mehreren Kilovolt liegt. Hierdurch wird die Probe beim Verlassen der Kapillarenspitze in viele kleine Tröpfchen zerstäubt, die alle elektrisch geladen sind. Für den Ionisierungsprozess gibt es zwei Theorien. Die eine besagt, dass mit zunehmender Ladungsdichte der Tröpfchen die Coulomb-Abstoßung der darin enthaltenen Moleküle größer wird als die bestehende Oberflächenspannung der Tröpfchen und dadurch einzelne Moleküle austreten können. Die andere Theorie besagt, dass, wenn ein Gleichgewicht zwischen der Coulomb-Abstoßung und der Oberflächenspannung besteht, die Tröpfchen sukzessiv zerplatzen (Coulomb-Explosion).

Während beim MALDI-TOF-MS überwiegend nur einfach geladene Ionen erzeugt werden, ist dies beim ESI-MS von dem m/z -Bereich abhängig. Ist dieser <1000 Da entstehen bevorzugt einfach geladene, ist dieser >2000 Da bevorzugt mehrfach geladene Ionen (Schrattenholz 2001).

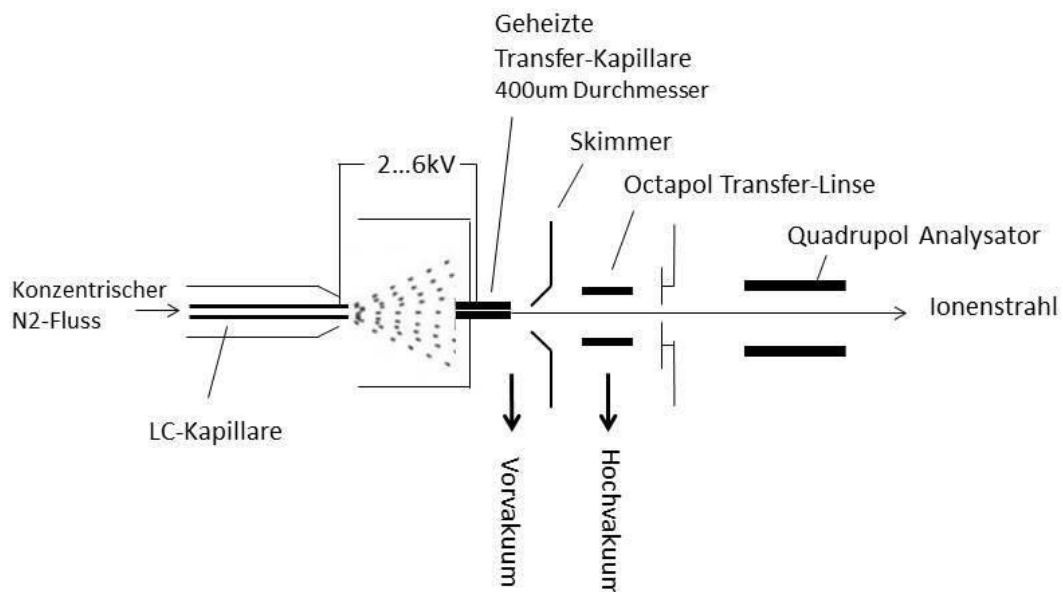


Abbildung 10: Aufbau einer ESI-Ionenquelle (modifiziert nach Schrattholz et al. 2001)

2.2.7.6 ELISA

Zur Bestätigung der im 2D-SDS-PAGE gefundenen Proteine wurden *enzyme-linked immunosorbent assay's* (ELISA's) durchgeführt. Es wurden sogenannte Sandwich-ELISA benutzt. Bei diesem Verfahren sind die einzelnen Vertiefungen (englisch: *well*) bereits mit einem Antikörper (englisch: *capture antibody*) gegen das zu detektierende Protein beschichtet. Das Protein bindet während der Inkubationszeit spezifisch an den Antikörper. Im nächsten Schritt wird ein weiterer Antikörper (englisch: *detection antibody*) gegen das zu bestimmende Protein dazugegeben, der an ein anderes Epitop des Proteins bindet, und lässt das Ganze wieder inkubieren. Dieser Detektionsantikörper ist zusätzlich noch mit Biotin verbunden. Anschließend werden die einzelnen Vertiefungen gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen, sodass nur die gebundenen verbleiben. Danach wird ein zusätzlicher Antikörper zugegeben, der gegen das Biotin des Detektionsantiköpers bindet. Ferner ist an diesen Antikörper ein Enzym gebunden, welches das nach einer weiteren Inkubationsphase hinzugegebene Substrat umwandelt. Hierdurch findet eine Farbreaktion statt, die anschließend mit dem Photometer gemessen und ausgewertet wird.

Die Vorbereitung und Durchführung erfolgt nach dem jeweils mitgelieferten Arbeitsprotokoll.

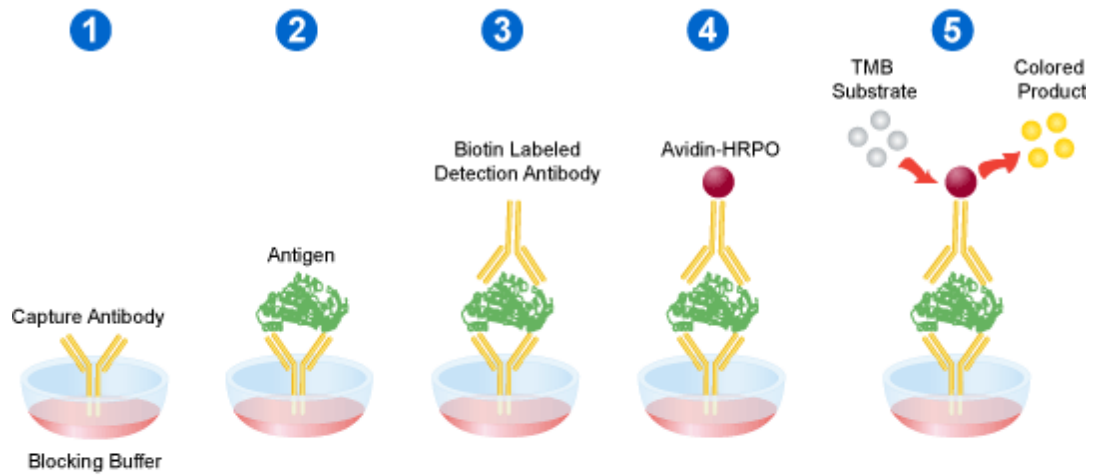
Reagenzvorbereitung: Da sowohl die zu testenden Urinproben, als auch die gelieferten Reagenzien bei -20 °C oder bei $+2-8\text{ °C}$ gelagert wurden (jeweils so, wie es von der Firma vorgeschrieben wurde), ließ man alles zuerst für ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen, um alles aufzutauen und zu erwärmen. Der mitgelieferte Standard wurde zuerst für 30 Sekunden bei 6000 – 10000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und anschließend mit 1 ml *standard diluent* gelöst, geschwenkt und für 10 - 15 Minuten stehen gelassen. Nach Ablauf dieser Zeit wurde eine Verdünnungsreihe erstellt. Hierfür wurden 7 Eppendorf Röhrchen mit jeweils 500 µl *standard diluent* vorbereitet. Anschließend wurde aus dem konzentrierten Standard 500 µl in das erste Röhrchen gegeben und gut gemischt, so dass eine 1:2 Verdünnung entstand. Danach wurde aus dem verdünnten Standard 500 µl in das zweite Eppendorf gegeben und wie oben beschrieben verfahren bis hin zum sechsten Röhrchen. Das letzte Eppendorf wurde als Nullwert genommen. Das *detection reagent* A und B wurde ebenfalls kurz zentrifugiert und danach in einer 1:100 Verdünnung in das bereits vorbereitete *assay diluent* A und B gegeben. Der *assay diluent* seinerseits wurde 1:2 mit Ampuwa-Wasser verdünnt bevor das *detection reagent* dazugegeben wurde. Zur Herstellung der Waschlösung wurde das Waschpuffer-Konzentrat (30x konzentriert) mit Ampuwa-Wasser aufgefüllt bis eine einfache Konzentration erreicht war. Das TMB-Substrat wurde lichtgeschützt gelagert, da es sehr empfindlich war.

Probenvorbereitung: Die Urinproben wurden mit PBS 1:2 und 1:3 verdünnt, so dass eine Doppelbestimmung durchgeführt werden konnte. Zusätzlich wurden immer einige Urinproben von gesunden Kindern mitbestimmt als Negativkontrolle. Diese Proben wurden ebenfalls 1:2 mit PBS verdünnt.

Durchführung: Zu Beginn wurde ein Plattenplan beschriftet, sodass sicher war, in welchen Nöpfchen sich welche Probe befand. Anschließend wurde analog zu dem Plan 100 µl der Proben, der Negativkontrolle, des Standard und des Nullwerts in die jeweiligen Nöpfchen pipettiert. Zur Fehlerminimierung wurde alles als Doppelbestimmung angesetzt. Die Platte wurde mit einer mitgelieferten Folie abgedeckt und für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Flüssigkeit vorsichtig entfernt. Hierbei musste man darauf achten, dass die Wände

oder der Boden der einzelnen Nöpfchen nicht beschädigt wurden. Wichtig war, dass nach diesem Schritt noch nicht gewaschen wurde. Hiernach wurden 100 µl des *detection reagent A* in jedes Nöpfchen gegeben, die Platte wieder abgedeckt und erneut für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Inkubationsperiode wurde die Flüssigkeit wiederum entfernt und die Platte dreimal mit der vorbereiteten Waschlösung gewaschen. Hierfür gab man 350 µl des Waschpuffers in jedes Nöpfchen und ließ es für 2 Minuten stehen, entfernte die Lösung wieder und wiederholte diesen Vorgang. Nach dem letzten Waschgang war es sehr wichtig, dass die Platte absolut trocken war. Jetzt wurde je 100 µl von dem *detection reagent B* hinzugegeben, erneut abgedeckt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit wieder entfernt und nach dem bereits beschriebenen Verfahren fünfmal gewaschen. Auch diesmal war es essentiell, dass am Ende die Platte wieder trocken war. Im Anschluss wurde in jedes Nöpfchen 90 µl des TMB-Substrat gegeben, nochmals abgedeckt und 15 - 25 Minuten bei 37 °C inkubiert. Dieser Inkubationsvorgang sollte nicht länger als 30 Minuten dauern. Es wurde empfohlen, alle 10 Minuten zu kontrollieren, damit die Farbintensität nicht zu kräftig wird. Bei Vorhandensein des zu untersuchenden Proteins verfärbte sich die Lösung in diesem Schritt bläulich. Nach Beendigung der enzymatischen Umsetzung des TMB-Substrats gab man 50 µl Stopplösung, eine Säure, hinzu, die die Reaktion stoppte. Dies bewirkte einen Farbumschlag von blau zu gelb. Nun musste die Platte zeitnah im Mikroplate Reader bei 450 nm gemessen werden. Aufgrund der optischen Dichte und der mit angesetzten Standardkurve, wurde einem ebenfalls gleich die Konzentration des jeweiligen Proteins ausgerechnet.

Sandwich ELISA



- 1** a.) Plate is coated with a suitable capture antibody. b.) Blocking buffer is added to block remaining protein-binding sites on plate.
- 2** Sample is added to plate and any antigen present is bound by the capture antibody.
- 3** A suitable biotin labeled detection antibody is added to the plate and also binds to any antigen present in well.
- 4** UltraAvidin™-HRPO (*Leinco Prod. No. A106*) is added and binds the biotin labeled detection antibody.
- 5** TMB substrate (*Leinco Prod. No. T118*) is added and converted by HRPO to a detectable form.

Abbildung 11: Schematische Darstellung des Prinzip eines Sandwich ELISA (<https://www.leinco.com/sandwich-elisa-protocol/>)

2.2.8 Immunfluoreszenzfärbung der Nierengewebeschnitte aus einem Mausmodell mit Alportsyndrom

Da sich die Ergebnisse dieser Studie komplett von denen der vorhergegangenen Mäuse-Studie (Doktorarbeit Imke Schmidt-Eylers 2012) unterscheiden, wurde in einem letzten Schritt untersucht, ob sich die Expression dieser Proteine in Mausnieren vom Alport-Syndrom Mausmodell verglichen zur Kontrolle unterscheiden. Hierfür wurden Semidünnschnitte von Mäusenieren mit spezifischen Antikörpern gegen die einzelnen Proteine versehen und diese mit einem sekundären Fluoreszenzantikörper detektiert. Um einen guten Vergleich zu erlangen wurden die Nieren von Wildtypmäusen und

COL4A3-Knockout-Mäusen (Alport-Syndrom Mausmodell) jeweils im Alter von 4,5 und 6 Wochen untersucht. Um eine bessere Repräsentierbarkeit zu gewährleisten wurden immer mehrere Mäusenieren eines Alters untersucht und pro zu untersuchenden Protein immer ein doppelter Ansatz gewählt. Vor den eigentlichen Versuchen wurden die einzelnen Antikörper auf ihre Wirksamkeit und auf die einzusetzende Konzentration getestet. Für die Arbeit wurden mir freundlicherweise bereits in Paraffin eingelegte Mäusenieren zur Verfügung gestellt, die meinen Vorgaben, was das Alter der Mäuse betraf, entsprachen. Zuerst wurden mit Hilfe eines Mikrotoms die Semidünnschnitte erstellt und auf entsprechend beschriftete Objektträger überführt. Auf jeden Objektträger wurden immer zwei Schnitte gegeben, so dass einer als Kontrolle fungieren konnte. Nach dem Schneiden wurden die Schnitte bei 37 °C für 1 Stunde getrocknet und anschließend trocken gelagert.

Die Vorbereitung und Färbung der Nierenschnitte erfolgte nach laboreigenem Protokoll. Zuerst wurde eine Deparaffinisierung durchgeführt. Hierfür wurden die einzelnen Schnitte für zweimal 10 Minuten in Xylol gegeben. Anschließend mussten die jetzt paraffinfreien Nierenschnitte gewässert werden. Dazu wurden die Präparate nacheinander in Bäder mit absteigender Alkoholkonzentration getaucht. Zu Beginn gab man sie für zweimal 5 Minuten in 100% Ethanol, danach für zweimal 5 Minuten in 96% Ethanol und abschließend für zweimal 5 Minuten in 70% Ethanol. Hiernach wurden die Schnitte noch 5 Minuten lang mit destilliertem Wasser abgespült. In nächsten Schritt wurden die Nierenpräparate mit Citratpuffer zusammengegeben. Dieser wird zehnfach-konzentriert geliefert und muss auf eine

einfache Konzentration mit destilliertem Wasser verdünnt werden. Dieser Schritt geschieht, um die Antigenstellen, die durch die initiale Paraffinisierung und anschließende Deparaffinisierung verändert wurden, wieder zugänglich für die Antikörper zu machen. Dafür gab man diese zusammen mit dem Citratpuffer in ein hitzefestes Gefäß und stellte es für 40 Minuten in einen Dampfgarer. Dieser wurde bereits 5 Minuten vorher angestellt, sodass er bereits auf Betriebstemperatur war, wenn die Schnitte hinzugegeben wurden. Nach Abschluss dieser Zeit wurden die Nierenschnitte für dreimal 10 Minuten mit *tris-buffered saline* (TBS) auf dem Schüttler gewaschen. TBS stellt man her, indem man 60,57 g 0,5 M Tris und 87,6 g 1,5 M NaCl in einem Liter destilliertem Wasser auflöst und den pH-Wert mit Salzsäure auf 7,6 einstellt. Nachdem die Schnitte gewaschen wurden, mussten sie geblockt werden. Hierfür wurden die Objektträger vorsichtig getrocknet, wobei man darauf achten musste, nicht auf die Nieren zu kommen und sie nicht zu beschädigen. Anschließend zog man mit einem Wachsstift (Dako Pen) einen Kreis um die Präparate. Dieser Wachskreis bewirkte, dass die Blockierflüssigkeit nicht abließ, sondern auf den Nieren blieb. Zum Blocken gab man 100 µl einer Lösung, die aus 5% Bovines Serumalbumin (BSA) gelöst in TBS besteht, auf die einzelnen Schnitte und ließ das Ganze für 1 Stunde bei Raumtemperatur stehen. Nach Ablauf der Stunde wurde die Blockierlösung entfernt und der erste Antikörper auf die Schnitte gegeben. Pro Objektträger wurden immer zwei Nierenschnitte aufgetragen. Einer wurde mit 100 µl des Antikörpers versetzt, der andere mit 100 µl 5% BSA in TBS und diente als Negativkontrolle. Zu Beginn der Experimente wurde die jeweilige optimale Konzentration für jeden einzelnen Antikörper ermittelt. Die einzelnen Antikörper wurden wie folgt angesetzt:

- Anti-Chondroitin sulfate proteoglycan 4 1:25
- Anti-Mannan-binding lectin serine protease 2 1:25
- Anti-Multimerin-2 1:20
- Anti-Peroxiredoxin-2 1:200
- Anti-Tetranectin 1:50

Anschließend wurden die Schnitte über Nacht bei 4 °C gelagert, sodass die Antikörper mit den jeweiligen Proteinen interagieren konnten.

Am folgenden Tag wurde die Flüssigkeit wieder entfernt und die Nierenschnitte dreimal für 10 Minuten mit TBS auf dem Schüttler gewaschen, so dass nicht-

gebundene Antikörper entfernt werden konnten. Auf die gewaschenen Präparate wurde nun der zweite Antikörper gegeben, der spezifisch an den ersten Antikörper bindet. Dieser ist fluoreszierend, so dass dieser später unter dem Mikroskop nachgewiesen werden kann und somit der Nachweis oder das Fehlen des zu detektierenden Proteins bewiesen wird. Entsprechend des Herstellungstieres der Primärantikörper, musste jeweils der passende Sekundärantikörper aufgegeben werden. So wurde in einem ersten Schritt unter licht-geschützten Bedingungen, um die Aktivität des Sekundärantikörpers nicht zu vermindern, dieser in einem Verhältnis von 1:200 mit 5%iger BSA in TBS verdünnt. In einem zweiten Schritt wurden nun jeweils 100 µl dieses Gemisches auf die wieder vorsichtig getrockneten Nierenschnitte gegeben. Auch dieser Schritt fand unter licht-geschützten Bedingungen statt. Hiernach ließ man den neuen Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur interagieren. Nach Ablauf dieser Zeit mussten die mit den Nierenschnitten besetzten Objektträger erneut gewaschen werden, diesmal um die überschüssigen Sekundärantikörper zu entfernen. So wurden abermals für dreimal 10 Minuten mit TBS auf dem Schüttler gewaschen, diesmal aber ohne Lichteinfall. Abschließend wurden die Objektträger wieder vorsichtig abgetrocknet und mit Fluoreszenz DAPI Eindeckmedium eingebettet. Hierbei musste darauf geachtet werden, dass sich zwischen dem Objektträger und dem Deckgläschen keine Luftblasen bilden, da diese die spätere Bildqualität und die Auswertung verschlechtern würden. Nach dem Eindeckprozess wurden die Präparate wieder über Nacht bei 4 °C stehen gelassen.

Am nächsten Tag wurden die einzelnen Schritte unter dem Fluoreszenz-Mikroskop begutachtet und zur Ergebnissicherung Fotos gemacht.

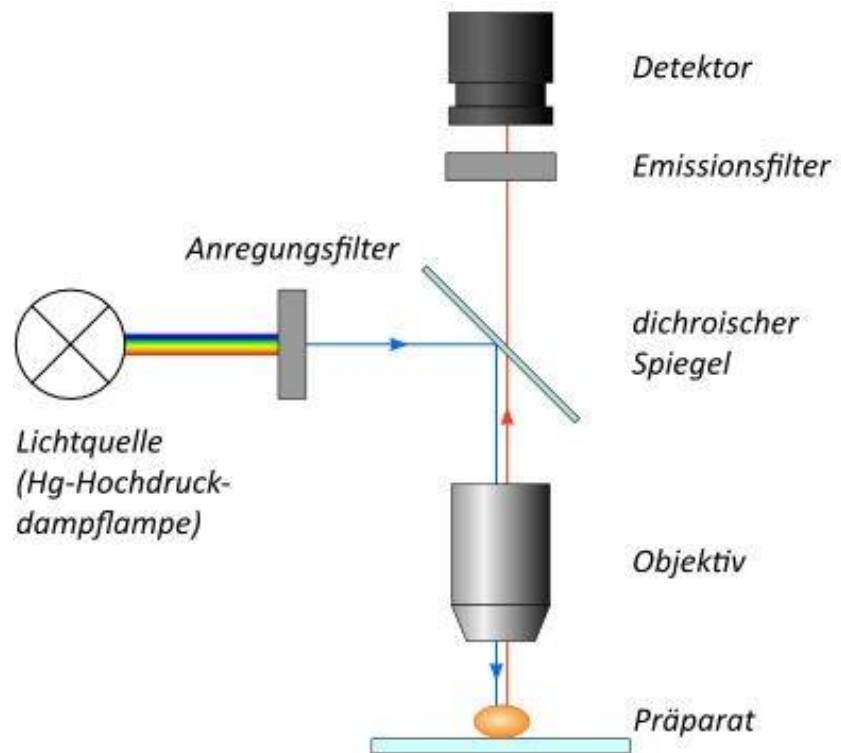


Abbildung 11: Aufbau eines Fluoreszenzmikroskopes

3 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, spezifische Proteinbiomarker im Urin von Patienten im frühen Stadium des Alport-Syndrom zu finden. Hierfür wurde der Urin von erkrankten Kindern mit dem von gesunden Kindern verglichen.

