

Aus dem CharitéCentrum für Innere Medizin
mit Gastroenterologie und Nephrologie
Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie
und Internistische Intensivmedizin
Direktor: Prof. Dr.med. Kai-Uwe Eckardt

Habilitationsschrift

Identifikation von Biomarkern bei renalen und vaskulären Erkrankungen

zur Erlangung der Venia legendi für das Fach Innere Medizin
vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr.med. Fabienne Aregger
Bern (Schweiz)

Eingereicht:	Mai 2019
Dekan:	Prof. Dr.med. Axel R. Pries
1. Gutachter/in:	Prof. Dr. med. Bruno Vogt, Bern
2. Gutachter/in:	Prof. Dr.med. Eva Brand, Münster

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung	Seiten
1.1 Akuter Nierenschaden	5
1.2 Marfansyndrom und bicuspidale Aortenklappe	8
1.3 Angewandte analytische Methoden	9
1.4 Fragestellungen	12
2. Eigene Arbeiten	14
2.1 Akuter Nierenschaden	
2.1.1 Herzchirurgische Operationen führen zum Anstieg von tubulären und inflammatorischen Proteinen im Urin bei Patienten mit und ohne akuten Nierenschaden	14
2.1.2 Identifikation von IGFBP-7 als Marker für Prognose beim akuten Nierenschadens durch Proteomanalyse des Urins	25
2.1.3 Kynurensäure im Urin ist ein prognostischer Marker des akuten Nierenschadens	38
2.1.4 Akuter Nierenschaden nach perkutanem Aortenklappenersatz: Inzidenz, Risikofaktoren, Prognose	49
2.2 Marfan-Syndrom	
2.2.1 Proteomische Analysen der aortalen Media führen zum Nachweis erhöhter Calpain 2 Aktivität bei Patienten mit Marfan-Syndrom und bicuspidaler Aortenklappe	56
3. Diskussion	68
4. Zusammenfassung	84
5. Literaturverzeichnis	86
Danksagung	96
Erklärung	98

Abkürzungen:

2-D Gelelektrophorese	2-dimensionale Gelelektrophorese
ACE	Angiotensin converting enzyme
ADQI	Acute dialysis quality initiative
AMPB	Adrenomedullin binding protein
AKI	Acute kidney injury / akuter Nierenschaden
AKIN	Acute kidney injury network
ANV	Akutes Nierenversagen
ATN	Akute Tubulusnekrose
AUC	Area under the curve
CKD	Chronic kidney disease
CS	Cardiac surgery
D	Dalton
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Early recovery
DIGE	Difference gel electrophoresis
h	Hour
IDO	Indoleamin-2,3-Dioxygenase
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IGFBP-7	Insulin-like growth factor binding protein 7
iTRAQ	Isobaric tags for relative and absolute quantification
FBN	Fibrillin
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HSPG	Heparan sulfate proteoglycan
KDIGO	Kidney disease improving global outcome
Kg	Kilogramm
KynA	Kynurenic acid
LNR	Late-/non-recovery
MFS	Marfan Syndrom
MS	Massenspektrometer
NEV	Nierenersatzverfahren
NGAL	Neutrophil-gelatinase associated lipocalin
OP	Operation
PAGE	Polyacrylamid-Gelelectrophorese

PTM	Posttranslationelle Modifikation
RBP	Retinol bindendes Protein
RIFLE Klassifikation	R=Risk, I=Injury, F=Failure, L=Loss of function, E=End-stage disease
ROC-Kurve	Receiver Operating Characteristic-Kurve
SDS	Sodium dodecyl sulfat
SOFA	Sequential organ failure assessment score
SELDI	Surface-enhanced laser desorption/ionization
SIRS	Systemisches inflammatorisches response Syndrom
TAVI	Transcatheter aortic valve implantation
TCA	Trichloressigsäure
TDO	Tryptophan-2,3-Dioxygenase
TGF	Transforming growth factor
TGFBR	Transforming growth factor β -Rezeptor
TIMP-2	Tissue inhibitor of metalloproteinases 2
Trp	Tryptophan
WB	Western Blot
ZAG	Zinc-alpha-2-glycoprotein

1. Einleitung

1.1 Einleitung akuter Nierenschaden

Der akute Nierenschaden (AKI, acute kidney injury) ist eine plötzlich auftretende Verschlechterung der glomerulären Filtrationsrate (GFR). Viele unterschiedliche Ursachen sind bekannt. Klassischerweise werden sie in prärenal, renal und postrenal eingeteilt¹. Flüssigkeitsmangel, vermindertes Blutvolumen und erniedrigter Blutdruck sind die häufigsten Ursachen des prärenalen AKI und führen zu einer Minderdurchblutung der Niere ohne strukturelle Schädigung von Zellen. Beim renalen AKI führen glomeruläre, tubuläre oder vaskuläre Erkrankungen zum Nierenschaden. Beim postrenalen AKI ist die Ursache eine Obstruktion in den ableitenden Harnwegen. Das prärenale AKI sowie die akute Tubulusnekrose (ATN) sind bei etwa 70 % der Patienten die Ursache des AKI². Im Bereich der Intensivmedizin ist das AKI besonders häufig³. Bei hämodynamisch instabilen Patienten kann es zu einer kritischen Minderdurchblutung des Nierenmarks kommen. Die schwere Form dieser Minderdurchblutung führt zu einem strukturellen Schaden und ist ein klassisches renales AKI: die ATN.

Bis zum Jahr 2004 wurden akute Verschlechterungen der Nierenfunktion als akutes Nierenversagen (ANV) beschrieben. Es gab keine einheitliche Definition des ANVs. Die Bandbreite der Diagnosekriterien lag zwischen einem Anstieg des Serumkreatinins um 0.3 mg/dl bis zur Notwendigkeit eines Nierenersatzverfahrens (NEV) mit Dialyse. Dies führte dazu, dass die Literatur über die Inzidenz des ANVs bei intensivpflichtigen Patienten mit großer Varianz zwischen 1 und 25% berichtete^{3,4}. Die Mortalität dieser Patienten wurde zwischen 28-80% beschrieben^{5,6}. Führende Forscher im Bereich des ANVs haben sich im Jahr 2004 zur Konsensusgruppe ADQI (acute dialysis quality initiative) formiert, um offene Fragen des ANVs zu klären. Im gleichen Jahr schlug die ADQI mit RIFLE erstmalig eine einheitliche ANV Klassifikation vor⁷. Mit RIFLE wurde nicht nur das ANV klassifiziert, es wurde auch umbenannt und der Faktor der Langzeitprognose berücksichtigt. So wurde das ANV neu AKI (acute kidney injury) genannt – also ein Wechsel der Definition vom Versagen zum Schaden. Die Buchstaben R, I und F stehen für die 3 Schweregrade der AKIs, nämlich R für Risk (Risiko), I für Injury (Schaden) und F für Failure (Versagen). Die

Schweregrade ergeben sich nach dem prozentualen Anstieg des Serumkreatinins innerhalb von 7 Tagen verglichen zum Baseline-Wert, dem Abfall der glomerulären Filtrationsrate oder durch die Dauer der Oligurie (Abbildung 1). Die Buchstaben L und E sind Prognoseparameter und stehen für anhaltende Dialysepflichtigkeit 4 Wochen nach AKI (L= loss of function) und 3 Monate nach AKI (E=End-stage kidney disease).