Die Ergebnisse lassen sich folgendermaßen gliedern, dass zuerst die Resultate der Proteomics-Analysen dargestellt werden und anschließend die Validierung der Proteomicsdaten mittels ELISA. Abschließend wird noch ein kurzer Vergleich zwischen den Ergebnissen dieser Studie und denen der vorangegangenen Studie an COL4A3-Knockout-Mäusen auf Gemeinsamkeiten und Unterschiede hergestellt.

3.1 Präsentation der 2D-Gele

In einem ersten Schritt wird von jeder gesunden Kontrollprobe ein 2D-Gel erstellt. Dies erfolgt stets nach dem gleichen Prinzip, sodass eine optimale Vergleichbarkeit garantiert werden kann. Zur Vereinfachung wurden diese Gele am Computer mit Hilfe des Programms Delta2D übereinandergelegt, so dass ein Mastergel entsteht, was als Vergleich für die erkrankten Proben dienen kann.

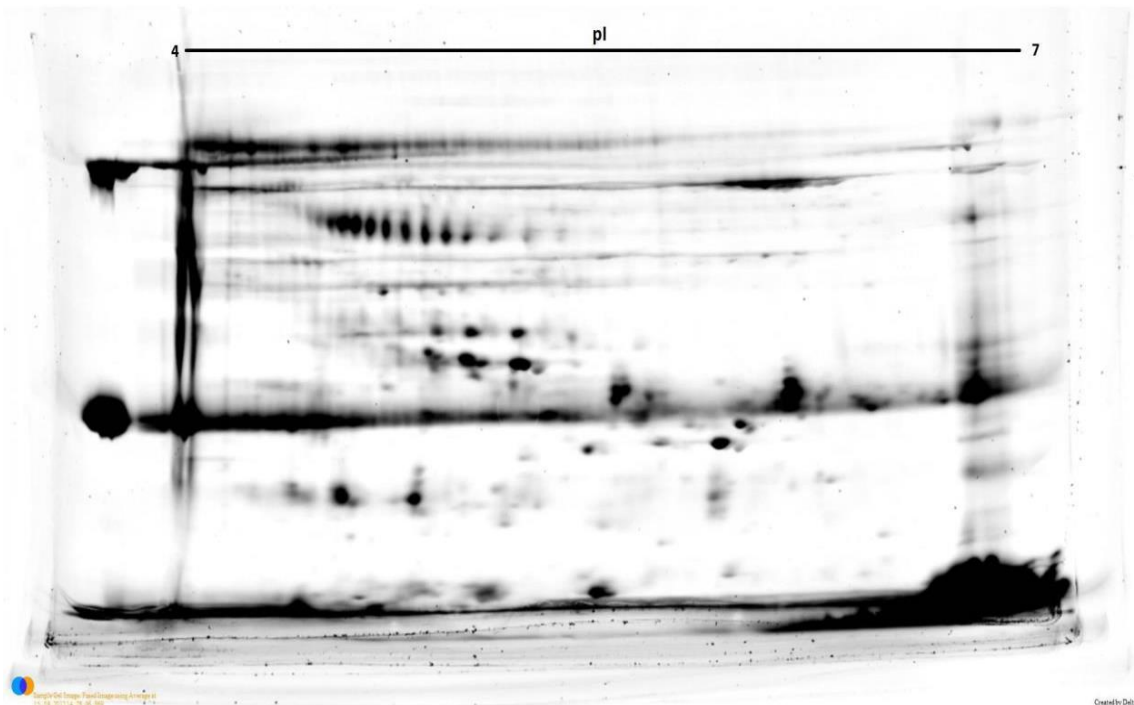


Abbildung 12: Mastergel der Kontrollproben

In Abbildung 13 ist dieses Mastergel zu sehen. Jeder schwarze Punkt stellt ein Protein dar, aufgetrennt nach Ladung und Größe.

In einem nächsten Schritt wird nun jedes erstellte Gel der Studienproben mit dem Mastergel verglichen. Hierfür werden erneut mit Hilfe des Programms Delta2D die Gele auf dem Computer übereinandergelegt und auf Unterschiede wie auch Gemeinsamkeiten überprüft.



Abbildung 13: Urinproteomprofile der Alport-Patienten (blau) und der gesunden Kontrollgruppen (orange) im Vergleich

In Abbildung 14 ist ein solcher Vergleich zu sehen. Das Urinproteomprofil der Gesunden (hier orange gefärbt) weist einige Unterschiede auf im Vergleich mit dem der Erkrankten (hier blau gefärbt). Gemeinsamkeiten werden in diesem Beispiel schwarz dargestellt. Man kann sehen, dass es mehr blaue Spots als orangen-farbende gibt, was darauf hinweist, dass im Alport-Syndrom mehr Proteine ausgeschieden werden.

Diese Spots, die nur in den Gelen der Studienproben vorkommen, werden nun in einem nächsten Schritt identifiziert.

Zusammenfassend zeigt sich bereits hier, dass im Urin der erkrankten Kinder sich deutlich mehr Proteine zeigen, welche im Urin der gesunden Kontrollprobanden nicht vorkommen. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit auf einen potentiellen Biomarker.

3.2 Identifikation der Urinproteine mit Hilfe von MALDI-TOF-MS und ESI-MS

Durch Trypsinverdau und mit Hilfe von massenspektrometrischen Verfahren wurden im Folgenden nun die Gelspots identifiziert, die bei den Erkrankten vorkamen aber nicht bei den Gesunden. Hierdurch wurden nun 67 verschiedene Proteine gefunden, die in Tabelle 9 aufgelistet sind. In den folgenden Gelen sind diese Proteine mit ihren Gelnamen dargestellt, sofern sie in dieser Probe vorkamen.

Es fällt auf, dass manche Proteine mehrfach in einer Probe identifiziert wurden, obwohl sie sich an verschiedenen Orten auf dem Gel befinden. Dies bedeutet, dass entweder die Masse oder der pI-Wert sich unterscheidet. Dies kann durch posttranslationale Modifizierung erklärt werden, wodurch sich die Proteinseitenketten unterscheiden, was wiederum Einfluss auf die Masse wie auch die Ladung hat. Zum einen gibt es hier die posttranslationale Glykolisierung, die Einfluss auf beide Eigenschaften hat und zum anderen heterogene Phosphorylierungen, die nur den isoelektrischen Punkt verändern (Seo et al. 2004). Zudem können in jedem Gel viele verschiedene Fragmente des Albumins gefunden werden, die sich ebenfalls sowohl in ihrer Ladung als auch in ihrer Masse unterscheiden.

Auf Grund dieser Ursachen werden mehr Gelspots untersucht, als letztendlich Proteine identifiziert werden.

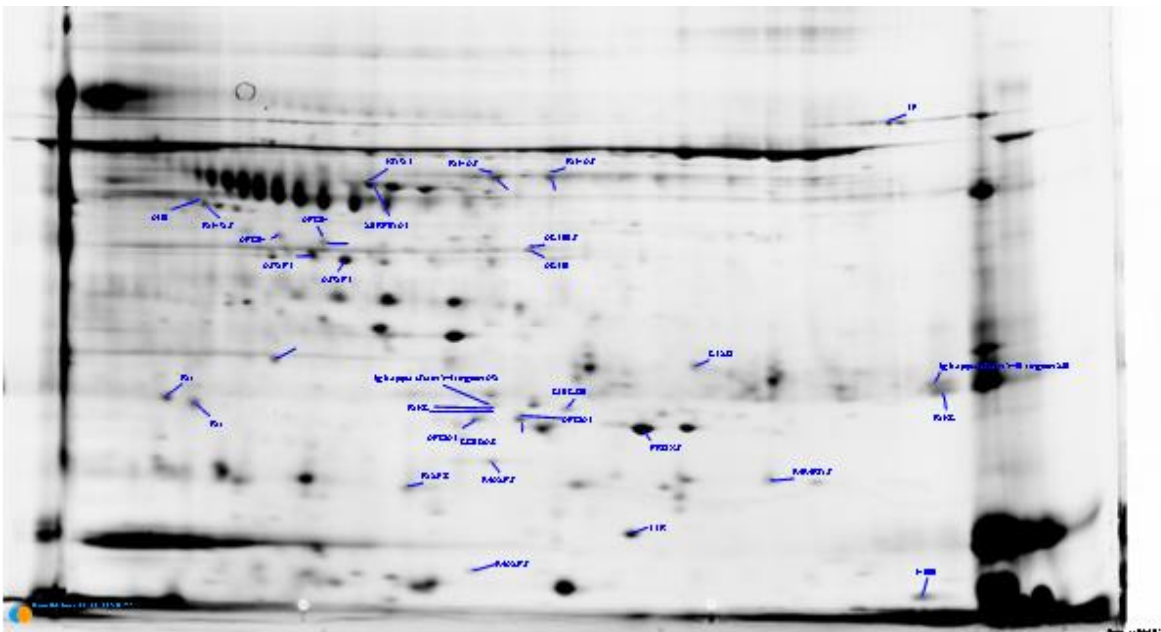


Abbildung 14:: 2D-Gel der Probe 93_05_01 (am Alport-Syndrom erkrankt)

Die einzelnen schwarzen Flecken stellen unterschiedliche Proteine dar, aufgeteilt nach Ladung und Grösse. Je weiter links die Proteine, desto negativer ihre Ladung. Je weiter unter die Proteine, desto kleiner ist ihre Masse.

Die jeweiligen blauen Beschriftungen stellen unterschiedlich identifizierte Proteine mit den jeweiligen Abkürzungen dar.

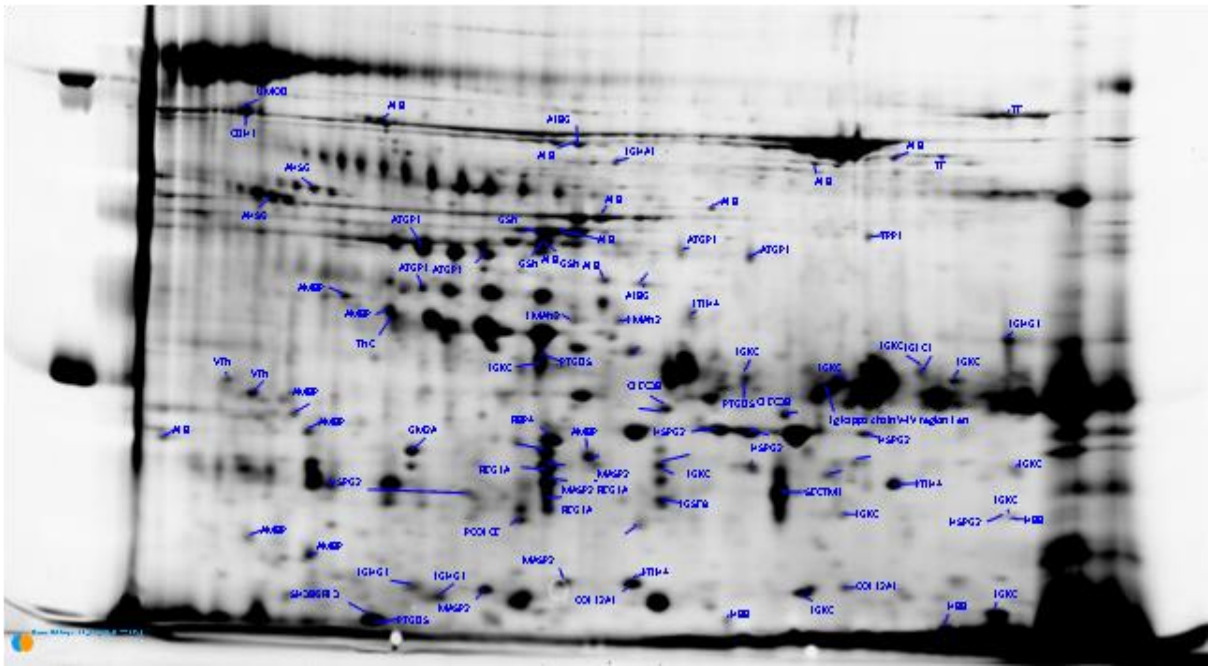


Abbildung 15: 2D-Gel der Probe 93_05_02 (am Alport-Syndrom erkrankt)

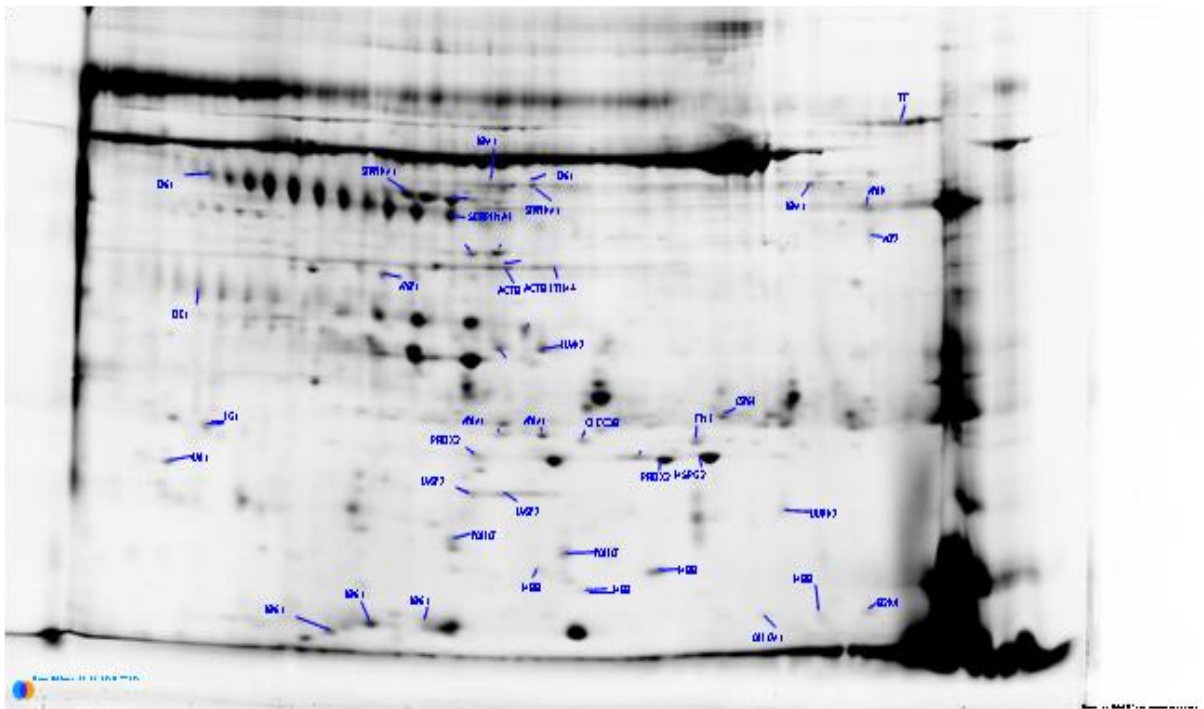


Abbildung 16: 2D-Gel der Probe 93_05_03 (am Alport-Syndrom erkrankt)

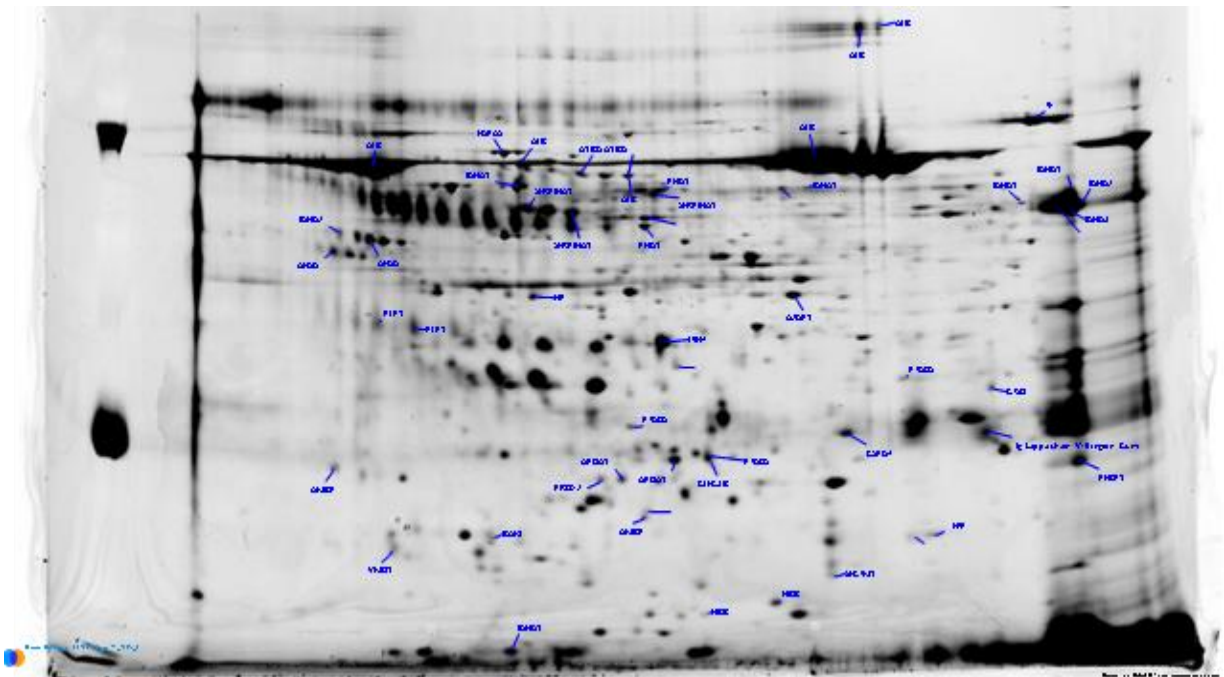


Abbildung 17: 2D-Gel der Probe 93_11_02 (am Alport-Syndrom erkrankt)

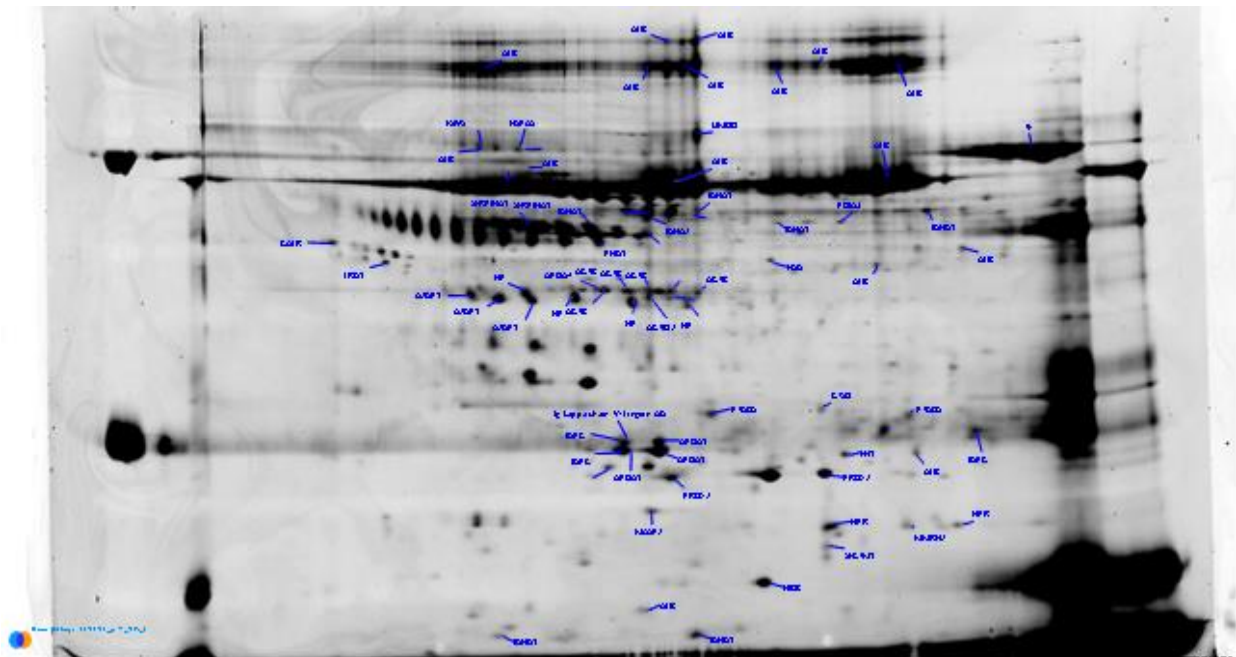


Abbildung 18: 2D-Gel der Probe 93_13_02 (am Alport-Syndrom erkrankt)

Nach der vollständigen Untersuchung jedes Proteinspots auf den einzelnen Gelen, werden die Ergebnisse verglichen und sich auf diejenigen Proteine konzentriert, die sich in den einzelnen Proben wiederholen und sich bezüglich ihrer Ausscheidung im Urin von Kontrollprobanden unterscheiden. Diese Proteine kommen entweder in allen fünf Proben oder in vier aus den fünf verschiedenen Proben vor.

Diese Proteine sind: Alpha-1-antitrypsin, Apolipoprotein A-I, *Chondroitin sulfate proteoglycan 4*, *Hemoglobin subunit beta*, *Ig alpha-1 chain C region*, *Ig gamma-1 chain C region*, Kininogen-1, *Mannan-binding lectin serine protease 2*, Multimerin-2, Peroxiredoxin-2, Prostaglandin-H2 D-isomerase, Serotransferrin, Serum albumin, Tetranectin und Zinc-alpha-2-glycoprotein.

Tabelle 9 Identifizierte Proteine mittels Proteomics und Massenspektromie. Nach dem Namen alphabetisch geordnet mit dem zugehörigen Gennamen und der Akzession. Das jeweilige Gewicht des Proteins in Dalton, der jeweilige pH-Wert, an dem das Protein seinen isoelektrischen Punkt einnimmt und abschliessed der Score mit der das Protein in der Onlinedatenbank indentifiziert wurde

Name des Proteins	Genname	Akzession	Masse [Da]	pI- Wert	Score
78 kDa glucose-regulated protein	HSPA5	GRP78_HUMAN	72,33	5,07	213
Actin, cytoplasmic 1	ACTB	ACTB_HUMAN	41,74	5,29	401
Alpha-1-antitrypsin	SERPINA1	A1AT_HUMAN	46,74	5,37	506
Alpha-1B-glycoprotein	A1BG	A1BG_HUMAN	54,25	5,56	410
Alpha-2-HS-glycoprotein	AHSG	FETUA_HUMAN	39,33	5,43	298
Apolipoprotein A-I	APOA1	APOA1_HUMAN	30,78	5,56	932
Apolipoprotein A-IV	APOA4	APOA4_HUMAN	45,4	5,28	313
Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	HSPG2	PGBM_HUMAN	468,83	6,06	871
Beta-2-glycoprotein 1	APOH	APOH_HUMAN	38,3	8,34	209
Beta-2-microglobulin	B2M	B2MG_HUMAN	13,72	6,06	112
Beta-actin-like protein 2	ACTBL2	ACTBL_HUMAN	42	5,39	145
Cadherin-1	CDH1	CADH_HUMAN	97,46	4,57	366
Calreticulin	CALR	CALR_HUMAN	48,14	4,29	83
Cathepsin D	CTSD	CATD_HUMAN	44,55	6,1	460

Tabelle 9 Identifizierte Proteine mittels Massenspektromie.

Proteomics und

Chondroitin sulfate proteoglycan 4

CSPG4	CSPG4_HUMAN	250,54	5,27	135
Collagen alpha-1 (XII)	COL12A1 COCA1_HUMAN	333,15	5,38	131
Collagen alpha-3 (VII)	COL6A3 CO6A3_HUMAN	343,67	6,26	205
Fibrinogen gamma chain	FGG FIBG_HUMAN	51,51	5,37	67
Fibronectin	FN1 FINC_HUMAN	262,63	5,46	115
Ganglioside GM2 activator	GM2A SAP3_HUMAN	20,84	5,17	127
Gelsolin	GSN GELS_HUMAN	85,7	5,9	401
Haptoglobin	HP HPT_HUMAN	45,21	6,13	236
Haptoglobin-related protein	HPR HPTR_HUMAN	39,03	6,63	147
Hemoglobin subunit beta	HBB HBB_HUMAN	16	6,74	182
Ig alpha-1 chain C region	IGHA1 IGHA1_HUMAN	37,67	6,08	371
Ig alpha-2 chain C region	IGHA2 IGHA2_HUMAN	36,53	5,71	312
Ig gamma-1 chain C region	IGHG1 IGHG1_HUMAN	36,11	8,46	561
Ig gamma-2 chain C region	IGHG2 IGHG2_HUMAN	35,9	7,66	221
Ig gamma-3 chain C region	IGHG3 IGHG3_HUMAN	41,29	8,23	204
Ig gamma-4 chain C region	IGHG4 IGHG4_HUMAN	35,94	7,18	255
Ig kappa chain C region	IGKC IGKC_HUMAN	11,61	5,58	869
Ig kappa chain V-I region AG	KV101_HUMAN	11,99	5,67	295
Ig kappa chain V-II region Cum	KV201_HUMAN	12,68	5,28	100
Ig kappa chain V-III region SIE	KV302_HUMAN	11,78	8,7	269
Ig kappa chain V-IV region Len	KV402_HUMAN	12,64	7,92	253
Ig lambda-1 chain C regions	IGLC1 LAC1_HUMAN	11,35	7,89	170
Immunoglobulin J chain	IGJ IGJ_HUMAN	18,1	5,09	152
Immunoglobulin superfamily member 8	IGSF8 IGSF8_HUMAN	65,03	8,23	173
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	ITIH4 ITIH4_HUMAN	103,36	6,51	147
Kallikrein-1	KLK1 KLK1_HUMAN	28,89	4,68	89
Kininogen-1	KNG1 KNG1_HUMAN	71,96	6,34	356
Leucine-rich alpha-2- glycoprotein	LRG1 A2GL_HUMAN	38,18	6,45	154
Lithostathine-1-alpha	REG1A REG1A_HUMAN	18,73	5,65	375
Lysosomal acid phosphatase	ACP2 PPAL_HUMAN	48,34	6,28	82
Mannan-binding lectin serine protease 2	MASP2 MASP2_HUMAN	75,7	5,39	352

Tabelle 9 Identifizierte Proteine mittels Massenspektromie

Proteomics und

Multimerin-2	MMRN2	MMRN2_HUMAN	104,41	5,56	130
Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	PEBP1	PEBP1_HUMAN	21,06	7,01	81
Peroxiredoxin-2	PRDX2	PRDX2_HUMAN	21,89	5,66	426
Procollagen C-endopeptidase enhancer 1	PCOLCE	PCOC1_HUMAN	47,97	7,41	195
Prostaglandin-H2 D-isomerase	PTGDS	PTGDS_HUMAN	21,03	7,66	300
Protein AMBP	AMBP	AMBP_HUMAN	39	5,95	383
Protein disulfide-isomerase A3	PDIA3	PDIA3_HUMAN	56,78	5,98	144
Retinol-binding protein 4	RBP4	RET4_HUMAN	23,01	5,76	186
Secreted and transmembrane protein 1	SECTM1	SECTM1_HUMAN	27,04	7	170
Serotransferrin	TF	TRFE_HUMAN	77,06	6,81	835
Serum albumin	ALB	ALBU_HUMAN	69,37	5,92	1181
SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3	SH3BGRL3	SH3L3_HUMAN	10,44	4,82	323
Tenascin	TNC	TENA_HUMAN	240,85	4,79	197
Tetranectin	CLEC3B	TETN_HUMAN	22,54	5,52	448
Transthyretin	TTR	Q53WY6_HUMAN	4,57	8,18	127
Tripeptidyl-peptidase 1	TPP1	TPP1_HUMAN	61,25	6,01	173
Uromodulin	UMOD	UROM_HUMAN	69,76	5,05	196
Vesicular integral-membrane protein VIP36	LMAN2	LMAN2_HUMAN	40,23	6,46	235
Vitamin D-binding protein	GC	VTDB_HUMAN	52,96	5,4	103
Vitellogenesis membrane outer layer protein 1 homolog	VMO1	VMO1_HUMAN	21,53	4,9	209
Vitronectin	VTN	VTNC_HUMAN	54,31	5,55	197
Zinc-alpha-2-glycoprotein	AZGP1	ZA2G_HUMAN	34,26	5,71	758

Im folgenden Schritt wurde zu diesen 15 Proteinen in der Literatur nachgelesen, ob diese bereits in anderen (nephrologischen) Erkrankungen beschrieben und nachgewiesen worden sind. Sollte dies zutreffen, wäre der einzelne Marker nicht mehr spezifisch für das Alport-Syndrom.

Nach dieser Recherche bleiben noch 5 Proteine übrig. Diese sind:

- Chondroitin sulfate proteoglycan 4

- Mannan-binding lectin serine protease 2
- Multimerin-2
- Peroxiredoxin-2
- Tetranectin

Zinc-alpha-2-glycoprotein wird im Zusammenhang mit verschiedenen Krebsarten beschrieben, wobei vor allem bei Prostata- und Blasenkrebs dieses Protein im Urin erhöht ist (Hassan et al. 2008). Kininogen-1 ist erhöht bei fortschreitendem Nierenversagen bei Personen mit Diabetes mellitus Typ 1 (Merchant et al. 2013). Prostaglandin-H2 D-Isomerase (Synonym: Prostaglandin D Synthase) wird vermehrt im Urin ausgeschieden von Menschen, die an Diabetes mellitus Typ 2 leiden (Hirawa et al. 2001). Albumin wird bei mehreren Stoffwechselkrankheiten, wie Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2 über den Urin abgegeben. Auch bei Hypertonikern kann eine erhöhte Albuminausscheidung beobachtet werden (de Zeeuw et al. 2006; Weir et al. 2007). Serotransferrin, Zinc-alpha-2-glycoprotein, Alpha-1-antitrypsin und Albumin können nachgewiesen werden bei diabetischer Nephropathie, Lupus nephritis und Fokal segmentaler Glomerulosklerose (Varghese et al. 2007). Apolipoprotein A-I ist speziell gefunden worden bei Patienten, die nierentransplantiert sind und einen Rückfall einer Fokal segmentalen Glomerulosklerose haben (Lopez-Hellin et al. 2013). Eine (Mikro-) Hämaturie kann sehr viele Ursachen haben. Von einfachen Harnwegsinfektionen über Nierensteine bis hin zu Tumoren der Nieren und ableitenden Harnwege. Ig gamma-1 chain C region und Ig alpha-1 chain C region können beim Vorliegen eines Multiplen Myelom freigesetzt und über die Nieren ausgeschieden werden. Auf diese Weise können sie schließlich im Urin detektiert werden (Palumbo et al. 2011).

Zusammenfassend finden sich 15 Proteine, die entweder in allen 5 Urinproben oder in 4 von 5 nachzuweisen waren. Proteine, die sich nur in 3 oder weniger nachweisen ließen wurden nicht weiterverfolgt, da der Biomarker möglichst repräsentativ sein soll und eine möglichst große Anzahl Erkrankter erfasst. Nach Recherche in der Literatur können 10 der 15 Proteine auch bei anderen Erkrankungen auftreten und eignen sich nicht als spezifischer Marker für das Alport-Syndrom

3.3 Ergebnisse der ELISA

In einem abschließenden Schritt sollten diese fünf Proteine mit Hilfe des ELISA Verfahren bestätigt und validiert werden. Hierfür wurde jedes Protein einzeln mit einem separaten Test untersucht. Hierbei war größte Sorgfalt angesagt, da die ELISA sehr anfällig für Verunreinigungen und andere Störfaktoren waren. Zuerst wurde, durch eine mitgelieferte Probe, eine Standardkurve erstellt, mit deren Hilfe man die jeweilige Konzentration der Proteine in den Urinproben bestimmen konnte. In Abbildung 20 kann man exemplarisch eine solche Kurve sehen.

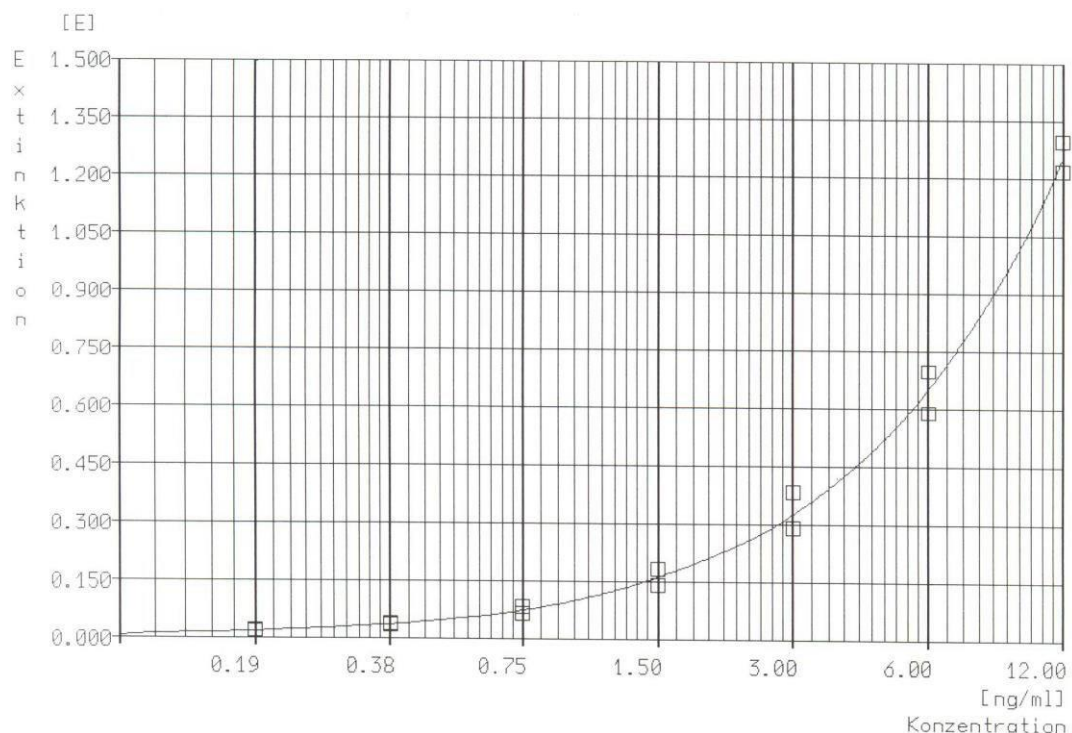


Abbildung 19: Standardkurve eines ELISA

In Abbildung 21 sieht man eine ELISA-Platte kurz vor der Messung. Die ersten beiden Spalten stellen die Standardproben für die oben gezeigte Kurve dar. In den beiden anderen Spalten sieht man die Studienproben (gelb gefärbt, was das zu identifizierende Protein darstellt) und als Kontrolle einige Negativproben (klar

gefärbt), in denen dieses Protein nicht zu bestimmen war. Die unterschiedlichen Gelbfärbungen erklären sich durch die verschiedenen Konzentrationen und die jeweiligen Verdünnungsansätze.

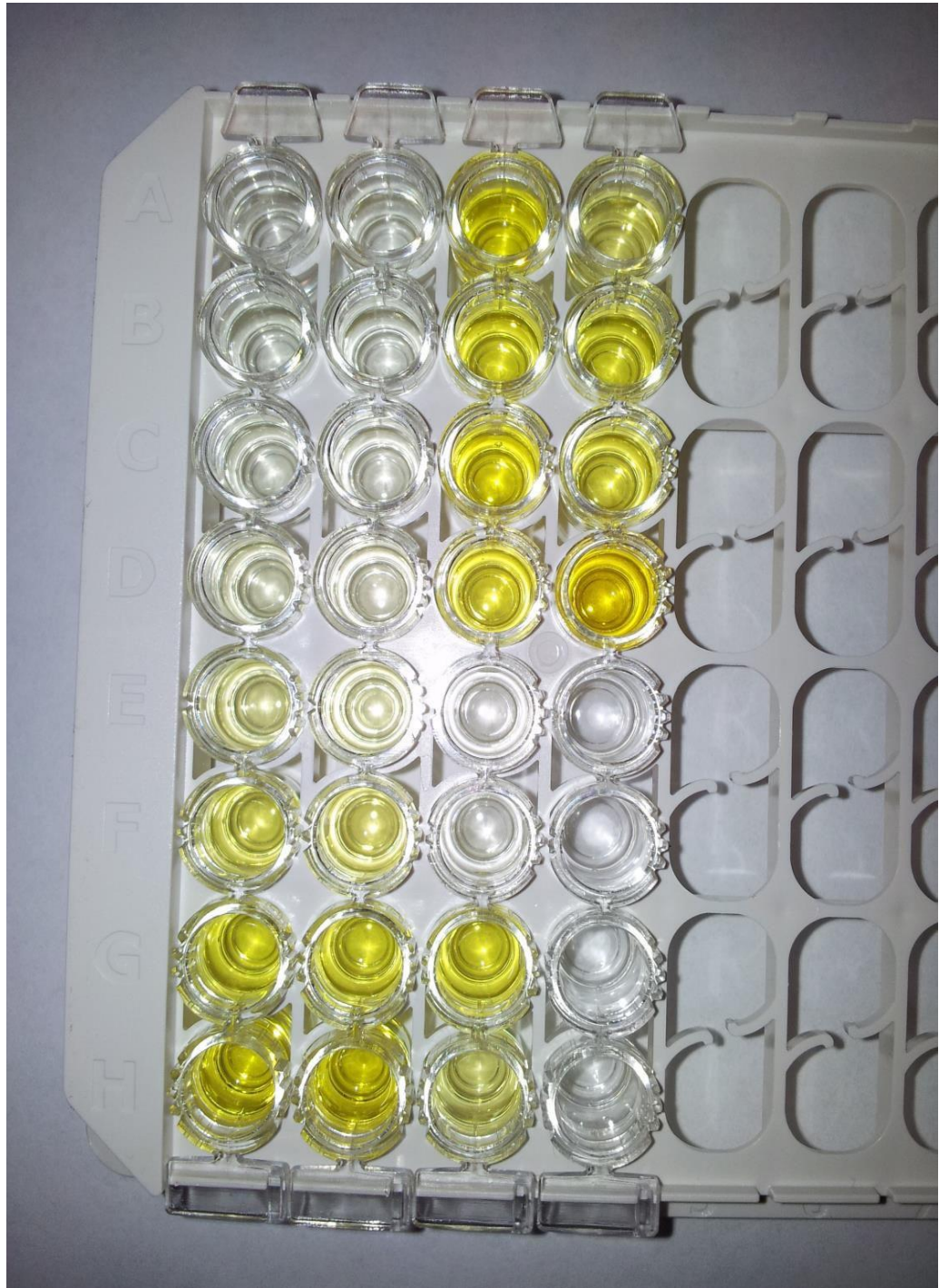


Abbildung 20: ELISA Kit kurz vor der Auswertung durch den Computer. In den ersten beiden Spalten von links sieht man den Ansatz für die Standardkurve mit der Konzentration nach unten hin zunehmend. In den anderen beiden Spalten sieht man die untersuchten Urinproben

Es ließen sich letztendlich nur zwei Proteine durch dieses Verfahren nachweisen, Mannan-binding lectin serine protease 2 und Tetranectin. Bei den anderen drei Proteinen war der ELISA jeweils negativ, das heißt, das Protein könnte nicht

nachgewiesen werden. Da diese jedoch durch massenspektrometrische Verfahren nachgewiesen wurden, kann dies nun mehrere Ursachen haben. Zum einen kann der gelieferte ELISA trotz Garantie des Herstellers generell nicht funktionieren. Zum anderen kann das Protein derart verändert sein, dass der Antikörper des ELISA's nicht an das spezifische Epitop binden kann.