RIFLE-Klasse	GFR-Kriterium	Diurese-Kriterium
Risk	Anstieg Kreatinin x 1.5 oder Abfall GFR > 25%	Diurese < 0.5ml/kg/h während 6 h
Injury	Anstieg Kreatinin x 2 oder Abfall GFR > 50%	Diurese < 0.5ml/kg/h während 12 h
Failure	Anstieg Kreatinin x 3 oder Serumkreatinin > 4mg/dl oder Abfall GFR > 75%	Diurese < 0.3ml/kg/h während 24 h oder Anurie für 12 h
Loss of function	Fehlende Funktion nach > 4 Wochen	
ESKD	Fehlende Funktion nach > 3 Monaten	

Abbildung 1: RIFLE-Kriterien zur Diagnosestellung des AKI gemäss der Konsensusgruppe von ADQI⁷.

Diese einheitliche Definition führte nun zu einer großen Anzahl epidemiologischer Untersuchungen, die erstmalig vergleichbar waren. Die wichtigsten daraus resultierenden Erkenntnisse sind, dass das AKI bei ambulanten Patienten mit 8 % relativ selten und bei Patienten auf Intensivstationen mit 30% relativ häufig auftritt⁸. Außerdem konnte nun gezeigt werden, dass Patienten mit AKI eine höhere Krankenhausmortalität haben und dass diese mit dem Schweregrad des AKI zunimmt⁹. In der systematischen Reviewarbeit von Ricci war die Mortalität von AKI Patienten mit 31% deutlich höher als bei Kontrollpatienten ohne AKI (7%). Ausserdem zeigte sich ein klarer Anstieg der Mortalität mit zunehmendem Schweregrad des AKI (Risk: 19%, Injury 36%, Failure 47%). Noch viel einschneidender sind die Erkenntnisse bezüglich der Langzeitprognose des AKI. Mehrere Studien belegen nun, dass ein überlebtes AKI mit und ohne

vollständiger Erholung mit einem verminderten Langzeitüberleben assoziiert ist¹⁰ und außerdem gehäuft zu chronischen Nierenerkrankungen (chronic kidney disease, CKD) inklusive Dialysepflichtigkeit führt¹¹.

Diese relevanten neuen Erkenntnisse führten zu weiteren Bestrebungen, das AKI besser zu beschreiben und zu verstehen. Experten haben bemängelt, dass das Zeitfenster von 7 Tagen zur Diagnosestellung des AKI zu lang sei. Sie haben mit der neuen Konsensusgruppe AKIN (acute kidney injury network) eine neue Definition vorgeschlagen und dabei die 3 Schweregrade beibehalten, diese jedoch als Grad 1 bis 3 unbenannt. Der Grad 1 entspricht einem RIFLE-Risk, Grad 2 einem RIFLE-Injury und Grad 3 einem RIFLE-Failure. Zusätzlich wurde nun beim Grad 1 das Kriterium Anstieg des Kreatinins um 0.3mg/dl in 48h vorgeschlagen¹². KDIGO hat anschließend im Ergebnis eines weltweiten Abstimmungsprozesses eine dritte Klassifikation vorgeschlagen, welche RIFLE und AKIN zusammenfasst¹³. Aufgrund der sehr großen Ähnlichkeit der Definitionen bleiben Studien weiterhin vergleichbar. Zunehmend setzt sich die KDIGO Definition und Stadieneinteilung in der internationalen Literatur durch. Die beschriebenen Klassifikationen zur Diagnosestellung des AKI basieren auf einem Anstieg des Serumkreatinins verglichen zu Vorwerten. Ein relevanter Nachteil dieser Methode besteht darin, dass das Kreatinin kein optimaler Marker für die Nierenfunktion ist. Das Serumkreatinin steigt erst an, wenn fast die Hälfte der glomerulären Filtrationsrate weggefallen ist; ausserdem ist der Anstieg zeitlich verzögert¹⁴. Deshalb werden Marker gesucht, die das Auftreten eines AKI frühzeitig vorhersagen (antizipieren).

Seit vielen Jahren ist die Biomarker Forschung beim AKI von großem Interesse. Themen mit besonders hoher Beachtung sind die frühzeitige Diagnostik des AKI, die Identifikation von Ursachen des Nierenschadens und die Prognoseabschätzung. Die am meisten beachteteten Biomarker der letzten Jahre sind neutrophil-gelatinase associated lipocalin (NGAL), urinary kidney injury molecule 1 (KIM-1), tissues inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP-2) und insulin-like growth factor binding protein 7 (IGFBP-7)^{15,16}.

Um neue Biomarker identifizieren zu können, sind bioanalytische Methoden von großer Bedeutung.

In meinen Arbeiten habe ich mich mit der Identifikation solcher Biomarker beschäftigt und dazu unter anderem die Gelelektrophorese als analytische Methode eingesetzt.

1.2 Marfan Syndrom und bicuspid Aortenklappe

Das Marfan Syndrom (MFS) ist eine der häufigsten genetischen Erkrankungen. Sie ist bedingt durch eine Mutation im Fibrillin 1 Gen (FBN1) und wird autosomal dominant vererbt¹⁷. Sie führt zu Veränderungen im Bindegewebe, Skelettsystem, den Augen und dem kardiovaskulären System. Die Dilatation der Aorta, welche zur Aortendissektion bis hin zur Ruptur führen kann, ist die bedrohlichste Manifestation des MFS. Die Diagnose wird klinisch gestellt aufgrund der bestehenden Organmanifestationen¹⁸. Es besteht eine ausgeprägte phänotypische Varianz bei Marfan Patienten mit Erstdiagnosestellung im Säuglingsalter bis hin zu Hochbetagten. Der Mechanismus, der zur Gewebedilatation führt, blieb lange Zeit unklar und ist auch bis jetzt nicht abschließend geklärt. Neue, höchst interessante Erkenntnisse weisen nun auf eine relevante Rolle von transforming growth factor-beta (TGF- β)¹⁹, Angiotensin²⁰ sowie Metalloproteinasen²¹ hin. Der molekulare Mechanismus, der von der Mutation zu den unterschiedlichen Manifestationen führt, ist nicht genau geklärt. Zwei Hauptmechanismen werden diskutiert. Zum einen wird vermutet, dass Mutationen zu Veränderungen der Mikrofibrillen führen, welche in der Morphogenese eine relevante Rolle spielen²². Alternativ wird diskutiert, dass verminderte Sequestrierung von TGF- β oder eine veränderte TGF- β -Aktivität zu den genannten Veränderungen führen¹⁹. Blockierung von TGF- β durch Antikörper hat im Mausmodell beim MFS die Erweiterung der Aorta vermindert²³. Außerdem weisen Daten darauf hin, dass beim MFS Angiotensin 2 hochreguliert ist und dass dessen Blockierung durch Angiotensinrezeptorblocker zu einer Verminderung der Progression der Aortendilatation führt²³⁻²⁴.