In Tabelle 10 und 11 sieht man die Ergebnisse aufgelistet. Die gemessenen Konzentrationen wurden auf die jeweilige bekannte Proteinurie der einzelnen Proben berechnet, sodass man die Konzentrationen besser vergleichen kann.

Tabelle 10 Ergebnisse der ELISA für Mannan-binding lectin serine protease 2

MASP2

Patient	Proteinurie [mg/l]	Konzentration [pg/ml]	Proteinkonzentration im Urin [ng/g Proteinurie]
05_02	50	52,84	1056,8
11_02	85	72,22	849,65
05_03	120	59,74	497,83
13_02	162	41,38	255,43
05_01	240	58,5	243,75

Tabelle 11 Ergebnisse der ELISA für Tetranectin

CLEC3B

Patient	Proteinurie [mg/l]	Konzentration [ng/ml]	Proteinkonzentration im Urin [ng/g Proteinurie]
05_02	50	13,64	272800
11_02	85	10,54	124000
05_03	120	7,83	65210
13_02	162	45,73	282280
05_01	240	37,94	158080

Es ist interessant zu beobachten, dass bei dem Mannan-binding serine lectin protease 2 die gemessenen Konzentrationen vergleichbar ähnlich sind. Im Bezug auf die jeweilige Proteinurie fällt jedoch auf, dass die Konzentration mit zunehmender Proteinurie abfällt. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass dieses Protein vor allem in den frühen Phasen der Erkrankung bei noch nicht

fortgeschrittener Proteinurie vermehrt ausgeschieden wird und somit in der Früherkennung einen Vorteil und Nutzen haben könnte.

Bei Tetranectin hält sich die gemessene Konzentration erst stabil und nimmt dann bei höherer Konzentration zu, was zu sehr variablen Ergebnissen führt, wenn diese auf die Proteinurie berechnet werden.

Hier sind zukünftig weitere Tests an einer größeren Anzahl von Proben von Nöten, um genaue Aussagen zu etwaigen Zusammenhängen zwischen der Konzentration und der Proteinurie zu stellen. Es wird hier nur ein erster Hinweis gegeben, welche Proteine von Interesse sein könnten, als mögliche Proteinmarker zu dienen.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass sich mittels ELISA nur 2 der 5 Proteine bestätigen lassen, Mannan-binding lectin serine protease 2 und Tetranectin. Insbesondere Mannan-binding lectin serine protease 2 zeigt hohe Konzentration bei geringer Proteinurie, was einem frühen Erkrankungsstadium entspricht und somit als Frühmarker in Frage kommt.

3.4 Auswertungen der gefärbten Nierenschnitten von Mäusen

Zum Vergleich mit der voran gegangenen Mäuse-Studie wurden Nierenpräparate von Wildtypmäusen und von Col4A3-Knockout-Mäusen mit den jeweiligen Antikörpern gegen die einzelnen Proteine versetzt, mit Fluoreszenz angefärbt und anschließend verglichen.

Es wurden jeweils Mäuse im Alter von 4½ Wochen ausgewählt, was einem Frühstadium der Erkrankung entspricht, und Mäuse im Alter von 6 Wochen, was einem fortgeschrittenen Stadium entspricht. Zudem wurde für jeden Schnitt eine Negativkontrolle erstellt um die Aussagekraft zu erhöhen und die Fehlerbelastung zu minimieren.

Bei den Schnitten der gesunden Mäuse zeigte sich in beiden Stadien kein Nachweis der untersuchten Proteine Chondroitin sulfate proteoglycan 4, Mannan-binding lectin serine protease 2, Multimerin-2, Peroxiredoxin-2 und Tetranectin. Nachfolgend werden einige der Bilder gezeigt.

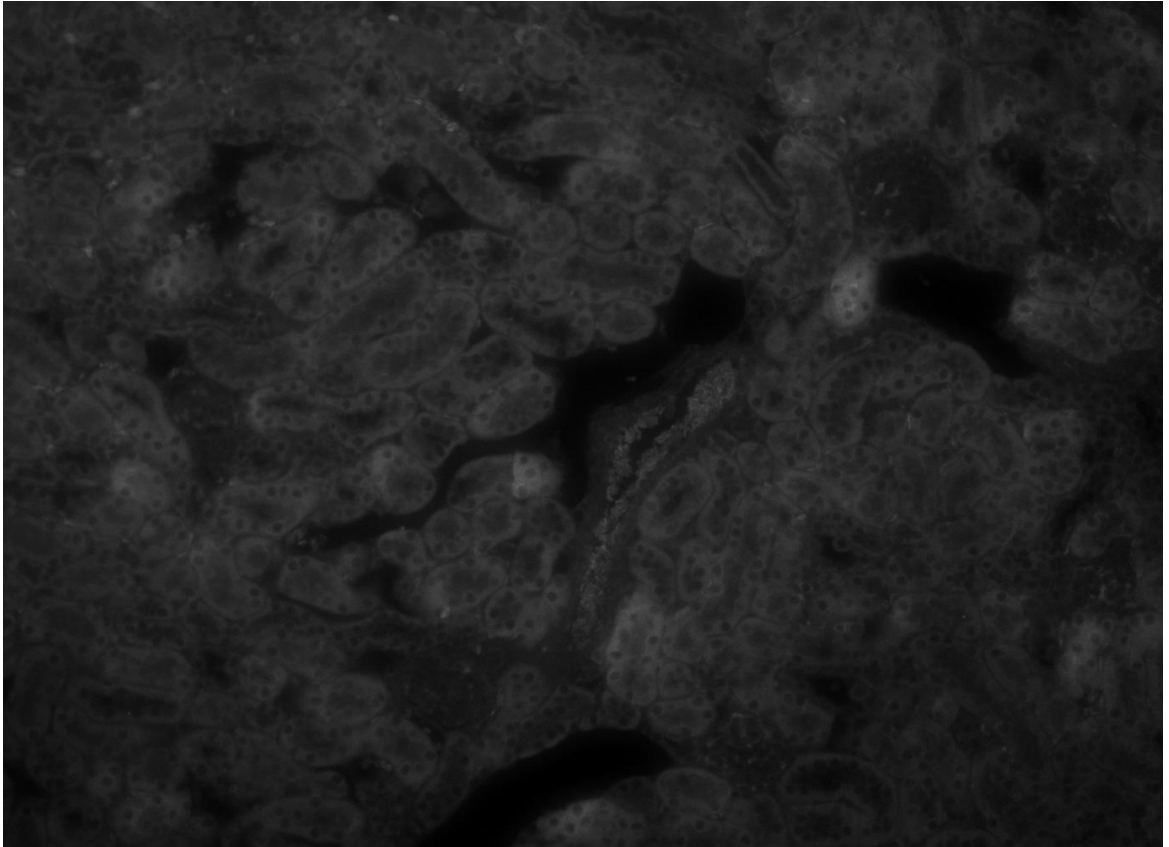


Abbildung 21: Nierenschnitt Maus, Wildtyp, 4½ Wochen alt, versetzt mit Antikörper gegen CSPG4, 100x vergrößert

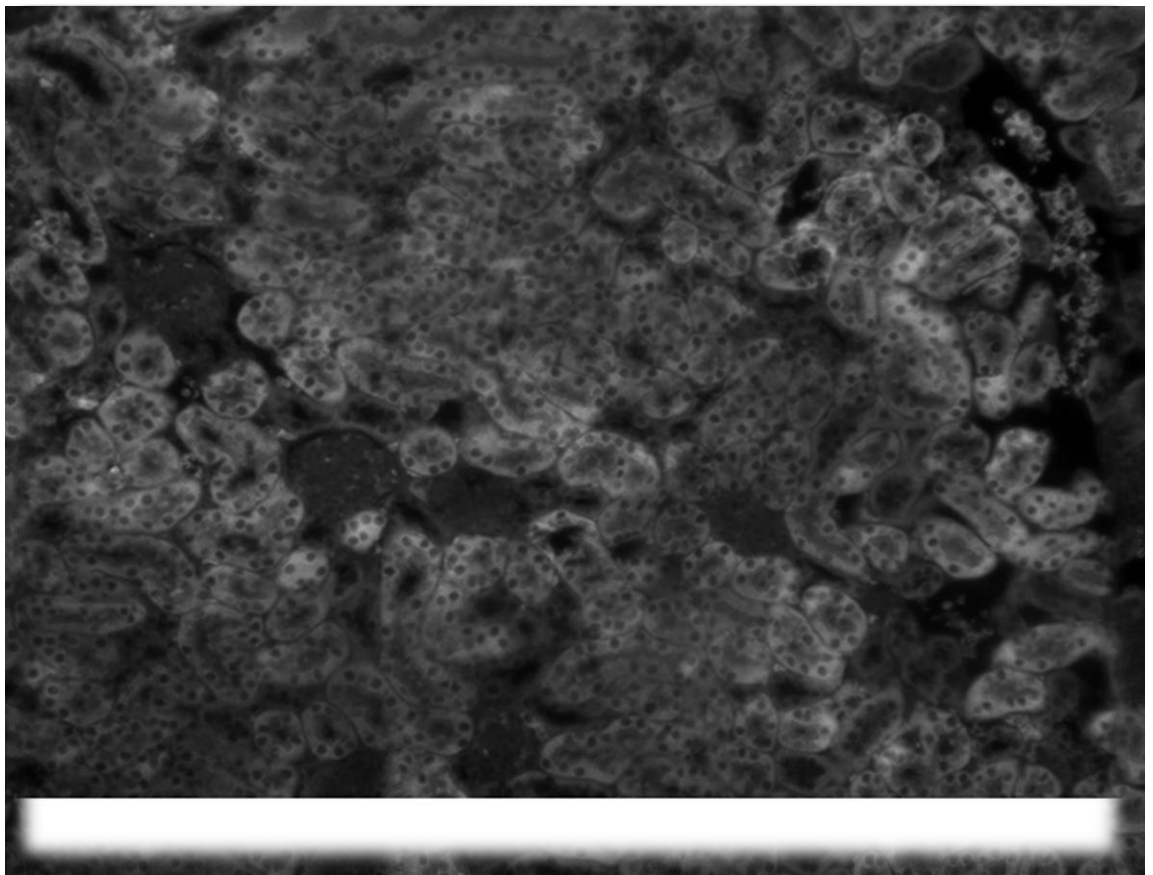


Abbildung 22: Nierenschnitt Maus, Wildtyp, 6 Wochen alt, versetzt mit Antikörper gegen MASP2, 100x vergrößert

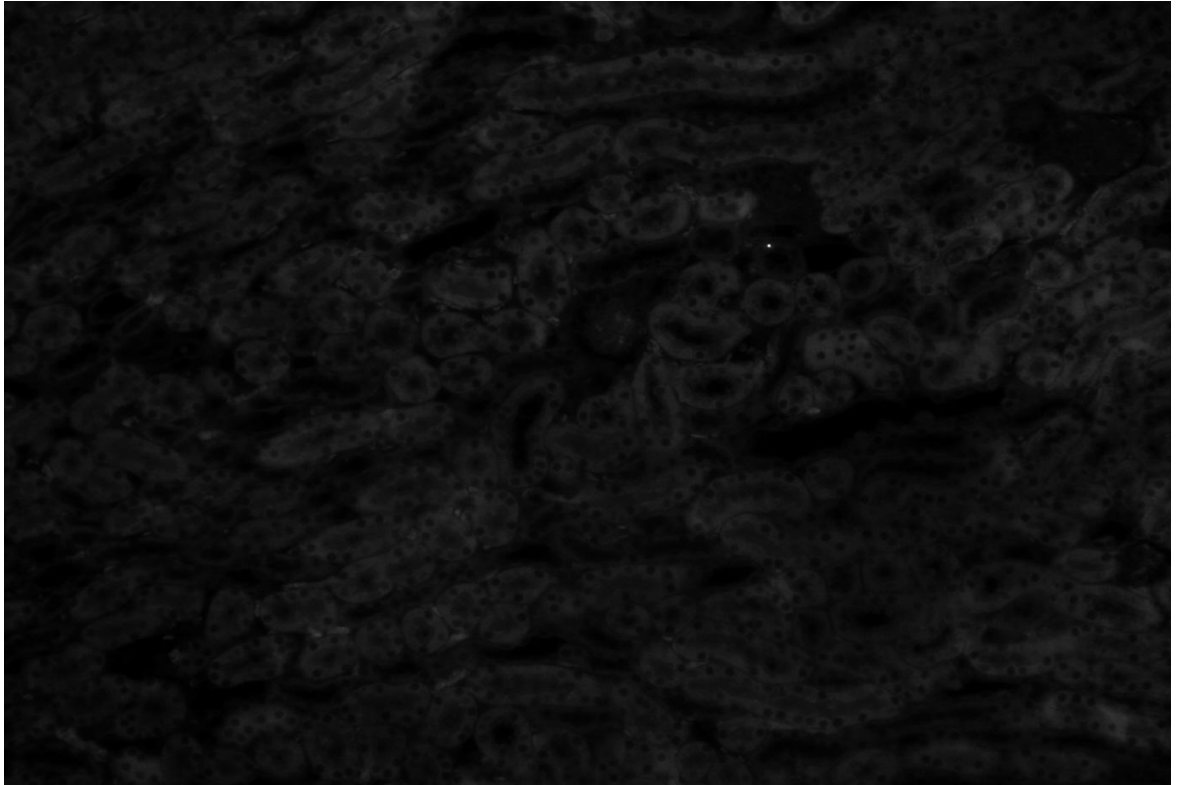


Abbildung 23: Nierenschnitt Maus, Wildtyp, 4½ Wochen alt, versetzt mit Antikörper gegen MMRN2, 100x vergrößert

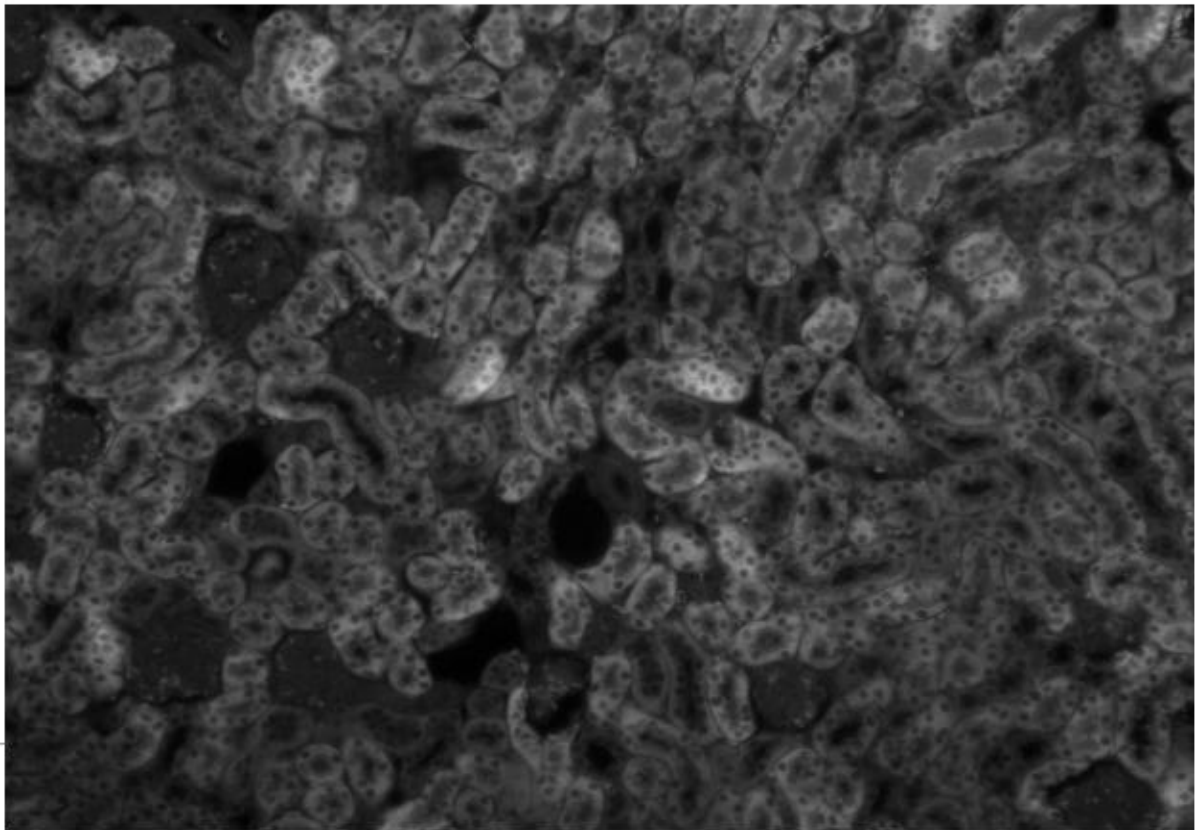


Abbildung 24: Nierenschnitt Maus, Wildtyp, 6 Wochen alt, versetzt mit Antikörper gegen PRDX2, 100x vergrößert

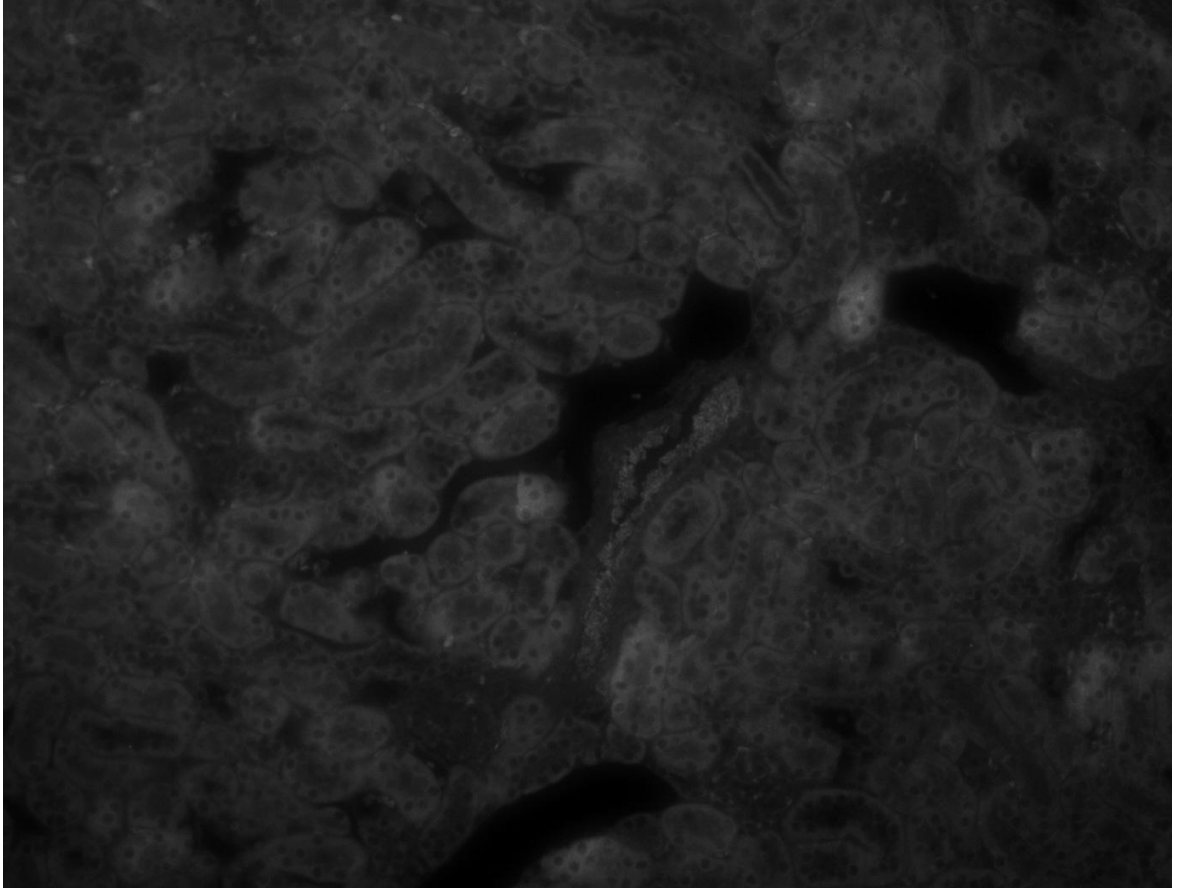


Abbildung 25: Nierenschnitt Maus, Wildtyp 4½ Wochen alt, versetzt mit Antikörper gegen CLEC3B, 100x vergrößert

Bei der Untersuchung der Präparate aus Col4A3-Knockout-Mäuse im Alter von 4 ½ Wochen ließ sich nur das Chondroitin sulfat proteoglycan 4 nachweisen und dies auch nicht in allen Abschnitten der Niere, sondern nur in einzelnen Glomeruli. Die anderen vier Proteine waren nicht zu detektieren. Nachfolgend exemplarisch eine Abbildung mit dem glomerulären Nachweis des nachgewiesenen Proteins.