Im Zuge unserer klinischen Studie, in welcher wir die Inzidenz des AKI beim Aortenklappenersatz untersucht haben, sind wir auf die viel versprechenden, neu identifizierten Pathomechanismen bei der Genese der Aortenstenose bei der bicuspiden Aortenklappe gestoßen. Im Jahr 2003 publizierte die Gruppe um Fedak neue, interessante Erkenntnisse zum Pathomechanismus der Aortendilatation bei Patienten mit bicuspidaler Aortenklappe²⁵. In der Aorta von Patienten mit bicuspidaler Aortenklappe war Fibrillin-1 runterreguliert und gleichzeitig die Matrixmetalloproteinase 2 hochreguliert. Zur gleichen Zeit

wurden die beschriebenen neuen Erkenntnisse des Mechanismus der Aortendilatation beim Marfansyndrom publiziert. Diese hat uns begeistert und motiviert, uns mit den etablierten Methoden an ein neues Biomaterial zu wagen und dieses mit unserer bekannten Methode der Gelelektrophorese zu untersuchen. Wir wollten ein Proteomexperiment der Aortenwand bei Patienten mit Marfan Syndrom und bicupsider Aorteklappe durchführen, um weitere Erkenntnisse zu erhalten über Faktoren, welche eine Rolle bei der Dilatation der Aortenwand spielen.

1.3 Angewandte analytische Methoden

Die nicht invasive Diagnosestellung einer Erkrankung durch Analyse von Urin, Blut oder Dialysat hat seit jeher eine große Faszination und Bedeutung in der Medizin.

Nach großen technologischen Fortschritten in der Genanalyse mit kompletter Sequenzierung des humanen Genoms im Jahr 2003 folgte verzögert ein Revival in der Proteinanalytik²⁶. Durch Etablierung neuer Separationsmethoden sowie Optimierung altbewährter Techniken, wie der Gelelektrophorese, gelang es zunehmend komplexe Proteingemische zu trennen, differentiell regulierte Proteine zu identifizieren und spezifische Proteine zu quantifizieren²⁷. Große Fortschritte im Proteom Project führten Mitte der 1990er Jahre zum Begriff „Proteomics“. Die Analyse des Proteoms, also der Gesamtheit aller bestehenden Proteine einer Flüssigkeit, einer Zelle, eines Gewebes, eines Gefäßes oder eines Organismus, hat großes Interesse geweckt. Drei zentrale Bereiche werden dabei untersucht: „Expressionsproteomics“ dient der qualitativen und quantitativen Proteinanalyse in zwei verschiedenen Konditionen wie „krank“ versus „gesund“, „behandelt“ versus „unbehandelt“, „gute Prognose“ versus „schlechte Prognose“. Klassisches Beispiel hierfür ist die Biomarkerforschung. Zweites Interessensfeld ist „funktionelle Proteomics“: durch die Analyse des Proteoms können Rückschlüsse auf biologische Funktionen gezogen werden. Als drittes Interessengebiet gilt die „strukturelle Proteomics“: durch die Analyse des Proteoms können Rückschlüsse auf die 3-dimensionale Struktur und Form von Proteinen gezogen werden²⁸.

Viele unterschiedliche Techniken werden in der Proteomanalyse angewandt^{29,30}. Zur Separation von Proteingemischen sind gängige Verfahren die 2-dimensionale

(2-D)-Gel Elektrophorese³¹, Kapillarelektrophorese oder die Chromatographie. Zur Identifikation von Proteinen wird typischerweise die Massenspektrometrie³² angewandt oder Edman Sequencing. Zur Quantifizierung werden difference gel electrophoresis (DIGE)³³ oder isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation (iTRAQ)³⁴ eingesetzt. Die verschiedenen Methoden haben unterschiedliche Vor- und Nachteile. Sie sollten als komplementäre Methoden betrachtet werden, da sie unterschiedliche Stärken und Schwächen haben.

Die 2-D-Gelelektrophorese eignet sich besonders gut zur Separation von hydrophilen Proteinen in einem pH-Bereich zwischen 3-11 sowie einer molekularen Größe zwischen 10´000 Dalton (D) und 250´000 D. Ein großer Vorteil der 2-D-Gelelektrophorese besteht darin, dass die Methode es erlaubt, posttranslationelle Modifikationen (PTM) zu identifizieren, also Veränderungen welche nach der Proteinsynthese entstehen³⁵. Nachteile sind zum Beispiel der hohe Zeitaufwand, die relevante Gel-zu-Gel Varianz, die zu verminderter Reproduzierbarkeit führt, sowie geringe Trennung/Lösung von hydrophoben Proteinen.

2-D-Gelelektrophorese mit differentiellem Labelling (DIGE)

Komplexe Proteingemische können mit 2-D-Gelelektrophorese separiert werden³⁶. Dazu müssen Proteine in Lösung gebracht werden. In der isoelektrischen Fokussierung (IEF) erfolgt die Trennung der Proteine aufgrund ihrer Ladung. Dabei werden die gelösten Proteine auf einen Gelstreifen mit einem gewünschten pH-Gradienten appliziert. Im elektrischen Feld wandern die Proteine gemäß ihrer Ladung. Falls der pH-Wert kleiner ist als die eigene Ladung, so wird das Protein positiv geladen und wandert dann im elektrischen Feld Richtung Kathode (- Pol) bis zu exakt jenem Punkt, an welchem es keine Ladung mehr hat (isoelektrischer Punkt). Die so getrennten Proteine werden danach auf ein 2-D-Gel gelegt. Mittels sodium dodecyl sulfat polyacrylamid electrophoresis (SDS-PAGE) werden die Proteine dann nach ihrer Größe getrennt. Kleine Moleküle bewegen sich weit nach unten im Porengerüst des Polyacrylamidgels und große Moleküle bewegen sich nur gering, sodass sich die Proteine nach Größe trennen. Theoretisch hat nun jedes Molekül einen reproduzierbaren Ort auf dem 2-D-Gel, sodass quantitative Analysen möglich werden. Mit

verschiedenen Farbstoffen können die Proteine sichtbar gemacht werden und erscheinen im Gel bei guter Trennung als Punkte (spot). Jedoch besteht eine relevante Gel-zu-Gel Variation, was die Sensitivität und Spezifität von quantitativen Analysen vermindert. Um dies zu umgehen, hat Unlü im Jahr 1997 DIGE vorgeschlagen³³. Mit dieser Methode können 3 Proben auf dem gleichen Gel analysiert werden, zum Beispiel Probe von 1) AKI 2) Kontrolle ohne AKI und 3) interner Standard, der ein Gemisch von allen untersuchten Proben im gesamten Experiment ist (Abbildung 2). Dazu werden die Proben mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert (gelabelt) zum Beispiel AKI mit Cy3, die Kontrolle ohne AKI mit Cy5 und der interne Standard mit Cy2. Nach der Markierung werden die Proben gemischt. Die Proteine werden in der IEF nach Ladung und mit SDS-PAGE nach Grösse getrennt. Nach dem Experiment werden die Fluoreszenzfarbstoffe und somit die markierten Proteine mit einem spezifischen Laser detektiert. Mittels einer Software kann nun analysiert werden, welche Protein Spots signifikant hoch- oder runterreguliert sind. Der interne Standard, welcher auf jedem Gel mitläuft, dient dabei der Normalisierung und ist essentiell für die Quantifizierung.

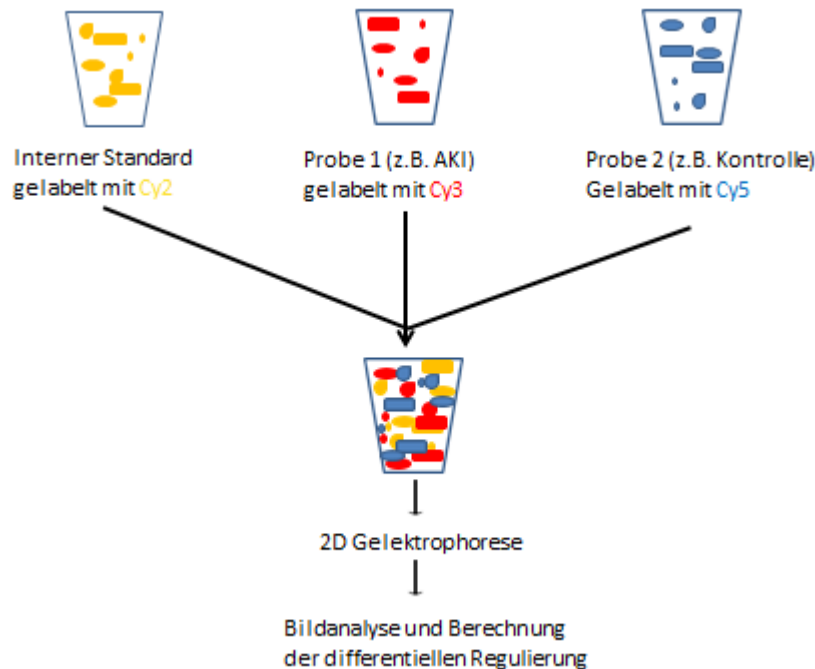


Abbildung 2: DIGE-Experiment. Modifizierte Quelle: Lilley und Friedman³⁷

Die Spots von Interesse können in der Folge weiter identifiziert werden. Dazu müssen sie aus dem Gel gestochen werden. Da die Fluoreszenzfarbstoffe nicht

sichtbar sind, muss das Gel davor gefärbt werden. Typischerweise wird dazu Coomassie Brilliant Blue verwendet³⁸. Nach Färbung können die Spots aus dem Gel gestochen und mittels Massenspektrometrie identifiziert werden.

Je nach Variabilität des untersuchten Materials werden für ein DIGE Experiment 3-12 biologische Replikate pro Gruppe benötigt³⁹. Bei einem Biomaterial mit sehr hoher Variabilität wie Urin sind 12 biologische Replikate sinnvoll, sodass das Experiment 12 Gele beinhalten sollte. Bei Biomaterialien mit geringer bis mässiger Varianz wie zum Beispiel der Tunica Media von großen Gefässen wie der Aorta, sind 3-6 biologische Replikate sinnvoll.

Nach Identifikation von differentiell regulierten Proteinen erfolgt in der Regel eine Validierung dieser Resultate durch eine zweite, unabhängige Methode.

Typischerweise wird dazu Western Blot oder Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) eingesetzt.

DIGE ist eine sehr aufwändige Methode. Sie hat aber, wie viele andere Proteomanalysen, einen besonders wichtigen Vorteil. Mit DIGE werden Materialien mit offenem Ansatz analysiert. Es werden dabei keine bekannten Marker untersucht sondern alle nachweisbaren Proteine verglichen zwischen gesund und krank oder guter und schlechter Prognose. Ziel der Analyse ist die Identifikation NEUER, bisher unbekannter Biomarker für die frühzeitige Diagnosestellung einer Erkrankung, die Identifikation von Biomarkern für Prognose, oder die Identifikation neuer Proteine, welche Rückschlüsse auf relevante Pathomechanismen führen können. DIGE als Methode der Proteomanalyse kann für viele unterschiedliche Biomaterialien eingesetzt werden wie Urin, Blut, Dialysat, Gewebe und Gefässe, wie zum Beispiel die Aorta.

1.4 Fragstellungen

Der Hauptfokus unserer Arbeiten war der akute Nierenschaden. Um den akuten Nierenschaden besser zu verstehen, haben wir unterschiedliche analytische Methoden im Urin angewandt. In mehreren Arbeiten haben wir das Urinproteom mit DIGE untersucht.

Aufgrund der höchst interessanten neuen Erkenntnisse des Pathomechanismus der Aortendilatation bei Marfan Syndrom und bicuspiden Aortenklappe haben wir aber auch ein DIGE Experiment der Aortenwand durchgeführt.

- 1) Urin-Proteomanalysen mit DIGE bei Patienten mit akutem Nierenschaden zur
 - Identifikation von operationsinduzierten Stressoren durch Analyse des Urinproteoms vor und nach herzchirurgischen Operationen und
 - Identifikation von frühen Biomarkern für das postoperative AKI nach herzchirurgischen Operationen
 - Identifikation von Markern für Prognose beim akuten Nierenschaden bei kritisch kranken Patienten

- 2) Analyse des Tryptophanmetabolismus beim akuten Nierenschaden

- 3) Evaluation der Inzidenz und der Prognose des akuten Nierenschaden nach perkutanem Aortenklappenersatz sowie die Identifikation von Markern für eine schlechte Prognose

- 4) Proteomanalyse der aortalen Media beim Marfansyndrom zur Identifikation von Pathomechanismen für die Entstehung der aortalen Dilatation

2. Eigene Arbeiten

2.1.1 Herzchirurgische Operationen führen zum Anstieg von tubulären und inflammatorischen Proteinen im Urin bei Patienten mit und ohne akuten Nierenschaden

Aregger F*, Pilop C*, Uehlinger DE, Brunisholz R, Carrel TP, Frey FJ, Frey BM.