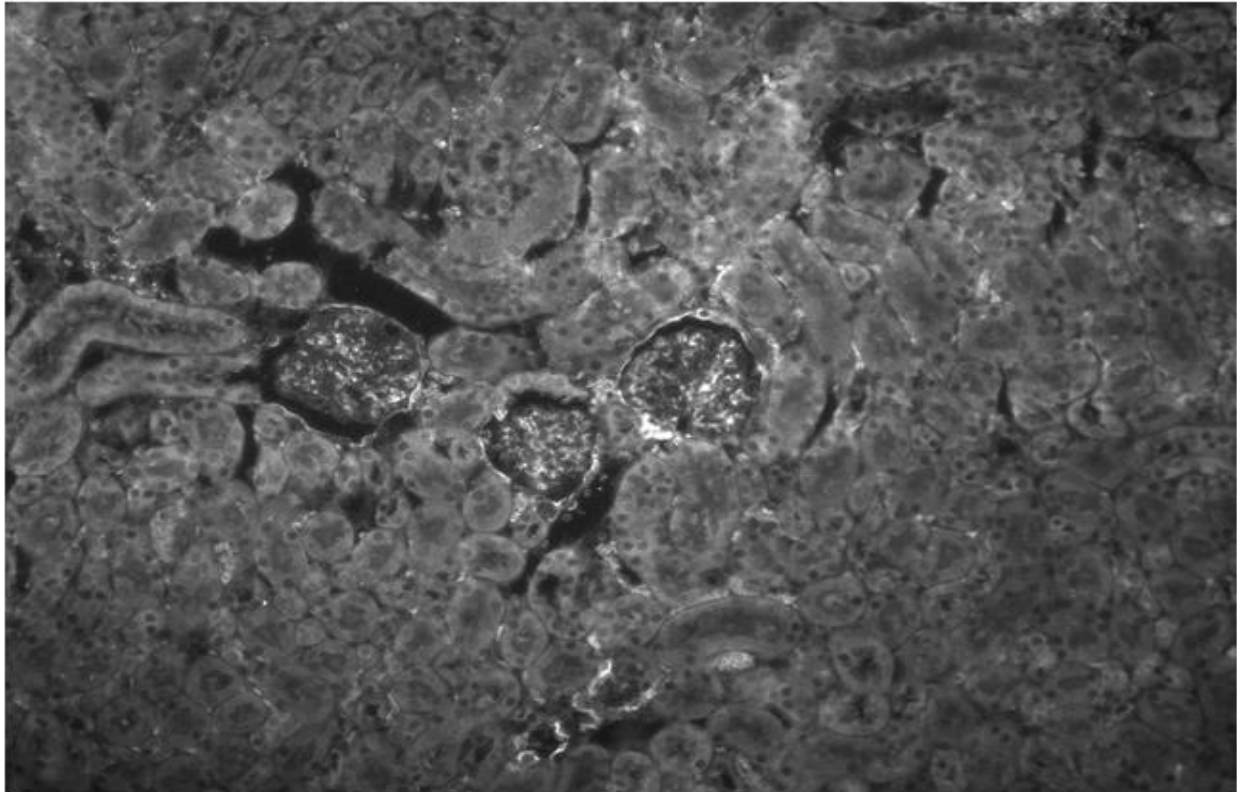


Abbildung 26: Nierenschnitt Col4A3-Knockout-Maus, 4½ Wochen, zentrale periglomeruläre Aufhellung nach Zugabe des Antikörpers gegen Chondroitin sulfat proteoglycan 4, 100x vergrößert

Im Vergleich zu den 4½ Wochen alten Mäusen zeigt sich bei den 6 Wochen alten Col4A3-Knockout-Mäusen kein großer Unterschied, es ist weiterhin nur das Chondroitin sulfat proteoglycan 4 nachweisbar. Dies weiterhin in und um das Glomerulum, aber nun sind deutlich mehr davon betroffen als noch im jüngeren Alter, was für den Progress der Erkrankung und dadurch die vermehrte Konzentration des Proteins spricht. Die anderen vier Proteine sind weiterhin nicht nachweisbar, sodass hier davon ausgegangen werden kann, dass diese bei der Erkrankung von Mäusen, anders als bei den Menschen, keine Rolle spielen, sondern andere Proteine im Vordergrund stehen.

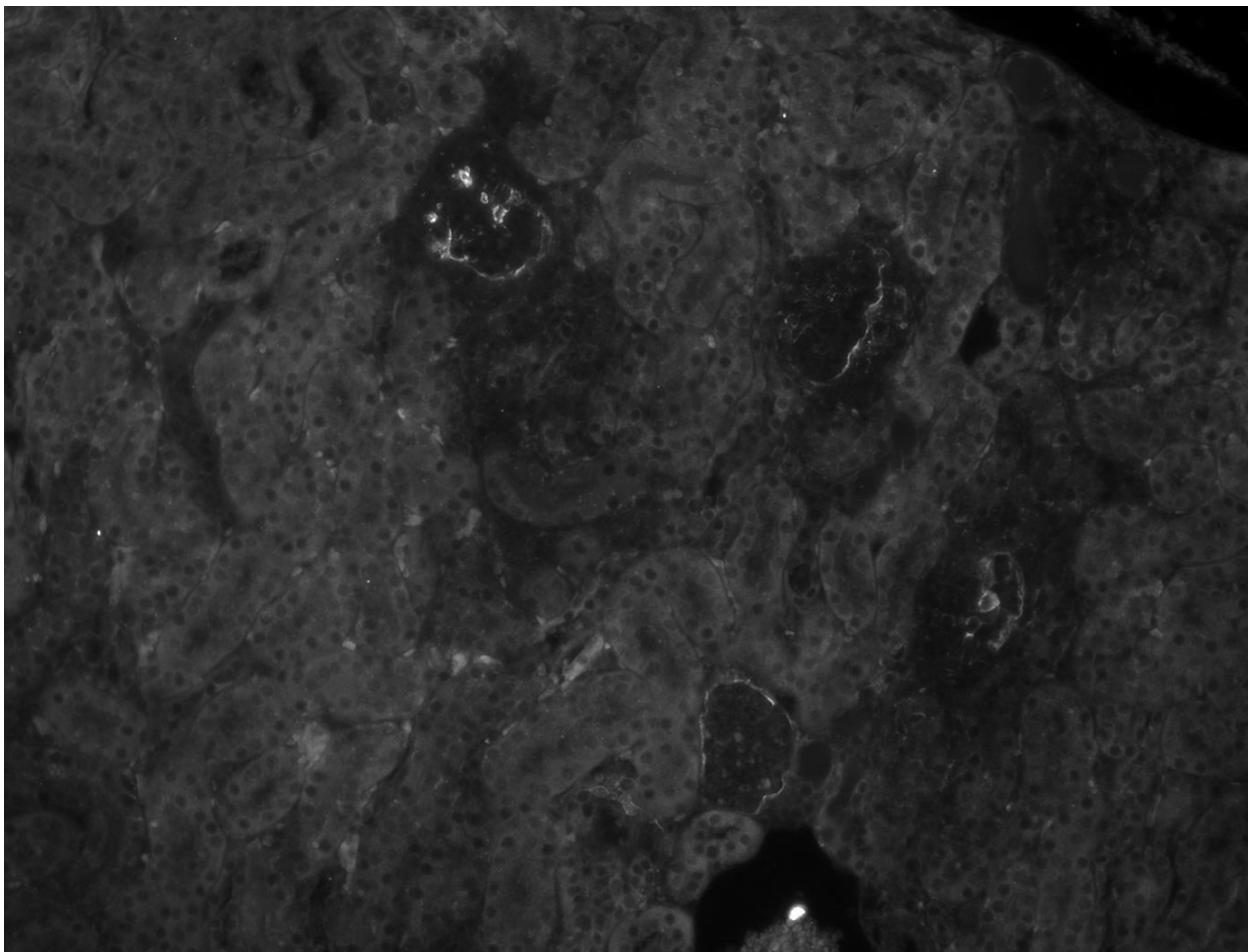


Abbildung 27: Nierenschnitt Col4A3-Knockout-Maus, 6 Wochen, Aufhellungen an vier Glomeruli nach Zugabe des Antikörpers gegen Chondroitin sulfat proteoglycan 4, 100x vergrößert.

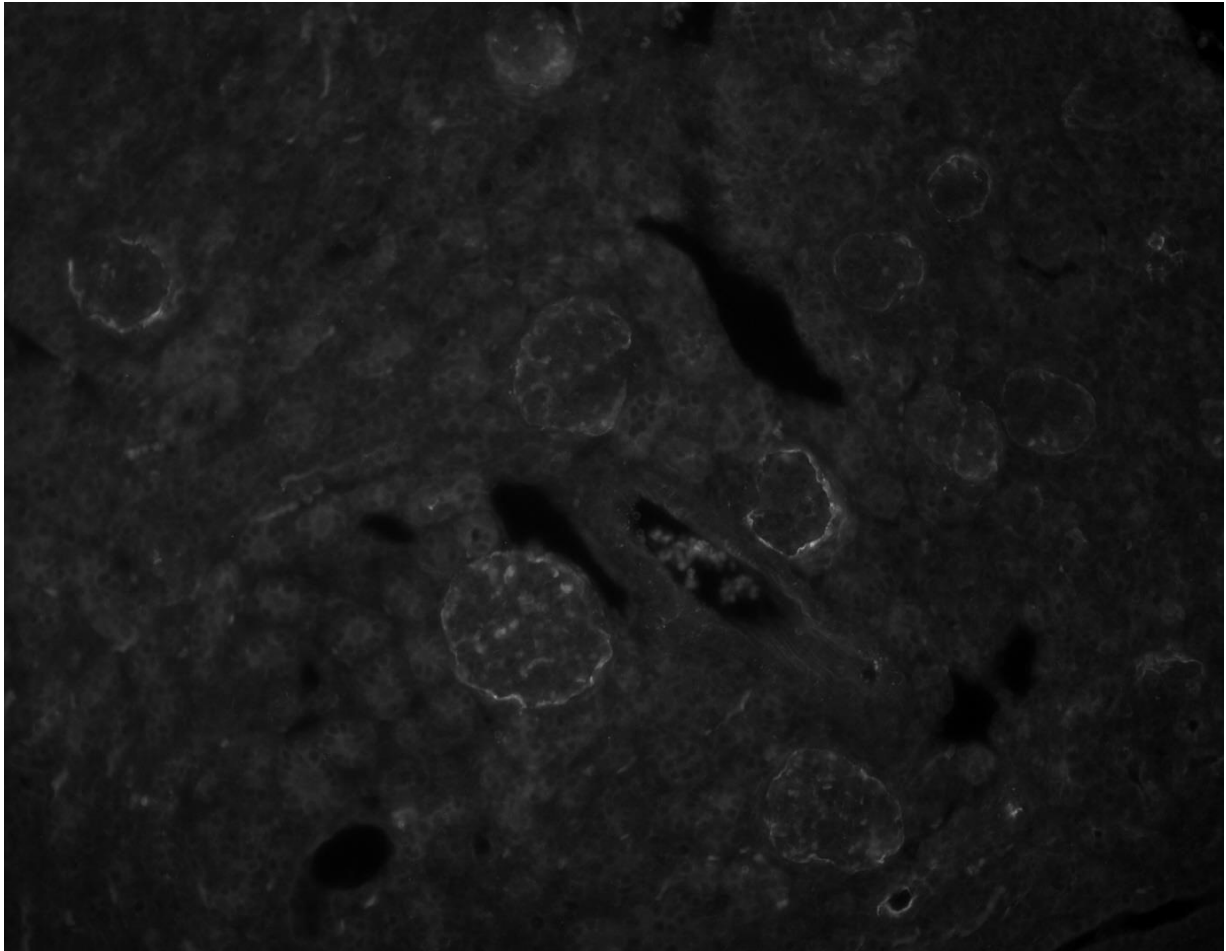


Abbildung 28: Nierenschnitt Col4A3-Knockout-Maus, 6 Wochen, Aufhellungen an allen sichtbaren Glomeruli nach Zugabe des Antikörpers gegen Chondroitin sulfat proteoglycan 4, 100x vergrößert.

Zusammenfassend lässt sich hier zeigen, dass es doch größere Unterschiede zwischen Menschen und Mäusen gibt bezüglich der ausgeschiedenen Proteine im Alport-Syndrom. Einzig das Chondroitin sulfat proteoglycan 4 ließ sich ebenfalls im Mausmodell mittels Antikörper nachweisen, die anderen 4 Proteine waren dagegen nicht nachweisbar.

4 Diskussion

Durch die gemeinsame Verwendung von Proteomics und der Massenspektrometrie konnten fünf verschiedene Proteine identifiziert werden, die als potentielle Biomarker zur Früherkennung und -diagnostik des Alport-Syndrom verwendet werden können. Chondroitin sulfate proteoglycan 4, Mannan-binding lectin serine protease 2, Multimerin-2, Peroxiredoxin-2 und Tetranectin wurden nur im Urin von erkrankten Kindern gefunden, jedoch nicht in dem gesunder. Auch wenn nur zwei dieser Proteine mittels ELISA bestätigt werden konnten, sollten dennoch alle fünf Proteine berücksichtigt werden. Diese werden nun im Anschluss in ihrem Zusammenhang mit dem Alport-Syndrom diskutiert.

4.1 Die potentiellen Biomarker

4.1.1 Chondroitin sulfate proteoglycan 4

Chondroitin sulfate proteoglycan 4 ist ein relativ großes Protein mit einer Masse von ungefähr 250 kDa und es besteht aus 2322 Aminosäuren. Es ist auf dem Chromosom 15q24.2 lokalisiert und umfasst 38,5 Kilobasen.

Dieses Protein wurde vor ca. 30 Jahren entdeckt und bisher nur im Zusammenhang mit dem malignen Malignom beschrieben, da es bei dieser Erkrankung gehäuft auftritt (Wilson et al. 1981). Im Folgenden wird nun versucht, seine Eigenschaften mit dem Alport-Syndrom zu verknüpfen. Viele dieser Fertigkeiten sind noch nicht vollständig erforscht, so dass es teilweise nur Hinweise und Spekulationen darüber gibt.

Chondroitin sulfate proteoglycan 4 ist involviert in einer Vielzahl von Zellregulationsprozessen, die hauptsächlich zu einer Aktivierung und Stimulation der Zellproliferation führen. Hier sind unter anderem zu nennen die Aktivierung des Integrin gesteuerten *FAK-pathways (focal adhesion kinase)*, des ERK 1 und 2 Pathways (*extracellular-signal regulated kinase*) und des PI3K/AKT/mTOR Pathways (*phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin*). Diese drei Wege stehen im Zusammenhang mit diesem Protein im Vordergrund und beschreiben das Wachstum und den Erhalt von Malignomen

(Yang et al. 2004; Chekenya et al. 2008).

Der FAK-*pathway* spielt eine Rolle in der Interaktion zwischen einzelnen Zellen und der extrazellulären Matrix. Zudem unterstützt es noch die Apoptose durch die Übermittlung eines Signals an die Zelle zum Untergang. Bei einer Überexpression dieses Weges wird jedoch dieses Signal gehemmt, sodass das Wachstum wieder im Vordergrund steht (Mehlen et al. 2006; Ndozangue-Touriguine et al. 2008). FAK wird von den meisten Zellen produziert, so dass es ubiquitär vorkommt. FAK interagiert mit Integrin alpha-1, alpha-3 und alpha-5 (Parsons et al. 1997; Eliceiri et al. 2002). ERK 1 und 2 sind zwei Enzyme, die an einer Vielzahl an zellulären Prozessen beteiligt sind wie zum Beispiel Proliferation und Differenzierung. Die beiden Enzyme müssen, um diese Aufgaben zu erfüllen, durch Phosphorylierungen aktiviert werden, wandern anschließend in den Zellkern und phosphorylieren dort dann selbst verschiedene Zellregulationsgene (Owaki et al. 1992; Garcia et al. 1999). Abschließend der PI3K/AKT/mTOR-Pathway ist ein wichtiger und sehr komplexer Weg für die Apoptose von Zellen. Vereinfacht gesagt aktiviert das Enzym PI3K die Proteinkinase B (AKT), die wiederum das Protein mTOR aktiviert, welches letztendlich in der Apoptose von Zellen beteiligt ist. Auch dieser Weg hemmt den Zelluntergang bei erhöhter Stimulation wie schon der FAK-Pathway (Andjelkovic et al. 1997; Walker et al. 1998).

Chondroitin sulfate proteoglycan 4 selbst bindet mit einer Vielzahl an Elementen der extrazellulären Matrix, wie etwa Kollagen Typ II, V und VI, Laminin, Tenascin und Fibronectin (Stallcup 2002; Campoli et al. 2010; Wang et al. 2010). Die Kollagene sind Bestandteil des Bindegewebes, das Laminin ein Teil der Basalmembran und Tenascin und Fibronectin sind beide an Reparatur- und Umbauprozessen beteiligt.

Darüber hinaus ist Chondroitin sulfate proteoglycan 4 auch an der Aktivierung von Matrix-Metalloproteasen beteiligt. Sie aktiviert nämlich die Membrane Typ 3 matrix metalloproteinase, die anschließend selbst die Matrix-Metalloprotease 2 (MMP 2) aktiviert (Shimada et al. 1999). Wie bereits berichtet ist MMP 2 direkt am Umbau von Kollagen IV beteiligt (Baricos et al. 1999). Die primäre Aufgabe von MMP's ist der kontrollierte Abbau von Matrix- und Nicht-Matrixmolekülen im Rahmen der Gewebereparatur und des Umbauprozesses (Nagase et al. 2006). Für die Aktivierung der MMP's und auch für die oben beschriebenen Interaktionen mit den einzelnen Integrinen ist das Chondroitin sulfate dieses Proteins essentiell, da es

hierüber seine Funktionen ausübt (Iida et al. 2007).

Somit kann man sagen, dass Chondroitin sulfate proteoglycan 4 an vielen Zellumsatz- und Reparaturprozessen sowie am Zelluntergang beteiligt ist, wie diese auch beim Alport-Syndrom stattfinden. Es lässt sich aktuell nicht erschließen, ob einer der genannten Eigenschaften dieses im Urin gefundenen Proteins führend ist im Zusammenhang mit der Erkrankung oder ob die Gesamtheit aller einen Einfluss hat. Bisher wurde es nur im Zusammenhang mit Malignomen, und hier besonders dem malignen Malignom beschrieben. Eine Beziehung zu anderen Krankheiten wird Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

4.1.2 Multimerin-2

Das auf Chromosom 10 q23.31 gelegene Multimerin-2 ist im Vergleich deutlich kleiner bei einer molekularen Masse von 104 kDa und eine Länge von 949 Aminosäuren.

Multimerin-2 ist vor allem in Gefäßen lokalisiert und dort sowohl auf der dem Lumen zugewandten Innenseiten, als auch auf der Außenseite und dort in enger Verknüpfung mit den Endothelzellen (Christian et al. 2001). Die Position dieses Proteins erklärt sich auch durch seine primäre Aufgabe. Es verlangsamt nämlich zum einen die Beweglichkeit von Endothelzellen und wirkt zum anderen als ein Inhibitor des Gefäßwachstums. Dies wird bewirkt durch die Bindung des *vascular endothelial growth factor A* (VEGFA). Dieser bindet normalerweise an den auf den Endothelzellen lokalisierten *vascular endothelial growth factor receptor 1* und *2* (VEGFR1/VEGFR2) (Mustonen and Alitalo 1995; Olsson et al. 2006) und stimuliert auf diese Weise die Neubildung und das Wachstum von Blutgefäßen. Durch das Wegfallen des Stimulationssignals wird die Aktivität des Rezeptors nach unten reguliert (Ferrara 2002). Zu den weiteren Aufgaben des VEGFA zählen die Erhöhung der Aktivität der Matrix-Metalloproteasen, der $\alpha V\beta 3$ -Integrine und die erhöhte Anlockung von Makrophagen und Granulozyten (Olsson et al. 2006). Wie bereits mehrfach erwähnt sind die Matrix-Metalloproteasen am Gewebeumbau und an der Reparatur beteiligt. Diese Prozesse betreffen insbesondere die Extrazelluläre Matrix. Durch die Hemmung dieser Proteasen werden somit auch die Umbauprozesse in der Niere unterdrückt und somit versucht, die zunehmende Sklerosierung zu verhindern.