Urinary proteomics before and after extracorporeal circulation in patients with and without acute kidney injury.

J Thorac Cardiovasc Surg 2010; 139(3):692-700.

<https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2009.11.015>

(*Geteilte Erstautorenschaft)

Hintergrund: Der akute Nierenschaden nach herzchirurgischen Operationen (cardiac surgery, CS) ist häufig. Die Inzidenz beträgt um 10-30%^{40,41} und etwa 1-2% der Patienten benötigen ein Nierenersatzverfahren (NEV)⁴². Viele mögliche Ursachen führen zum AKI nach herzchirurgischen Operationen. Genaue Mechanismen sind jedoch unbekannt.

Methode: Wir untersuchten bei 12 Patienten vor und nach herzchirurgischen Operationen das Urinproteom mit DIGE, um durch differenzielle Regulationen von Urinproteinen Rückschlüsse über operationsinduzierte Stressoren ziehen zu können. In einem zweiten DIGE Experiment haben wir den postoperativen Urin von 6 Patienten mit und 6 Patienten ohne AKI verglichen.

Resultate: Postoperativ waren zinc-alpha-2-glykoprotein (ZAG), adrenomedullin-binding protein (AMBP = α -1 microglobulin), Leichtketten, leucin-rich alpha-2-glykoprotein, gelsolin, carbonic anhydrase 1, retinol-binding protein (RBP), leucin-rich alpha-2-glykoprotein, mannan-binding lectin serine protease 2, basement membrane-specific HSPG hochreguliert, hingegen war uromodulin (Tamm-Horsfallprotein) postoperativ downreguliert.

Albumin war am 1. postoperativen Tag bei AKI Patienten hochreguliert und ZAG sowie AMBP waren downreguliert. Mit ELISA haben wir die Rolle von ZAG bei 23 Patienten mit und 45 Patienten ohne AKI weiter analysiert. Die Downregulation von ZAG bei AKI Patienten konnten wir mit ELISA bestätigen.

Konklusion: Einige der postoperativ hochregulierten Proteine sind bekannte Marker für einen tubulären Schaden (AMBP, RBP, Uromodulin). Andere

differenziell regulierte Proteine sind mit Inflammation assoziiert und können eine Folge eines operationsinduzierten Inflammationssyndroms (severe inflammatory response syndrome, SIRS) sein. Zu diesen Proteinen zählen ZAG, Leucin-rich alpha-2-glycoprotein, Mannan-binding lectin serine Protease 2 und HSPG. Im Urinproteom des postoperativen Urin zeigte sich eine Downregulation von ZAG, welche wir mit ELISA validieren konnten. Den Pathomechanismus welcher zur verminderten ZAG-Ausscheidung bei AKI Patienten führte, konnten wir nicht klären.

Wir haben in der Folge die gleiche Methode bei kritisch kranken Patienten angewandt, um Marker für die Prognose des AKIs zu identifizieren. Dazu haben wir ein DIGE Experiment mit Urin des ersten Tages des AKIs durchgeführt.

2.1.2 Identifikation von IGFBP-7 als Marker für Prognose beim akuten Nierenschaden durch Proteomanalyse des Urins

Aregger F, Uehlinger DE, Witowski J, Brunisholz RA, Hunziker P, Frey FJ, Jörres A.

Identification of IGFBP-7 by urinary proteomics as a novel prognostic marker in early acute kidney injury.

Kidney Int 2014; 85(4): 909-919. <https://doi.org/10.1038/ki.2013.363>

Hintergrund: Arbeiten der letzten Jahre haben gezeigt, dass Patienten mit AKI eine höhere 10-Jahresmortalität haben, ein höheres Risiko, eine CKD zu entwickeln und dialysepflichtig zu werden^{10,11}. Fehlende Erholung (non-recovery) vom AKI ist außerdem mit einer höheren Langzeitmortalität assoziiert sowie mit einem höheren Risiko, eine CKD zu entwickeln^{43,44}.

Methode: Um Patienten mit schlechter Prognose frühzeitig zu erkennen, haben wir das Urinproteom von Patienten auf Intensivstation am ersten Tag des AKI untersucht. Dabei wurde das Proteom verglichen zwischen Patienten mit Erholung innerhalb einer Woche (ER, early recovery) und jenen mit später oder fehlender Erholung (LNR, late-/non-recovery). Das DIGE Experiment wurde bei 12 Patienten mit ER und bei 12 Patienten mit LNR durchgeführt Die Validierung der differentiell regulierten Proteine erfolgte mit ELISA. Nach Durchführung einer Poweranalyse erfolgte eine zusätzliche Validierung in einem unabhängigen Kollektiv.

Resultate: Im Urinproteom von Patienten mit late-/non-recovery waren folgende Proteine hochreguliert: apolipoprotein D, α -1-microglobulin, α -1 antitrypsin, CD 59, cathepsin D, insulin-like growth factor binding protein 7 (IGFBP-7), neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) und downreguliert war calreticulin.

Mit ELISA wurden die potentiellen Marker für Prognose bei diesen 24 Patienten validiert. NGAL und IGFBP-7 hatten die beste prognostische Stärke. Deswegen wurden sie nach Durchführung einer Poweranalyse in einem unabhängigen Kollektiv untersucht sowie bei gematchten Patienten ohne AKI.

Hohe Urinkonzentrationen von IGFBP-7 und NGAL am Tag 1 des AKI bei Patienten mit LNR konnte mit ELISA bestätigt werden. Außerdem konnten IGFBP-

7 und NGAL am Tag 1 des AKI die Mortalität, renale Erholung, und den Schweregrad des AKI voraussagen und waren mit der Dauer des AKI assoziiert. IGFBP-7 stellte sich als ein exakterer Prädiktor für das renale Outcome heraus als NGAL.

Konklusion: Wir haben mehrere Urin-Marker für die renale Prognose des AKI am Tag 1 mittels Proteomanalyse im Urin identifiziert. IGFBP-7 war auch in der unabhängigen Validierung mit ELISA der beste Marker für die renale Prognose beim AKI. Ausserdem konnte IGFBP-7 den Schweregrad des AKI sowie die Mortalität voraussagen. NGAL erwies sich ebenfalls als guter Marker für die Prognose, hatte aber eine schlechtere Performance als IGFBP-7.

Um die Rolle von Tryptophan und seinen Metaboliten beim AKI zu untersuchen und um neue Marker für die Prognose des AKIs zu identifizieren, haben wir eine weitere Studie durchgeführt. Wir haben bei kritisch kranken Patienten mit AKI den Urin an den ersten 3 Tagen mit Massenspektrometrie untersucht. Hintergrund dazu waren vorangehende Arbeiten, welche zeigten, dass das Hauptenzym zum Abbau von Tryptophan (IDO) mit dem Schweregrad der CKD korrelierte.

2.1.3 Kynureninsäure im Urin ist ein prognostischer Marker des akuten Nierenschadens

Aregger F, Uehlinger DE, Fusch G, Bahonjic A, Pschowski R, Walter M, Schefold JC.

Increased urinary excretion of kynurenic acid is associated with non-recovery from acute kidney injury in critically ill patients.

BMC Nephrol 2018; 19(1):44. <https://doi.org/10.1186/s12882-018-0841-5>

Hintergrund: Fehlende Erholung vom AKI ist mit einer eingeschränkten Langzeitprognose assoziiert^{43,44}. Unterschiedliche Biomarker wurden bezüglich ihrer prognostischen Stärke beim AKI im Urin und Blut untersucht, wie IGFBP-7, tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2), NGAL und Zytokine^{45,46}.

Tryptophan wird durch das Enzym Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) sowie zu einem kleineren Teil durch 2,3 Dioxygenase (TDO) abgebaut⁴⁷. Der Quotient von Kynurenin/Tryptophan ist ein Marker für die IDO Aktivität. In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die IDO-Aktivität bei CKD mit zunehmendem Schweregrad ansteigt, sodass diese ein Marker für den CKD Schweregrad ist⁴⁸. Ziel der Studie war die Analyse des Tryptophanmetabolismus und der IDO Aktivität beim frühen AKI.

Methode: Wir haben Tryptophan und seine Metabolite im Urin von 92 Patienten auf Intensivstation am Tag 1, 2 und 3 des AKI mittels Massenspektrometrie gemessen.

Resultate: 67 der 92 Patienten haben sich innerhalb einer Woche vom AKI erholt (ER) und 25 haben sich nicht erholt (LNR). Patienten ohne frühe Erholung benötigten häufiger Dialyse, Bluttransfusionen, waren länger im Krankenhaus und auf Intensivstation und hatten eine höhere 30-Tage Mortalität.

Der beste prädiktive Marker im univariaten Modell für die fehlende Erholung am Tag 1 war eine hohe Ausscheidung von Kynureninsäure im Urin (Kynurenic Acid, KynA). Multivariate logistische Analysen ergaben, dass am Tag 1 KynA und SOFA (sequential organ failure assessment, SOFA) score die besten Prädiktoren für die fehlende Erholung waren. Am Tag 1 betrug die Fläche unter der ROC-Kurve (AUC) von KynA 0.72 für Erholung. Am Tag 3 mit Hinzunahme des SOFA Scores stieg die AUC auf 0.93.

Konklusion: KynA war in unserer Untersuchung der beste Prädiktor für die renale Prognose beim AKI. Bereits am ersten Tag des AKI konnte KynA die renale Prognose voraussagen. Mit Hinzunahme von klinischen Scores sowie von Urinanalysen zu einem späteren Zeitpunkt konnte die renale Erholung exakter vorausgesagt werden. KynA wurde vor vielen Jahren von der EuTOx-Gruppe als urämisches Toxin vorgeschlagen, da die Serumkonzentration bei fortgeschrittener CKD deutlich erhöht ist⁴⁹. Die Ursache der erhöhten KynA Konzentration im Urin bleibt unklar. Möglich ist ein unterschiedliches tubuläres Handling des frei filtrierte KynA. Eine erhöhte Aktivität vonIDO bei AKI Patienten konnten wir nicht nachweisen.

Wir haben uns außerdem mit der Inzidenz des AKI nach Aortenklappenersatz beschäftigt. Durch die Etablierung von TAVI als neue Therapieform der schweren Aortenstenose wurden neu bisher inoperable Patienten behandelt. In den ersten Jahren war völlig unklar, wie die Inzidenz des AKI nach TAVI ist und welche Risikofaktoren dieses begünstigen. Um diese Fragen zu klären, haben wir retrospektiv die Daten von fast 60 Patienten analysiert.

2.1.4 Akuter Nierenschaden nach perkutanem Aortenklappenersatz: Inzidenz, Risikofaktoren, Prognose

Aregger F, Wenaweser P, Hellige GJ, Kadner A, Carrel T, Windecker S, Frey FJ.

Risk of acute kidney injury in patients with severe aortic valve stenosis undergoing transcatheter valve replacement.

Nephrol Dial Transplant 2009;24(7): 2175-2179.

<https://doi.org/10.1093/ndt/gfp036>

Hintergrund: Im Jahr 2002 wurde erstmalig transkutan eine künstliche Aortenklappe implantiert (transcatheter aortic valve implantation, TAVI)⁵⁰. Diese weniger invasive Methode ist besonders wertvoll bei Patienten mit sehr hohem Operationsrisiko. Eine systematische Analyse des renalen Outcomes war unbekannt. Ziel der Arbeit war die Analyse des renalen Outcomes nach TAVI sowie die Identifikation von Risikofaktoren für ein AKI.

Methode: In dieser Beobachtungsstudie wurden 54 Patienten mit erfolgreicher TAVI Implantation untersucht.

Resultate: Die Nierenfunktion verbesserte sich nach Klappenersatz bei 56% der Patienten, sie verschlechterte sich bei 39% und blieb unverändert bei 6%. Die Inzidenz des AKI betrug 28% und postinterventionell benötigten 7 % aller Patienten ein Nierenersatzverfahren. Risikofaktoren für die Entwicklung eines AKI waren der transapikale Zugang, die periinterventionelle Thrombopenie, die Anzahl der transfundierten Erythrozytenkonzentrate und die Konzentration von CRP am Tag 1. Das Volumen der applizierten Kontrastmittelmenge war nicht unterschiedlich bei den Patienten mit und ohne postinterventionellem AKI. Die Mortalität war 7% bei Patienten ohne und 50% bei Patienten mit AKI.

Konklusion: Die Nierenfunktion ist bei mehr als der Hälfte der Patienten besser nach Beheben der Aortenstenose. Wir konnten mehrere Risikofaktoren für das Auftreten eines AKIs identifizieren, wie den transapikale Zugang, das Auftreten einer Inflammation mit erhöhtem CRP oder erniedrigter Thrombozytenzahl sowie die Transfusion von Erythrozyten. Ein periinterventionelles AKI führt zu einer deutlich höheren Mortalität.

Die Erkenntnisse neuer Ursachen und Pathomechanismen der Aortendilatation beim Marfansyndrom und bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappen haben uns begeistert. Um weitere Ursachen der Aortendilatation zu identifizieren, haben wir unsere bekannte Methode DIGE an der Aortenwand bei diesen Patienten angewandt.