Die $\alpha V\beta 3$ -Integrine dienen als Rezeptoren für Vitronectin (Hermann et al. 1999). Vitronectin ist ein Glycoprotein der Extrazellulären Matrix, das an den Plasminogen-Aktivator Inhibitor-1 (PAI-1) bindet und diesen stabilisiert (Zhou et al., 2003). Durch diese Bindung wird die Aktivität des Plasminogen-Aktivator gehemmt und somit weniger Plasminogen in das aktive Plasmin umgewandelt. Plasminogen wird eine protektive Funktion zugeschrieben, da es eine akute inflammatorische Verletzungsreaktion des Glomerulum zu unterdrücken versucht (Castellino et al. 2005). Somit führt letztendlich die Hemmung des VEGFA zu einer verringerten Aktivität des $\alpha V\beta 3$ -Integrin und somit zu einer kleiner werdenden Bindung mit Vitronectin. Die erniedrigte Bindung vermindert die Hemmung des Plasminogen-Aktivator durch den Plasminogen-Aktivator Inhibitor-1, sodass Plasminogen seine schützende Funktion erfüllen kann.

Wie oben erwähnt lockt VEGFA auch Makrophagen an. Neben deren Hauptaufgabe in der Immunabwehr mittels Phagozytose und Zytokinausschüttung, spielen sie auch eine Rolle in der Gewebereparatur (de la Torre et al. 2008). Sie schütten unter anderem verschiedene Proteasen, Zytokine und Wachstumsfaktoren aus, die insbesondere auf die Endothelzellen und Fibroblasten wirken (Deodhar et al. 1997). Somit wird durch den Umbau der extrazellulären Matrix der Aufbau von Narbengewebe gefördert. Die Blockierung dieser Prozesse ist ein weiterer möglicher Ansatz des Körpers, der überschießenden Sklerosierung der Niere beim Alport-Syndrom entgegenzuwirken, da VEGFA auf mehreren Wegen diese vorantreiben kann. Somit ist eine Hemmung dieses Signalproteins durch Multimerin-2 ein sinnvoller Ansatz.

4.1.3 Peroxiredoxin-2

Peroxiredoxin-2 ist ein relativ kleines Protein mit einer Länge von 198 Aminosäuren und einer Masse von etwas 21 kDa. Es ist auf dem Chromosom 19 p13.2 lokalisiert.

Dieses ubiquitär im Zytoplasma vorkommende Enzym ist, wie aus dem Namen auch schon abzuleiten ist, für sogenannte Redox-Reaktion verantwortlich. Insbesondere ist es involviert in der Entgiftung von reaktiven Sauerstoffverbindungen in der Zelle, vor allem von Wasserstoffperoxid (Seaver et

al. 2001). Nachfolgende Formel zeigt beispielhaft eine solche Redox-Reaktion: $2 R'-SH + ROOH = R'-S-S-R' + H_2O + ROH$ (Cha et al. 1995). Es wurde beobachtet, dass eine verminderte Konzentration von Peroxiredoxin-2 zu einer zunehmenden Anzahl an reaktiven Sauerstoffverbindungen führt, welche wiederum in einer vermehrten Proteinoxidation resultieren. Darüber hinaus wird durch die verringerte Menge des Enzyms der AKT-Pathway, der bereits bei der Diskussion des Proteins Chondroitin sulfate proteoglycan 4 besprochen wurde, gehemmt. All diese Mechanismen würden zu einer verstärkten Apoptose der Podozyten führen. Dem wird durch einen Anstieg der Konzentration von Peroxiredoxin-2 versucht entgegen zu wirken (Hsiang-Hao et al. 2011). Reaktive Sauerstoffverbindungen sind eine Gruppe von Molekülen, die bei oxidativem Stress entstehen. Durch diese Verbindungen folgen eine zunehmende Proteinoxidation und eine Lipidperoxidation. Proteinoxidation kann zu einer Konformationänderung führen und somit das Protein unbrauchbar machen und sich ablagern. Diese Vorgänge wurden bereits mit mehreren anderen Erkrankungen in Verbindung gebracht, so zum Beispiel neurodegenerative Erkrankungen oder Arteriosklerose (Dean et al. 1997). Bei der Lipidperoxidation, die meist ungesättigte Fette betrifft, da diese durch ihre Doppelbindungen anfälliger sind gegenüber den Radikalen, führt es allgemein zu Zellschädigung, da die Zellmembranen zum großen Teil aus Lipiden bestehen. Dies kann je nach Ort der Zellschädigung zu verschiedenen Manifestationen führen wie zum Beispiel Arteriosklerose oder Hämolyse (Ostrea et al. 1985; Aviram et al. 1986). Es wurde beobachtet, dass ein Überangebot von Angiotensin II ebenfalls zu einem erhöhten Untergang der Podozyten führt. Innerhalb des Glomerulum führt Angiotensin II zu einer Abnahme der Filtration und es beeinflusst die Semipermeabilität der Glomerulären Basalmembran, was letztendlich zu einer Zunahme der Proteinurie führt (Hsiang-Hao et al. 2011). Die Tatsache, dass zur Therapie der Alport-Syndrom bisher ACE-Hemmer eingesetzt wurde, die die Umwandlung von Angiotensin I in Angiotensin II hemmt und somit eine geringere Konzentration von Angiotensin II vorliegt, unterstützt diese These. Auch in anderen chronischen Nierenerkrankung konnte gezeigt werden, dass die Hemmung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) einen positiven und protektiven Einfluss auf den Verlauf der jeweiligen Erkrankung hat (Ruster et al. 2006; Remuzzi et al. 2006). Es wird in der Literatur vermutet, dass Peroxiredoxin-2 ebenfalls einen modulierenden Einfluss auf das RAAS hat und

den durch Angiotensin II verursachten Schaden an den Podozyten verringert (Hsiang-Hao et al. 2011).

4.1.4 Mannan-binding lectin serine protease 2

Mannan-binding lectin serine protease 2 ist ein Plasmaprotein mit einer Masse von etwa 75 kDa und eine Länge von 686 Aminosäuren. Es ist lokalisiert auf Chromosom 1 p36.3 – p36.2.

Diese Serumprotease aktiviert das Komplementsystem über den Lektin-Weg, der unabhängig von Antikörpern funktioniert (Kawasaki et al. 1978; Ikeda et al. 1987). Im Folgenden wird kurz auf das Komplementsystem eingegangen und die verschiedenen Möglichkeiten, es in Gang zu setzen. Das Komplementsystem ist ein Teil des unspezifischen Immunsystems (Janeway et al. 2001). Sein Name kommt daher, dass man initial dachte, dass es die spezifische Immunantwort komplementiere. Seine Hauptaufgaben sind die Opsonierung von Bakterien und Fremdkörpern, die Zellyse durch die Bildung des Membranangriffskomplex (Papadimitriou et al. 1991), die Anlockung von Makrophagen und anderer Immunzellen mittels Chemotaxis und zusammen mit den Antikörpern die Agglutination von Bakterien und Fremdkörpern, so dass diese von Fresszellen vernichtet werden können. Die Komplementfaktoren C1-C9 werden zum größten Teil in der Leber in einer inaktiven Vorstufe produziert. Es gibt drei verschiedene Wege deren Aktivierung zu beginnen, den klassischen Weg, den alternativen Weg und den Lektin-Weg.

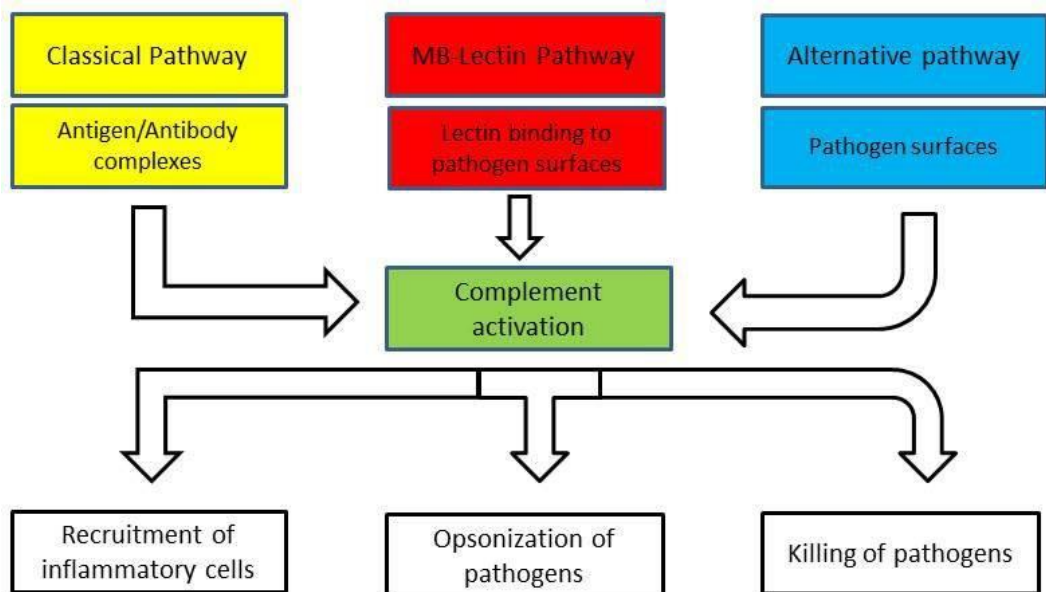


Abbildung 29: Schematischer Überblick über die Komplementaktivierung. Es werden die drei verschiedenen Möglichkeiten gezeigt, der klassische, der alternative und der Lektin- Weg. Zudem werden die Folgen aus der Komplementaktivierung gezeigt, die Opsonierung, die Zellyse und die Anlockung anderer Immunzellen (modifiziert nach Janeway et al. 2001)

Der klassische Weg führt über die Aktivierung Faktors C1 durch den Antigen-Antikörper-Komplex. Der C1-Komplex besteht aus drei Subtypen C1q, C1r und C1s, die miteinander zusammen die Faktoren C2 und C4 aktivieren. Diese beiden schließen sich anschließend zusammen und bilden die C3-Konvertase (C4b,2b), die, wie aus dem Namen zu erschließen ist, den Faktor C3 in seine aktive Form überführt. Der Faktor C3 wird in C3a und C3b gespalten, C3a ist ein Mediator für den lokalen Entzündungsprozess, während C3b auf der Antigenoberfläche bindet und für die Opsonierung verantwortlich ist. Darüber hinaus bindet C3b an die ursprüngliche C3-Konvertase C4b,2b und bildet dadurch die C5-Konvertase (C4b,2b,3b), die den Faktor C5 in seine aktiven Spaltprodukte C5a und C5b überführt. C5a unterstützt C3a in der lokalen Entzündungsreaktion. C5b bindet nach und nach die Faktoren C6 bis C9 und bildet dadurch den Membranangriffskomplex, der letztendlich zur Lyse der jeweiligen Zelle führt (Janeway et al. 2001).

Der Lektin-Weg unterscheidet sich von dem klassischen Weg nur darin, dass am

Anfang der Aktivierungskaskade statt dem C1-Komplex ein Protein steht, das Mannan-binding lectin (MBL) heißt, und dem C1-Komplex sehr ähnlich ist. Der Mannan-binding lectin Komplex enthält zwei Proteasen, Mannan-binding lectin serine protease 1 und 2 (MASP 1 und 2), die den Subtypen C1r und C1s aus dem klassischen Weg ähneln. Es wurde beschrieben, dass MASP 2 homolog dem C1s sei (Presanis et al. 2004) und es sich eigenständig aktivieren kann und dadurch die Faktoren C2 und C4 binden und aktivieren kann (Thiel et al. 1997; Vorup-Jensen et al. 2000; Harmat et al. 2004). Die aktiven Faktoren C2b und C4b bilden schließlich wieder die C3-Konvertase und es folgt derselbe Mechanismus, wie bereits oben beschrieben. Der Vorteil dieses Weges ist, dass er unabhängig von einem Antigen-Antikörper-Komplex ist, weil er das MBL an spezielle Zuckermoleküle an der Oberfläche von Bakterien bindet. Diese freien Zuckermoleküle finden sich nur bei Bakterien, da im gesunden Gewebe diese von anderen Molekülen bedeckt sind, so dass der MBL-Komplex dort nicht binden kann. Dieser Weg bildet eine Möglichkeit einer bereits frühen Antigenbekämpfung bevor Antikörper gebildet wurden (Janeway et al. 2001).

Abschließend der alternative Weg, der sich in einigen Punkten unterscheidet. Bei diesem Weg kommt es zum Kontakt zwischen dem inaktiven Faktor C3 und der Pathogenoberfläche. Als Folge daraus, kommt er zur einer spontanen Hydrolyse innerhalb des C3, worauf es sich in seiner Konformation ändert und dadurch dem Faktor B ermöglicht, sich an dem Faktor C3(H₂O) anzulagern. Durch diese Bindung kann der Faktor B jetzt durch den Faktor D in seine aktive Form, Faktor Bb, gespalten werden. Der jetzt entstandenen Komplex C3(H₂O) Bb kann nun als C3-Konvertase arbeiten und C3 in seine Produkte C3a und C3b spalten. Lagert sich nun ein aktives C3b an den C3(H₂O) Bb Komplex an, entsteht hierdurch eine vollwertiger C5-Konvertase und die restliche Aktivierung verläuft wie bereits beschrieben. Auch dieser Weg ist unabhängig von einer Antikörperproduktion, sodass auch hier eine frühe Immunantwort stattfinden kann (Janeway et al. 2001). Die Aufgaben der Mannan-binding lectin serine protease 2 wurde im oben beschrieben Text erläutert. Da das Komplementsystem ebenfalls aus bisher unerklärten Ursachen an der Proteinurie und am Fortschreiten der Erkrankung beteiligt ist, könnte darauf hinweisen, warum man diese Protease im Urin der an Alport-Syndrom erkrankten Kinder finden kann.

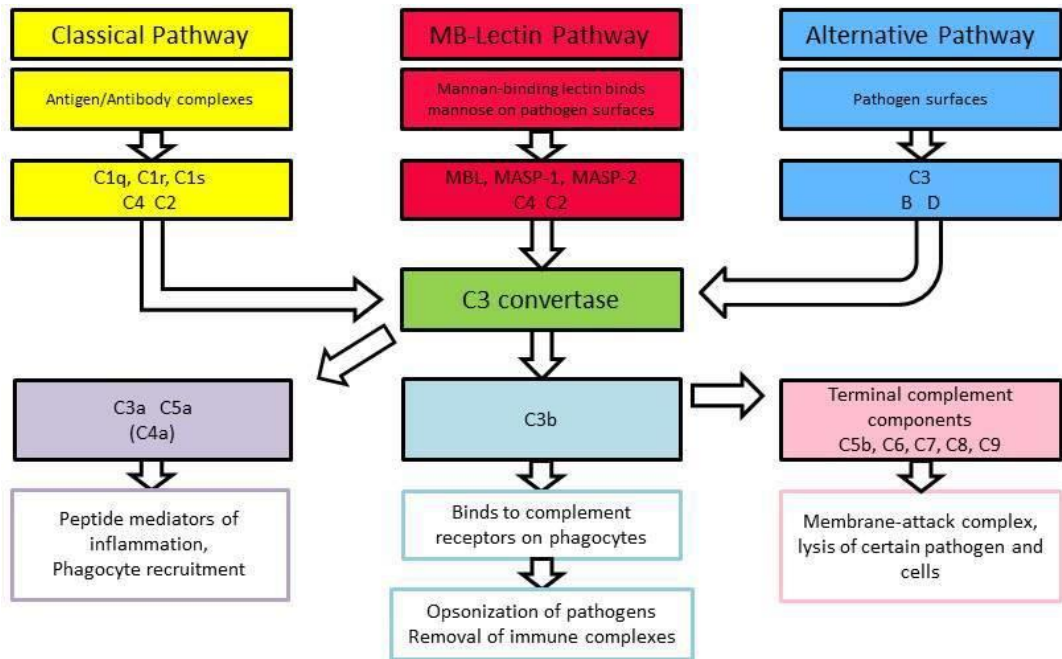


Abbildung 30: Überblick über die einzelnen Komponenten der Komplementsystems und deren Auswirkungen (modifizierte nach Janeway et al. 2001)

4.1.5 Tetraneectin

Tetraneectin ist ein Protein mit einer Masse von etwa 22 kDa und einer Länge von 202 Aminosäuren. Es ist lokalisiert auf dem Chromosom 3p22-p21.3.

Wie aus dem Namen schon abzuleiten ist, ist Tetraneectin ein Protein, das aus vier identischen Peptidketten besteht, die untereinander verbunden sind. Diese Ketten sind als ein Tetramer angeordnet. Es wurde ursprünglich entdeckt, als Plasminogen aktivierendes Protein in Kombination mit *tissue plasminogen activator* (tPa). Dabei fiel auf, dass Tetraneectin sich nur an die Kringle 4-Domäne des Plasminogen bindet, nicht jedoch an die Kringle 1-3- und die Kringle 5-Domäne (Clemmensen et al. 1986). In den folgenden Jahren zeigte sich, dass das Protein noch an andere Strukturen bindet, nämlich an Heparin, an Fibrin, den *tissue plasminogen activator* (tPa) selbst, an das Apolipoprotein A, den Hepatozyten Wachstumsfaktor und an Angiostatin 1-4 (Kluft et al. 1989; Lorentsen et al. 2000; Caterer et al. 2002; Westergaard et al. 2003; Mogues et al. 2004). Aber insgesamt gesehen ist seine Hauptaufgabe trotzdem die Bindung an die Kringle 4-Domäne des Plasminogen. Humanes Plasminogen enthält fünf

homologe dreifache Schleifen (Magnusson et al. 1976). In Abbildungen 33 ist schematisch der Aufbau dargestellt.

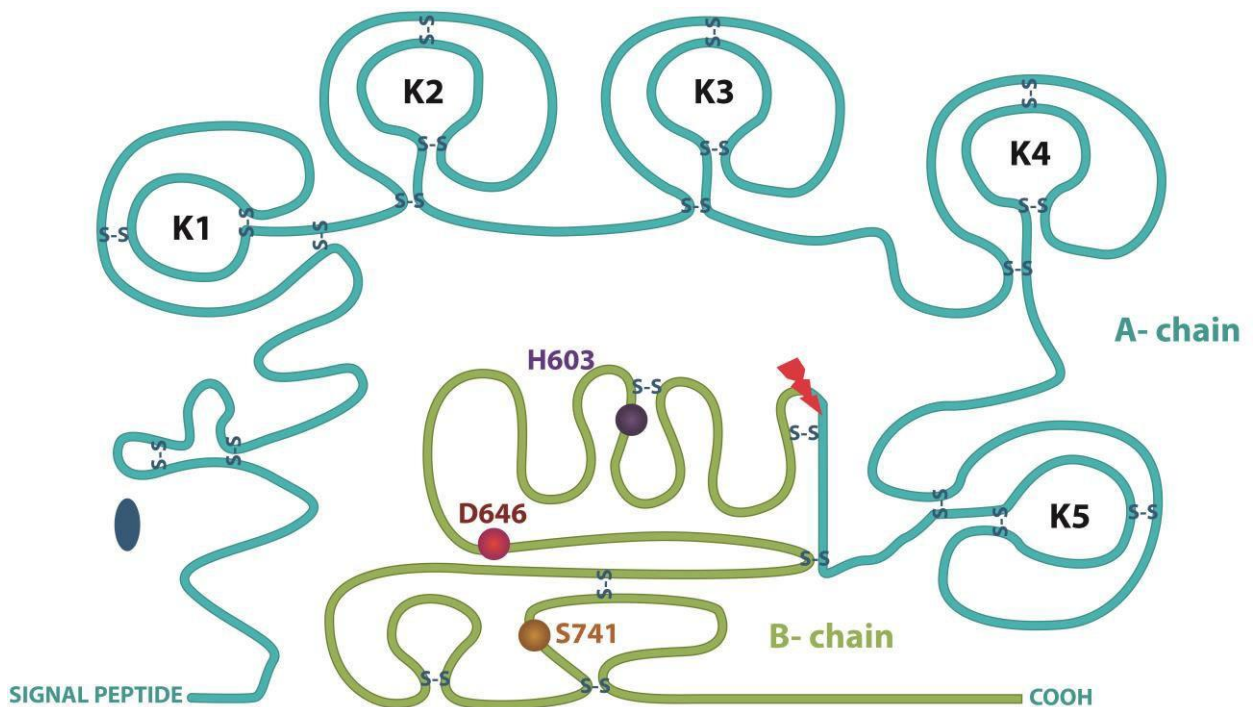


Abbildung 31: Schematische Darstellung des Plasminogenmoleküls. Die fünf Schleifen werden durch K1 – K5 dargestellt, die Schnittstelle bei der Spaltung in das aktive Plasmin durch den roten Blitz (modifiziert nach Syrovets et al. 2012)

Es ist bemerkenswert, dass, obwohl diese fünf Schleifen insgesamt sehr ähnlich sind, Tetraneurin nur an K4 bindet, aber nicht an die anderen. Andererseits binden zum Beispiel Fibrinogen oder Thrombozyten nur an K1-3, aber wiederum nicht an K4. Auch die Bindungsaffinität der einzelnen Schleifen unterscheidet sich. Diese ist am höchsten bei K1, gefolgt von K4 und dann K5 (Booth et al. 2006; Ho-Tin-Noe et al. 2005; Miles et al. 1988). Damit Plasminogen in die aktive Protease Plasmin umgewandelt werden kann, muss es gespalten werden. Dies erfolgt durch die beiden Enzyme *tissue plasminogen activator* (tPa) und *urokinase plasminogen activator* (uPa) (Violand et al. 1976). Steigt die Konzentration des Plasmin an, spaltet dieses tPa und uPa, um eine überschießende Bildung zu verhindern (Cesarman-Maus et al. 2005).

Die Hauptaufgabe des Plasmin ist sicherlich die Fibrinolyse, bei der das durch die Gerinnung entstandene Fibrinnetz in viele Fibrinolyseprodukte geteilt wird (Fay et

al. 2007)

Dem Plasmin wird zudem eine schützende Funktion zugeschrieben, da es versucht, eine akute inflammatorische Verletzungsreaktion in den Glomeruli zu unterdrücken, da durch erhöhte Fibrinablagerungen der Nierenschaden und somit letztendlich das Nierenversagen gesteigert wird (Castellino et al. 2005). In Abbildung 34 sieht man den Einfluss des Plasmin auf die Extrazelluläre Matrix.

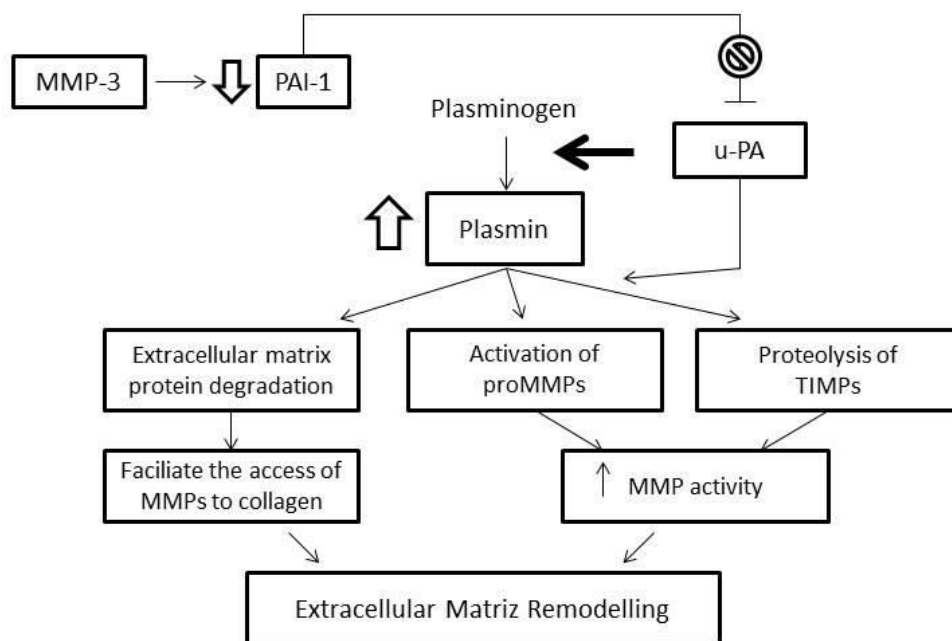


Abbildung 32: Eigenschaften des Plasmin neben der Fibrinolyse. Es wird die Aktivierung des Plasmin vom Plasminogen durch uPa gezeigt, neben der Hemmung des uPa durch den Plasminogen-activator-inhibitor (PAI-1) (modifiziert nach Frontiers in Bioscience 1995)

Es aktiviert mehrere MMP's und hemmt zeitgleich deren Gegenspieler, die TIMP's, die bereits ausführlich in Kapitel 1.3.2 besprochen wurden. Somit ist Plasmin ein wichtiges Enzym im Gewebeumbau und deren Reparatur (Wewer et al. 1998). Zudem ist Plasmin am Kollagenumbau beteiligt, indem es die Prokollagenase in die aktive Kollagenase umwandelt (Villamediana et al. 1990).

Somit hat Tetranectin indirekt über seine Bindung und Aktivierung an das Plasminogen einen Einfluss auf die Umbauprozesse, die beim Alport-Syndrom in der Niere stattfinden und es versucht zusätzlich, die Gerinnungsprozesse zu

unterdrücken.

In der Doktorarbeit, die dieser vorausging, wurde das Plasminogen direkt im Urin von Mäusen als potentieller Biomarker gefunden, hier beim Menschen wird der Umweg über das Tetranectin gegangen. Trotzdem besteht hier eine Gemeinsamkeit, da es in beiden Fällen zu einer Aktivierung von Plasminogen kommt mit den oben beschriebenen Auswirkungen. (Doktorarbeit Imke Schmidt-Eylers 2012).

4.2 Limitationen und Schwächen

Die erste und offensichtlichste Schwäche dieser Arbeit ist sicher, dass es nur 5 an Alport-Syndrom erkrankte Probanden gab, sodass aktuell anhand dieser Daten keine statistische Aussage getroffen werden kann. Dadurch, dass es eine sehr seltene Erkrankung ist, die zudem primär Kinder und Jugendliche betrifft, ist eine Beschaffung von Urinproben sehr schwer. Mit dieser Arbeit wurde jetzt ein erster Hinweis auf mögliche Proteinbiomarker im Urin gezeigt. Sicher müssen diese Ergebnisse jedoch in einer größeren Kohorte bestätigt werden, bevor man einen möglichen Test zur Diagnostik zulässt.

Ebenfalls einschränkend ist, dass sich nur 2 der 5 Proteine mittels ELISA bestätigen ließen. Die Tatsache, dass alle 5 Proteine mittels massenspektrometrischen Maßnahmen nachgewiesen wurden, bestätigt das Vorhandensein dieser Proteine. Hier ist es möglich, dass die Proteine während der glomerulären Filtration derart verändert wurden, dass der spezifische Antikörper des ELISA nicht mehr binden konnte und so ein Nachweis nicht möglich war. Somit besteht bei all den Proteinen die Gefahr, dass es zu Veränderungen in der Proteinstruktur kommen kann und so mögliche Antikörper nicht mehr binden können, was später in der Diagnostik mittels Urinstreifen problematisch werden könnte.

4.3. Schlussfolgerung

Somit lassen sich zu den initial in Absatz 1.7 gestellten Thesen folgende Ergebnisse zeigen.

- 1) Ja, es gibt eine Vielzahl an Proteinen, die bei Patienten mit Alport-Syndrom über den Urin ausgeschieden werden im Vergleich mit dem Urin gesunder Menschen.
- 2) Fünf dieser Proteine sind bisher in der Literatur nicht im Zusammenhang mit anderen Erkrankungen beschrieben, diese wäre Chondroitin sulfate proteoglycan 4, Mannan-binding lectin serine protease 2, Multimerin-2, Peroxiredoxin-2 und Tetranectin und kommen somit als potentielle Biomarker in Frage.
- 3) Zwei dieser fünf Proteine liessen sich mittels ELISA bestätigen, Mannan-binding lectin serine protease 2 und Tetranectin, sodass auf diese beiden Proteine das Hauptaugenmerk gelegt werden sollte.
- 4) Diese These sollte Gegenstand von nachfolgenden Arbeiten sein.

5 Zusammenfassung

Das Alport-Syndrom ist eine erbliche, progredient verlaufende Nierenerkrankung, die durch Mutation der $\alpha 3$ -, $\alpha 4$ - oder $\alpha 5$ -Ketten des Typ-IV-Kollagens entsteht. Infolge von charakteristischen Veränderungen der glomerulären Basalmembran manifestiert sich eine Proteinurie und Hämaturie. Die Erkrankung kann außerdem mit Innenohrschwerhörigkeit und typischen Augenveränderungen einhergehen. Im Verlauf der Erkrankung kommt es sowohl zur Nephrosklerose als auch zur tubulointerstitiellen Fibrose, was schließlich zum terminalen Nierenversagen führt. Die Therapie der ersten Wahl stellt derzeit der ACE-Hemmer Ramipril dar. Zwar kann Ramipril den strukturellen Schaden der glomerulären Basalmembran nicht beheben, dafür aber bei frühzeitigem Therapieeinsatz die Proteinurie mindern sowie nephroprotektiv und antifibrotisch wirken.

Demzufolge ist es wichtig, das Alport-Syndrom so früh wie möglich zu diagnostizieren. Bislang sind keine diagnostischen Marker für das Alport-Syndrom bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde, nach den Erfolgen bei der Suche nach Biomarkern bei der COL4A3-Knockout-Maus, jetzt im menschlichen Urin nach Proteinen gesucht, die für ein frühes Stadium des Alport-Syndrom charakteristisch sein könnten.

Zunächst wurde der Urin von gesunden und von am Alport-Syndrom erkrankten Kindern analysiert. Dazu wurden mittels 2D-SDS-PAGE die Proteine im Urin nach Ladung und Masse getrennt, um ihre Proteomprofile darstellen zu können. Im Anschluss erfolgten die massenspektrometrische Analyse und die quantitative Auswertung der Regulationsunterschiede der identifizierten Proteine. Insgesamt konnten 67 verschiedene Proteine identifiziert werden, von denen die fünf Proteine Chondroitin sulfat proteoglycan 4, Mannan-binding lectin serine protease 2, Multimerin-2, Peroxiredoxin-2 und Tetranectin klinisch relevant hoch reguliert waren und nicht in der Vergangenheit im Zusammenhang mit anderen Nierenerkrankungen beschrieben worden waren.

Diese Proteine wurden mittels ELISA geprüft, wobei Mannan-binding lectin serine protease 2 und Tetranectin als mögliche Biomarker verifiziert werden konnten. Schließlich wurden dennoch alle diese fünf Proteine im Rahmen dieser Arbeit biochemisch diskutiert und dabei in den Zusammenhang der Pathogenese des Alport-Syndrom gebracht.

Für die Zukunft muss die Aussagekraft dieser potentiellen Biomarker an einer größeren Fallzahl bestätigt werden, diese Arbeit gibt nur erste Hinweise, es wäre aber natürlich wünschenswert, wenn sich einer oder mehrere, der hier gefundenen Proteine als tatsächliche Biomarker herausstellen würden. Da das Alport-Syndrom eine sehr seltene Erkrankung ist, fällt es natürlich schwer eine große Anzahl an Urinproben zu bekommen. Trotzdem wäre es hilfreich dies zu versuchen, um die frühzeitige Diagnostik der Krankheit zu ermöglichen und vereinfachen.

6 Literaturverzeichnis

- Abdulhussein R, Koo D, Vogel W (2008): Identification of disulfide-linked dimers of the receptor tyrosine kinase DDR1. *J Biol Chem* 283, 12026–12033
- Abdulhussein R, McFadden C, Fuentes-Prior P, Vogel W F (2004): Exploring the collagen-binding site of the DDR1 tyrosine kinase receptor. *J Biol Chem* 279, 31462-31470
- Abrahamson D, Hudson B, Stroganova L, Borza D, John P (2009): Cellular origins of type IV collagen networks in developing glomeruli. *J Am Soc Nephrol* 20, 1471–1479
- Aebersold R, Mann M (2003): Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422, 198–207
- Alport A (1927): Hereditary familial congenital haemorrhagic nephritis. *Br Med J* 1, 504–506
- Andjelković M, Alessi DR, Meier R, Fernandez A, Lamb NJ, Frech M, Cron P, Cohen P, Lucocq JM, Hemmings BA (1997): Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol Chem* 272, 21515-31524
- Andrews K, Betsuyaku T, Rogers S, Shipley J, Senior R, Miner J (2000): Gelatinase B (MMP-9) is not essential in the normal kidney and does not influence progression of renal disease in a mouse model of Alport syndrome. *Am J Pathol* 57, 303–311
- Aumüller G, Aust G, Doll A, Engele J, Kirsch J, Mense S, Reissig D, Salvetter J, Schmidt W, Schmitz F (Hrsg.): *Duale Reihe Anatomie*. 1. Auflage; Thieme, Stuttgart 2007
- Baricos W, Cortez S, Deboisblanc M, Xin S (1999): Transforming growth factor-beta is a potent inhibitor of extracellular matrix degradation by cultured human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 10, 790–795
- Baum A, Pohl M, Kreuzsch S, Cumme G, Ditze G, Misselwitz J, Kiehntopf M, Udby L, Meier-Hellmann A, Rhode H (2008): Searching biomarker candidates in serum using multidimensional native chromatography. II Method evaluation with Alport syndrome and severe inflammation. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 876, 31–40
- Border W, Ruoslahti E (1992): Transforming growth factor-beta in disease: the dark side of tissue repair. *J Clin Invest* 90, 1–7

- Bradford M (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
- Campoli M, Ferrone S, Wang X (2010): Functional and clinical relevance of chondroitin sulfate proteoglycan4. *Adv Cancer Res* 109, 73–121
- Castellino FJ, Ploplis VA (2005): Structure and function of the plasminogen/plasmin system. *Thromb Haemost* 93, 647-654
- Caterer NR, Graversen JH, Jacobsen C, Moestrup SK, Sigurskjold BW, Etzerodt M, Thøgersen HC (2002): Specificity determinants in the interaction of apolipoprotein(a) kringles with tetranectin and LDL. *Biol Chem* 383, 1743-1750
- Cesarman-Maus G, Hajjar KA (2005): Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol* 129, 307-321
- Cha MK, Kim IH (1995): Thioredoxin-linked peroxidase from human red blood cell: evidence for the existence of thioredoxin and thioredoxin reductase in human red blood cell. *Biochem Biophys Res Commun* 217, 900-907
- Chatziantoniou C, Dussaule J (2005): Insights into the mechanisms of renal fibrosis: is it possible to achieve regression? *Am J Physiol Renal Physiol* 289, 227–234
- Chekenya M, Krakstad C, Svendsen A (2008): The progenitor cell marker NG2 /MPG promotes chemoresistance by activation of integrin-dependent PI3K/Akt signaling. *Oncogene* 27, 5182–5194
- Christian S, Ahorn, H, Novatchkova M, Garin-Chesa P, Park JE, Weber G (2001): Molecular cloning and characterization of EndoGlyx-1, an EMILIN-like multisubunit glyco-protein of vascular endothelium. *J Biol Chem* 276, 48588–48595
- Clemmensen I, Petersen LC, Kluft C (1986): Purification and characterization of a novel, oligomeric, plasminogen kringle 4 binding protein from human plasma: tetranectin. *Eur J Biochem* 156, 327-333
- Cosgrove D, Meehan D, Delimont D, Pozzi A, Chen X, Rodgers K, Tempero R, Zallocchi M, Rao V (2008): Integrin alpha1beta1 regulates matrix metalloproteinases via P38 mitogen-activated protein kinase in mesangial cells: implications for Alport syndrome. *Am J Pathol* 172, 761–773
- Cosgrove D, Rodgers K, Meehan D, Miller C, Bovard K, Gilroy A, Gardner H, Kotelianski V, Gotwals P, Amatucci A (2000): Integrin alpha1beta1 and transforming growth factor-1 play distinct roles in Alport glomerular pathogenesis

and serve as dual targets for metabolic therapy. *Am J Pathol* 157, 1649–1659

Cosgrove D, Meehan D, Grunkemeyer J, Kornak J, Sayers R, Hunter W, Samuelson G (1996): Collagen COL4A3 knockout: a mouse model for autosomal Alport syndrome. *Genes Dev* 10, 2981–2992

De la Torre E, Genaro AM, Ribeiro ML, Pagotto R, Pignataro OP, Sales ME (2008): Proliferative actions of muscarinic receptors expressed in macrophages derived from normal and tumor bearing mice. *Biochim Biophys Acta* 1782, 82-89

De Zeeuw D, Parving HH, Henning RH (2006): Microalbuminuria as an early marker for cardiovascular disease. *J Am Soc Nephrol* 17, 2100-2105

Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ (1997): Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 324, 1-18

Deguchi F, Tomura S, Yoshiyama N, Takeuchi J (1989): Intraglomerular deposition of coagulation-fibrinolysis factors and a platelet membrane antigen in various glomerular diseases. *Nephron* 51, 377–383

Deodhar AK, Rana RE (1997): Surgical physiology of wound healing: a review. *J Postgrad Med* 43, 52-56

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

Dihazi H, Asif A, Agarwal N, Doncheva Y, Müller G (2005): Proteomic analysis of cellular response to osmotic stress in thick ascending limb of Henle’s loop (TALH) cells. *Mol Cell Proteomics* 4, 1445–1458

Doublier S, Ruotsalainen V, Salvidio G, Lupia E, Biancone L, Conaldi P, Reponen P, Tryggvason K, Camussi G (2001): Nephrin redistribution on podocytes is a potential mechanism for proteinuria in patients with primary acquired nephrotic syndrome. *Am J Pathol* 158, 1723–1731

Eliceiri BP, Puente XS, Hood JD, Stupack DG, Schlaepfer DD, Huang XZ, Sheppard D, Cheresh DA (2002): Src-mediated coupling of focal adhesion kinase to integrin alpha(v)beta5 in vascular endothelial growth factor signaling. *J Cell Biol* 157, 149-160

Fay WP, Garg N, Sunkar M (2007): Vascular functions of the plasminogen activation system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 1231-1237

Ferrara N, LeCouter J, Lin R (2002): Endocrine gland vascular endothelial growth factor (EG-VEGF) and the hypothesis of tissue-specific regulation of

angiogenesis. *Endocr Res* 28, 763-764

Flinter F, Chantler C, Stewart Cameron J, Houston I, Bobrow M (1988): Genetics of classic Alport's syndrome. *Lancet* 332, 1005–1007

Fogo A (1999): Mesangial matrix modulation and glomerulosclerosis. *Exp Nephrol* 7, 147–159

Girgert R, Martin M, Kruegel J, Miosge N, Temme J, Eckes B, Müller G, Gross O (2010): Integrin alpha2-deficient mice provide insights into specific functions of collagen receptors in the kidney. *Fibrogenesis Tissue Repair* 3, 19-26

Goldberg GI, Collier IE, Eisen AZ, Marmer BL, Wilhelm SM (1992): Mosaic structure of the secreted ECM metalloproteases and interaction of the type IV collagenases with inhibitors. *Matrix Suppl* 1, 25-30

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

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

Gross O, Weber M (2005): Von der Molekulargenetik des Alport-Syndroms zu Prinzipien der Organprotektion bei chronischen Nierenerkrankungen. *Med Klin* 100, 826–831

Gross O, Schulze-Lohoff E, Koepke M, 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 S, McFadden C, Chen D, Tam S, Thorner P, Smyth N, Addicks K, Bloch W (2004b): DDR1-deficient mice show localized subepithelial GBM thickening with focal loss of slit diaphragms and proteinuria. *Kidney Int* 66, 102–111

Gross O, Beirowski B, Koepke M, 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, Netzer K, 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