2.2 **Marfan Syndrom**

2.2.1 **Proteomische Analysen der aortalen Media führen zum Nachweis erhöhter Calpain 2 Aktivität bei Patienten mit Marfan-Syndrom und bicuspiden Aortenklappe**

Pilop C*, **Aregger F***, Gorman RC, Brunisholz R, Gerrits B, Schaffner T, Gorman JH 3rd, Matyas G, Carrel T, Frey BM.

Proteomic analysis in aortic media of patients with Marfan syndrome reveals increased activity of calpain 2 in aortic aneurysms.

Circulation 2010; 120(11): 983-91.

<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.843516>

(*Geteilte Erstautorenschaft)

Hintergrund: Das Marfansyndrom (MFS) ist durch eine Mutation im Fibrillin-1 Gen bedingt¹⁷. Das klinische Bild bei Marfan Patienten variiert; kardiovaskuläre, skeletale und okuläre Veränderungen sind am häufigsten. Das Aortenaneurysma und die Aortendissektion sind lebensbedrohlich. Bei der Aneurysmenbildung spielen Fibrillin-1, TGF-beta, Angiotensin II und multiple Proteasen eine wesentliche Rolle^{19-21,51}. Patienten mit bicuspiden Aortenklappe wurden ebenfalls in die Studie eingeschlossen, da sie gehäuft Aortenaneurysmen entwickeln, deren Genese nicht vollständig geklärt ist.

Ziel der Studie war es, neue Erkenntnisse darüber zu erhalten, welche Faktoren in der Pathogenese der Aortendilatation beim MFS eine Rolle spielen.

Methode: Wir haben mittels DIGE die Tunica Media bei Patienten mit Marfan Syndrom verglichen mit jenem von Kontrollen. Kontrollpatienten waren Patienten mit chirurgischem Aortenklappenersatz mit tricuspiden Klappe sowie Organspender. Um mögliche Blutkontaminationen zu reduzieren und um die Aortenschicht von grösstem Interesse zu analysieren, haben wir uns auf die Analyse der Aortenmedia beschränkt.

DIGE wurde durchgeführt bei der Aortenmedia von 6 Patienten mit MFS und 6 Kontrollen. Im Rahmen der Validierung haben wir die Tunica Media von 22 MFS Patienten, 9 Patienten mit bicuspiden Aortenklappe sowie 15 Kontrollpatienten mit Western Blot untersucht.

Resultate: Hochreguliert beim MFS war myosin-10, vinculin, filamin A, microfibril-associated glycoprotein 4 und calpoinin. Downreguliert waren vitamin-D binding protein, fructose-biphosphate aldolase C, apolipoprotein A-1, serum amyloid A, transgelin, hemoglobin β und α Ketten.

Filamin A war nicht als gesamtes Protein im Gel nachweisbar sondern lediglich als Fragment. Der Nachweis einer vermehrten Fragmentierung von einem 90kD und einem 110kD großen Filamin Fragment konnte mit Western Blot bei MFS und Patienten mit bicuspidaler Aortenklappe bestätigt werden.

Konklusion: Wir haben eine Hochregulation von zwei Filamin-Fragmenten in der Aorta von MFS Patienten sowie bei Patienten mit bicuspidaler Aortenklappen identifiziert und validiert. Die drei wichtigsten Enzyme, welche Filamin fragmentieren, sind calpain 2, caspase 3 und granzyme B. Wir konnten durch den Nachweis erhöhter Spaltprodukte von Spectrin eine erhöhte Aktivität von calpain 2 feststellen, da Spectrin das endogene Substrat von Calpain 2 ist. Eine erhöhte Aktivität der beiden anderen Proteasen (caspase 3 und granzyme B) konnten wir hingegen nicht feststellen.

Eine erhöhte Aktivität von Proteasen sind bekannte Promotoren für die Dilatation der Aorta. Proteomanalysen, wie DIGE, ermöglichen die Identifikation von differentiell regulierten Proteinen sowie die Identifikation von posttranslationalen Modifikationen.

3. Diskussion

Der Fokus unserer Arbeit lag darin, Erkrankungsmechanismen zu verstehen, Risikofaktoren für Erkrankungen zu identifizieren sowie frühzeitig die Prognose von Erkrankungen voraussagen zu können. Um klinische Fragestellungen beantworten zu können, ist einerseits die exakte Charakterisierung von Patientenkollektiven elementar, andererseits aber auch die Anwendung von sensitiven, analytischen Methoden. Dies hat in der Vergangenheit zu wichtigen Erkenntnissen geführt^{52,53}.

Durch die Anwendung der Gelelektrophorese ergab sich die Möglichkeit, ergebnisoffen neue Markerproteine zu identifizieren. Mit ergebnisoffen ist gemeint, dass die Gesamtheit der im Biomaterial enthaltenen Proteine analysiert wird ohne vorherige Selektion. Es werden nicht nur bekannte Markerproteine bestimmt, sondern alle durch die Methode nachweisbaren Proteine. Der große Vorteil dieser sehr aufwändigen Methoden ist es, neue Biomarker zu identifizieren und neue Erkenntnisse über pathophysiologische Vorgänge zu erhalten.

Proteomanalysen beim akuten Nierenschaden zur

Identifikation von operationsinduzierten Stressoren durch Analyse des Urinproteoms vor und nach herzchirurgischen Operationen

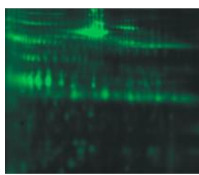
Der akute Nierenschaden nach herzchirurgischen (CS) Operationen ist eine gut bekannte und häufige Komplikation. Die Inzidenz des CS-induzierten AKI wird zwischen 10-30%^{40,41} beschrieben; 1-2% der Patienten benötigen ein NEV⁴². Die Mortalität ist abhängig vom Schweregrad des AKI und liegt bei „Risk“ um 5% und steigt bei „Failure“ auf bis zu 40%^{54,55}. Aufgrund der vermeintlich einfachen Pathogenese und des schon fast modellhaften Ablaufes mit Auftreten des AKI wenige Stunden bis 3 Tage nach Operation, ist es ein beliebtes Modell in der Erforschung des AKI. Nach genauerer Betrachtung ist das CS-induzierte AKI jedoch komplex und in einigen Bereichen noch nicht gut verstanden⁵⁶⁻⁵⁸. Viele Faktoren spielen dabei eine Rolle.