- Gunwar S, Ballester F, Noelken M, Sado Y, Ninomiya Y, Hudson B (1998): Glomerular basement membrane. Identification of a novel disulfide-cross-linked network of alpha3, alpha4, and alpha5 chains of type IV collagen and its implications for the pathogenesis of Alport syndrome. *J Biol Chem* 273, 8767–8775
- Harmat V, Gál P, Kardos J, Szilágyi K, Ambrus G, Végh B, Náray-Szabó G, Závodszy P (2004): The structure of MBL-associated serine protease-2 reveals that identical substrate specificities of C1s and MASP-2 are realized through different sets of enzyme-substrate interactions. *J Mol Biol* 342, 1533-1546
- Hassan MI, Waheed A, Yadav S, Singh TP, Ahmad F (2008): Zinc alpha 2-glycoprotein: a multidisciplinary protein. *Mol Cancer Res* 6, 892-906
- Hellman U, Wernstedt C, Gonez J, Heldin C (1995): Improvement of an In-Gel digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing. *Anal Biochem* 224, 451–455
- Hermann P, Armant M, Brown E, Rubio M, Ishihara H, Ulrich D, Caspary RG, Lindberg FP, Armitage R, Maliszewski C, Delespesse G, Sarfati M (1999): The vitronectin receptor and its associated CD47 molecule mediates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes by interaction with soluble CD23. *J Cell Biol* 144, 767-775
- Hirawa N, Uehara Y, Ikeda T, Gomi T, Hamano K, Totsuka Y, Yamakado M, Takagi M, Eguchi N, Oda H, Seiki K, Nakajima H, Urade Y (2001): Urinary prostaglandin D synthase (beta-trace) excretion increases in the early stage of diabetes mellitus. *Nephron* 87, 321-327
- Ho-Tin-Noé B, Rojas G, Vranckx R, Lijnen HR, Anglés-Cano E (2005): Functional hierarchy of plasminogen kringles 1 and 4 in fibrinolysis and plasmin-induced cell detachment and apoptosis. *FEBS J* 272, 3387-3400
- Hou G, Vogel W, Bendeck M (2002): Tyrosine kinase activity of discoidin domain receptor 1 is necessary for smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression. *Circ Res* 90, 1147–1149
- Hsiang-Hao H, Hoffmann S, Di Marco G, Endlich N, Peter-Katalinić J, Weide T, Pavenstädt H (2011): Downregulation of the antioxidant protein peroxiredoxin 2 contributes to angiotensin II-mediated podocyte apoptosis. *Kidney Int* 80, 959-969
- Hudson B, Tryggvason K, Sundaramoorthy M, Neilson E (2003): Alport's

syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. *N Engl J Med* 348, 2543–2556

Hudson B, Reeders S, Tryggvason K (1993): Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis. *J Biol Chem* 268, 26033–26036

Hynes RO (1992): Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* 69, 11-25

Iida J, Wilhelmson KL, Ng J, Lee P, Morrison C, Tam E, Overall CM, McCarthy JB (2007): Cell surface chondroitin sulfate glycosaminoglycan in melanoma: role in the activation of pro-MMP-2 (pro-gelatinase A). *Biochem J* 403, 553–563

Ikedo K, Sannoh T, Kawasaki N, Kawasaki T, Yamashina I (1987): Serum lectin with known structure activates complement through the classical pathway. *J Biol Chem* 262, 7451-7454

Iwamoto T, Nakashima Y, Sueishi K (1990): Secretion of plasminogen activator and its inhibitor by glomerular epithelial cells. *Kidney Int* 37, 1466–1476

Janeway CA (2001): How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect* 3, 1167-1171

Johnsson L, Arenberg I (1981): Cochlear abnormalities in Alport's syndrome. *Arch Otolaryngol* 107, 340

Kalluri R, Shield C, Todd P, Hudson B, Neilson E (1997): Isoform switching of type IV collagen is developmentally arrested in X-linked Alport syndrome leading to increased susceptibility of renal basement membranes to endoproteolysis. *J Clin Invest* 99, 2470–2478

Kashtan C, Ding J, Gregory M, Gross O, Heidet L, Knebelmann B, Rheault M, Licht C (2012): Clinical practice recommendations for the treatment of Alport syndrome: a statement of the Alport Syndrome Research Collaborative. *Pediatr Nephrol* 1, 5-11

Kashtan C (1999): Alport syndrome: an inherited disorder of renal, ocular, and cochlear basement membranes. *Medicine* 78, 338–360

Kashtan C, Michael A (1996): Alport syndrome. *Kidney Int* 50, 1445–1463

Kasper G, Braunwald E, Fauci A, Hauser S, Longo D und Jameson J (Hrsg.): *Harrisons Innere Medizin*. 16. Auflage; ABW Wissenschaftsverlag, Berlin 2005

Kawasaki T, Etoh R, Yamashina I (1978): Isolation and characterization of a mannan-binding protein from rabbit liver. *Biochem Biophys Res Commun* 81,

1018-1024

Kluft C, Jie AF, Los P, de Wit E, Havekes L (1989): Functional analogy between lipoprotein(a) and plasminogen in the binding to the kringle 4 binding protein, tetranectin. *Biochem Biophys Res Commun* 161, 427-433

Kluft C, Los P, Clemmensen I (1989): Calcium-dependent binding of tetranectin to fibrin. *Thromb Res* 55, 233-238

Korhonen M, Yläne 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

Kreidberg J, Donovan M, Goldstein S, Rennke H, Shepherd K, Jones R, Jaenisch R (1996): Alpha 3 beta 1 integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis. *Development* 122, 3537–3547

Löffler G, Petrides PE (Hrsg.): *Biochemie und Pathobiochemie*, 7. Auflage; Springer, Berlin 2002

Lopez-Hellin J, Cantarell C, Jimeno L, Sanchez-Fructuoso A, Puig-Gay N, Guirado L, Vilariño N, Gonzalez-Roncero FM, Mazuecos A, Lauzurica R, et al. (2013): A form of apolipoprotein a-I is found specifically in relapses of focal segmental glomerulosclerosis following transplantation. *Am J Transplant* 13, 493-500

Lorentsen RH, Graversen JH, Caterer NR, Thogersen HC, Etzerodt M (2000): The heparin-binding site in tetranectin is located in the N-terminal region and binding does not involve the carbohydrate recognition domain. *Biochem J* 347, 83-87

Mustonen T, Alitalo K (1995): Endothelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis. *J Cell Biol* 129, 895-898

Lüllmann-Rauch R (Hrsg.): *Taschenlehrbuch Histologie*, 2. Auflage; Thieme, Stuttgart 2003

Magnusson S, Sottrup-Jensen L, Petersen T E, Dudek-Wojcienchowska G, Clayes H (1976): *Proteolysis and physiological regulation*, 1. Auflage; Academic Press, Cambridge

Matsumoto N, Ishimura E, Koyama H, Tanaka S, Imanishi Y, Shioi A, Inaba M, Nishizawa Y (2003): Blocking of alpha 5 integrin stimulates production of TGF-beta and PAI-1 by human mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 305, 815–819

Mehlen P, Puisieux A (2006): Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer* 6, 449-458

Merchant ML, Niewczas MA, Ficociello LH, Lukenbill JA, Wilkey DW, Li M, Khundmiri SJ, Warram JH, Krolewski AS, Klein JB (2013): Plasma kininogen and kininogen fragments are biomarkers of progressive renal decline in type 1 diabetes. *Kidney Int* 83, 1177-1184

Miles LA, Dahlberg CM, Plow EF (1988): The cell-binding domains of plasminogen and their function in plasma. *J Biol Chem* 263, 11928-11934

Miner J, Sanes J (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

Mochizuki T, Lemmink HH, Mariyama M, Antignac C, Gubler MC, Pirson Y, Verellen-Dumoulin C, Chan B, Schröder CH, Smeets HJ (1994): Identification of mutations in the alpha 3(IV) and alpha 4(IV) collagen genes in autosomal recessive Alport syndrome. *Nat Genet* 1, 77-81

Mogues T, Etzerodt M, Hall C, Engelich G, Graversen JH, Hartshorn KL (2004): Tetraneurin Binds to the Kringle 1-4 Form of Angiostatin and Modifies Its Functional Activity. *J Biomed Biotechnol* 2004, 73-78

Müller G, Müller C, Dihazi H (2007): Clinical proteomics—on the long way from bench to bedside? *Nephrol Dial Transplant* 22, 1297–1300

Nagase H, Visse R, Murphy G (2006): Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 69, 562–573

Nakamura T, Miller D, Ruoslahti E, Border W (1992): Production of extracellular matrix by glomerular epithelial cells is regulated by transforming growth factor-beta. *Kidney Int* 41, 1213–1221

Nangaku M (1998): Complement regulatory proteins in glomerular diseases. *Kidney Int* 54, 1419–1428

Ndozangue-Tourigine O, Hamelin J, Bréard J (2008): Cytoskeleton and apoptosis. *Biochem Pharmacol* 76, 11-18

Noordeen N, Carafoli F, Hohenester E, Horton M, Leitinger B (2006): A transmembrane leucine zipper is required for activation of the dimeric receptor tyrosine kinase DDR1. *J Biol Chem* 281, 22744–22751

Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L (2006): VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 359-371

Ono T, Kanatsu K, Doi T, Sekita K, Onoe C, Nagai H, Muso E, Yoshida H, Tamura T, Kawai C (1991): Relationship of intraglomerular coagulation and platelet

aggregation to glomerular sclerosis. *Nephron* 58, 429–436

Oohashi T, Naito I, Ueki Y, Yamatsuji T, Permpoon R, Tanaka N, Naomoto Y, Ninomiya Y (2011): Clonal overgrowth of esophageal smooth muscle cells in diffuse leiomyomatosis-Alport syndrome caused by partial deletion in COL4A5 and COL4A6 genes. *Matrix Biol* 30, 3–8

Ostrea EM Jr, Cepeda EE, Fleury CA, Balun JE (1985): Red cell membrane lipid peroxidation and hemolysis secondary to phototherapy. *Acta Paediatr Scand* 74, 378-381

Owaki H, Makar R, Boulton TG, Cobb MH, Geppert TD (1992): Extracellular signal-regulated kinases in T cells: characterization of human ERK1 and ERK2 cDNAs. *Biochem Biophys Res Commun* 182, 1416-1422

Palumbo A, Anderson K (2011): Multiple myeloma. *N Engl J Med* 364, 1046-1060

Papadimitriou JC, Ramm LE, Drachenberg CB, Trump BF, Shin ML (1991): Quantitative analysis of adenine nucleotides during the prelytic phase of cell death mediated by C5b-9. *J Immunol* 147, 121-217

Parsons JT, Parsons SJ (1997): Src family protein tyrosine kinases: cooperating with growth factor and adhesion signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 9, 187-192

Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M (2003): Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 83, 253–307

Pesic I, Stefanovic V, Cukuranovic R, Jahn O, Bojanic V, Koziolk M, Dihazi H (2011): Identification and validation of six proteins as marker for endemic nephropathy. *J Proteomics* 74, 1994–2007

Presanis JS, Hajela K, Ambrus G, Gál P, Sim RB (2004): Differential substrate and inhibitor profiles for human MASP-1 and MASP-2. *Mol Immunol* 40, 921-929

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

Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R (Hrsg.): *Duale Reihe Biochemie*, 2. Auflage; Thieme, Stuttgart 2008

Remuzzi A, Gagliardini E, Sangalli F, Bonomelli M, Piccinelli M, Benigni A, Remuzzi G (2006): ACE inhibition reduces glomerulosclerosis and regenerates glomerular tissue in a model of progressive renal disease. *Kidney Int* 69, 1124-1130

- Ruotsalainen V, Ljungberg P, Wartiovaara J, Lenkkeri U, Kestila M, Jalanko H, Holmberg C, Tryggvason K (1999): Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 7962-7967
- Ruster M, Sommer M, Stein G, Bauer K, Walter B, Wolf G, Bauer R (2006): Renal Angiotensin receptor type 1 and 2 upregulation in intrauterine growth restriction of newborn piglets. *Cells Tissues Organs* 182, 106-114
- Ryu M, Mulay S, Miosge N, Gross O, Anders H (2011): Tumour necrosis factor- α drives Alport glomerulosclerosis in mice by promoting podocyte apoptosis. *J Pathol* 226, 120–131
- Saksela O (1985): Plasminogen activation and regulation of pericellular proteolysis. *Biochim Biophys Acta* 823, 35–65
- Sayers R, Kalluri R, Rodgers K, Shield C, Meehan D, Cosgrove D (1999): Role for transforming growth factor-1 in Alport renal disease progression. *Kidney Int* 56, 1662–1673
- Schiffer M, Schiffer L, Gupta A, Shaw A, Roberts I, Mundel P, Böttinger E (2001): Inhibitory Smads and TGF- signaling in glomerular cells. *J Am Soc Nephrol* 13, 2657–2666
- Schrattenholz A (Hrsg.): *Methoden der Proteomforschung, Molekulare Analyse der Proteinexpression*, 1. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2001
- Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K: *Prometheus LernAtlas der Anatomie, Hals und Innere Organe*, 1. Auflage; Thieme, Stuttgart 2005
- Seaver LC, Imlay JA (2001): Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183, 7173-7181
- Seo J, Lee K (2004): Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches. *J Biochem Mol Biol* 37, 35–44
- Shimada T, Nakamura H, Ohuchi E, Fujii Y, Murakami Y, Sato H, Seiki M, Okada Y (1999): Characterization of a truncated recombinant form of human membrane type 3 matrix metalloproteinase. *Eur J Biochem* 262, 907-914
- Speckmann EJ, Hescheler J, Köhling R (Hrsg.): *Physiologie*, 5. Auflage; Urban & Fischer Elsevier, München 2008
- Stallcup WB (2002): The NG2 proteoglycan: past insights and future prospects. *J*

Neurocytol 31, 423–435

Stryer L (Hrsg.): Biochemie, 2. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg 1991

Takemori N, Komori N, Matsumoto H (2006): Highly sensitive multistage mass spectrometry enables small-scale analysis of protein glycosylation from twodimensional polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 27, 1394–1406

Thiel S, Vorup-Jensen T, Stover CM, Schwaeble W, Laursen SB, Poulsen K, Willis AC, Eggleton P, Hansen S, Holmskov U, et al. (1997): A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature*, 386, 506-510

Thompson S, Deady J, Willshaw H, White R (1987): Ocular signs in Alport's syndrome. *Eye (Lond)* 1, 146–153

Tomooka S, Border W, Marshall B, Noble N (1992): Glomerular matrix accumulation is linked to inhibition of the plasmin protease system. *Kidney Int* 42, 1462–1462

Tryggvason K, Zhou J, Hostikka S, Shows T (1993): Molecular genetics of Alport syndrome. *Kidney Int* 43, 38–38

Tsunoda S, Yamabe H, Osawa H, Kaizuka M, Shirato K, Okumura K (2001): Cultured rat glomerular epithelial cells show gene expression and production of transforming growth factor expression is enhanced by thrombin. *Nephrol Dial Transplant* 16, 1776–1782

Van Der Loop F, Heidet L, Timmer E, Van Den Bosch B, Leinonen A, Antignac C, Jefferson J, Maxwell A, Monnens L, Schröder C (2000): Autosomal dominant Alport syndrome caused by a COL4A3 splice site mutation. *Kidney Int* 58, 1870–1875

Van Der Loop F, Monnens L, Schröder C, Lemmink H, Breuning M, Timmer E, Smeets H (1999): Identification of COL4A5 defects in Alport's syndrome by immunohistochemistry of skin. *Kidney Int* 55, 1217–1224

Varghese SA, Powell TB, Budisavljevic MN, Oates JC, Raymond JR, Almeida JS, Arthur JM (2007): Urine biomarkers predict the cause of glomerular disease. *J Am Soc Nephrol* 18, 913-922

Villamediana L, Rondeau E, He C, Medcalf R, Peraldi M, Lacave R, Delarue F, Sraer J (1990): Thrombin regulates components of the fibrinolytic system in human mesangial cells. *Kidney Int* 38, 956–961

Villamediana LM, Rondeau E, He CJ, Medcalf RL, Peraldi MN, Lacave R, Delarue

- F, Sraer JD (1990): Thrombin regulates components of the fibrinolytic system in human mesangial cells. *Kindy Int* 38, 956-961
- Violand BN, Castellino FJ (1976): Mechanism of the urokinase-catalyzed activation of human plasminogen. *J Biol Chem* 251, 3906-3912
- Vogel W, Abdulhusein R, Ford C (2006): Sensing extracellular matrix: an update on discoidin domain receptor function. *Cell Signal* 18, 1108–1116
- Vogel W, Brakebusch C, Fässler R, Alves F, Ruggiero F, Pawson T (2000): Discoidin-domain-rezeptor 1 is activated independently of beta1 integrin. *J Biol Chem* 275, 5779–5784
- Vogel W, Gish G, Alves F, Pawson T (1997): The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. *Mol. Cell* 1, 13-23
- Vorup-Jensen T, Petersen SV, Hansen AG, Poulsen K, Schwaeble W, Sim RB, Reid KB, Davis SJ, Thiel S, Jensenius JC (2000): Distinct pathways of mannan-binding lectin (MBL)- and C1-complex autoactivation revealed by reconstitution of MBL with recombinant MBL-associated serine protease-2. *J Immuno* 165, 2093-2100
- Wang X, Wang Y, Yu L (2010): CSPG4 in cancer: multiple roles. *Curr Mol Med* 10, 419–429.
- Weir MR (2007): Microalbuminuria and cardiovascular disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2, 581-590
- Wessel D, Flügge U (1984): A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* 138, 141–143
- Westergaard UB, Andersen MH, Heegaard CW, Fedosov SN, Petersen TE (2003): Tetranectin binds hepatocyte growth factor and tissue-type plasminogen activator. *Eur J Biochem* 270, 1850-1854
- Westermeier R, Naven PT (Hrsg.): *Proteomics in Practice: A Laboratory Manual of Proteome Analysis* (1. Auflage); Wiley-VCH Verlag, Weinheim 2002
- Wewer UM, Iba K, Durkin ME, Nielsen FC, Loechel F, Gilpin BJ, Kuang W, Engvall E, Albrechtsen R (1998): Tetranectin is a novel marker for myogenesis during embryonic development, muscle regeneration, and muscle cell differentiation in vitro. *Dev Biol* 200, 247-259
- Wilkins M, Sanchez J, Gooley A, Appel R, Humphery-Smith I, Hochstrasser D, Williams K (1996): Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotech Genet Eng Rev* 13, 19–50

Williamson DA (1961): Alport's syndrome of hereditary nephritis with deafness. *Lancet* 7216, 1321-1323

Wilson BS, Imai K, Natali PG, Ferrone S (1981): Distribution and molecular characterization of a cell-surface and a cytoplasmic antigen detectable in human melanoma cells with monoclonal antibodies. *Int J Cancer* 28, 293–300

Yang J, Price MA, Neudauer CL, Wilson C, Ferrone S, Xia H, Iida J, Simpson MA, McCarthy JB (2004): Melanoma chondroitin sulfate proteoglycan enhances FAK and ERK activation by distinct mechanisms. *J Cell Biol* 165, 881–891

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

Zhou A, Huntington JA, Pannu NS, Carrell RW, Read RJ (2003): How vitronectin binds PAI-1 to modulate fibrinolysis and cell migration. *Nat Struct Biol* 10, 541- 544

Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei Prof. Dr. G. A. Müller für die Möglichkeit bedanken in der Abteilung Nephrologie und Rheumatologie promovieren zu dürfen. Ich bedanke mich insbesondere bei meinem Betreuer, Prof. Dr. Oliver Gross, für die großartige Unterstützung und Bereitstellung des Themas, sowie für das Vertrauen, das mir entgegengebracht wurde. Zudem möchte ich mich ganz herzlich bei Diana Rubel bedanken, die in ganz Deutschland umhergefahren ist, um die einzelnen Urinproben einzusammeln und die mir auch jederzeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Weiterhin danke ich herzlich dem Team der Proteomics-Laborgruppe von Prof. Dr. Hassan Dihazi für die Bereitstellung des Labors und die tolle Zusammenarbeit. Dabei danke ich vor allem Prof. Dr. Hassan Dihazi, der mir jederzeit mit Rat und Tat behilflich war. Zudem möchte ich mich bei Elke Brunst-Knoblich bedanken, die mich in die Laborarbeiten eingeführt hat. Weiteren Dank gilt Kerstin Lüdecke, Asima Bibi und Gry Helene Dihazi für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Laborarbeit. Jede dieser Personen wurde nicht müde, sich vor allem der alltäglichen kleinen technischen Probleme und Fragen anzunehmen. Ebenfalls gilt mein Dank Christina Stanischa, die mich in die Färbung und Mikroskopie der Mäuseschnitte eingearbeitet hat – danke ebenso für ihre Unterstützung bei der Durchführung des ESI-Verfahren.