Es gibt keine systematischen histologischen Untersuchungen, um Erkenntnisse über die Pathogenese des CS-induzierten AKI zu erhalten. Dies liegt vor allem

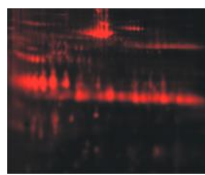
daran, dass das Blutungsrisiko bei diesen Patienten mit gewollter und ungewollter Gerinnungsveränderung durch eine Nierenbiopsie zu hoch ist. Aus nicht-invasiven Untersuchungen ergaben sich viele unterschiedliche Erkenntnisse über Pathomechanismen und Risikofaktoren für das CS-induzierte AKI. Als mögliche Auslöser gelten die präoperative Gabe von Kontrastmittel, nicht-steroidale Antirheumatika, toxische Schäden ausgelöst durch Hämolyse während des extrakorporalen Kreislaufs, Hypotonie, Hypoxie, Ischämie-Reperfusionsschaden, Embolisation, Inflammation und viele mehr⁵⁶⁻⁵⁸.

Ziel unserer Proteomarbeit war die Identifikation von differentiell regulierten Proteinen im Urin vor und nach CS, um Rückschlüsse auf renale Stressoren zu erhalten (Abbildung 3). Ausserdem haben wir den Urin am ersten postoperativen Tag zwischen Patienten mit und ohne AKI verglichen, um frühe Biomarker für das CS-induzierte AKI zu erhalten.

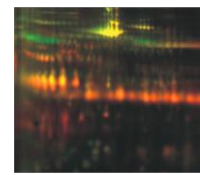
Proteomanalyse des Urins vor und nach herzchirurgischen Operationen (CS)



Urin vor CS



Urin nach CS



Bildüberlagerung vor/nach CS

Differentiell regulierte Proteine nach CS

Nach OP hochreguliert

ZAG
 AMBP
 Leichtketten
 Gelsolin
 Carbonic anhydrase 1

Leucin-rich-alpha-2 glycoprotein
 Retinol-binding protein
 Leucin-rich alpha-2 glycoprotein
 Mannan-binding lectin serine protease 2
 Basement-membrane specific HSPG

Nach OP downreguliert

Uromodullin

Abbildung 3: Schematische Darstellung des Proteomexperimentes im Urin zur Identifikation von operationsinduzierten Stressoren durch Analyse des Urinproteoms vor und nach herzchirurgischen Operationen.

Abbildung adaptiert von folgender Quelle: Aregger F, et al. J Thorac Cardiovasc Surg 2010; 692-700.

Postoperativ waren bei Patienten mit und ohne AKI Markerproteine für Inflammation hochreguliert (ZAG, Leucin-rich alpha-2-glycoprotein, Mannan-binding lectin serine Protease 2 und HSPG). Außerdem zeigten sich

Markerproteine für einen tubulären Schaden differentiell reguliert: AMBP und RBP waren postoperativ hochreguliert und Uromedullin war postoperativ vermindert. Herzchirurgische Operationen mit extrakorporalem Kreislauf induzieren bekannterweise ein SIRS⁵⁹. Proteine wie leucin-rich alpha-2-glykoprotein, mannan-binding-lectin serine protease 2, ZAG und basement-membrane-specific HSPG sind mögliche Marker für ein SIRS. Deren postoperative Hochregulation im Urin kann als Korrelat eines SIRS interpretiert werden.

Andere differentiell regulierte Proteine, wie RBP und AMBP, welches besser bekannt ist unter dem Namen α -1 microglobulin, sind gut bekannte Marker für einen tubulären Schaden^{60,61}. Es ist interessant, dass wir einen subklinischen Nierenschaden beobachtet haben im postoperativen Urin, auch bei Patienten, welche im weiteren Verlauf kein AKI entwickelt haben.

Eine vermehrte Ausscheidung von Markerproteine für einen tubulären Schaden beim AKI konnte in großen Arbeiten nach CS ebenfalls von anderen Gruppen beobachtet werden⁶²⁻⁶⁴. Die Gruppe um Mishra beobachtete nach CS einen Anstieg von NGAL im Urin bei Kindern mit AKI bereits zwei Stunden postoperativ, wo hingegen der Kreatininanstieg im Serum, welcher zur Diagnosestellung des AKI führte, erst 2-3 Tage später nachweisbar war⁶². Die gleiche Gruppe zeigte später erneut bei Kindern, dass die maximale Urinkonzentration von NGAL vier Stunden nach Operation besteht und danach wieder sinkt. Hingegen ist die Kinetik bei interleucin-18 (IL-18) langsamer mit einem ersten Anstieg nach vier Stunden und einem Peak zwölf Stunden postoperativ⁶³. Bei erwachsenen Patienten mit CS-induziertem AKI zeigte die Gruppe von Han in der Folge, dass sowohl NGAL, KIM-1 als auch N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) postoperativ zu unterschiedlichen Zeitpunkten in maximaler Konzentration im Urin nachweisbar sind⁶⁴. Dies galt sowohl für Patienten mit als auch solche ohne AKI, wobei die Urinkonzentrationen der Markerproteine bei AKI Patienten deutlich höher waren. Somit scheinen die Biomarker eine unterschiedliche Ausscheidungskinetik zu haben, was wichtig ist, um mit dem Marker eine maximale Aussagekraft zu erreichen.

Einige der von uns identifizierten differentiell regulierter Proteine (AMBP, Leichtketten, RBP und Albumin) sind Liganden von Megalin und Cubilin⁶⁵. Diese Rezeptoren können filtrierte Proteine im proximalen Tubulus durch Endozytose rückresorbieren⁶⁶. Megalin-knockout bei Mäusen führt zum Ausscheiden relevanter Mengen von kleinmolekularen Plasmaproteinen im Urin⁶⁷. Ob bei

unseren Patienten eine veränderte Funktion von Megalin und Cubilin eine Rolle spielt bei der unterschiedlichen Exkretion dieser Proteine, bleibt indes unklar. Uromodulin, welches besser bekannt ist unter dem Namen seiner Erstbeschreiber Tamm und Horsfall, wurde in den 50er Jahren erstmals aus dem Urin isoliert⁶⁸. Es wird im aufsteigenden Teil der Henleschleife exprimiert. Obschon das Glykoprotein Uromodulin schon mehr als 60 Jahre bekannt ist, bleibt seine Funktion bisher noch weitgehend unklar⁶⁹. Die Downregulation von Uromodulin im Urin, welche wir in unserem DIGE Experiment beobachtet haben, ist in den letzten Jahren beim AKI bei kritisch kranken Patienten auch von anderen Gruppen beschrieben worden⁷⁰. In einem knock-out Modell bei Mäusen war der tubuläre Schaden nach Ischämie-Reperfusion grösser bei fehlender Expression von Uromodulin, sodass eine protektive Funktion des Proteins diskutiert wird⁶⁹. Neuere Studien bei Mäusen weisen auf eine Rolle Uromodulins bei der Erholung vom akuten Nierenschaden hin⁷¹. Weitere Studien sind notwendig, um die exakte Rolle von Uromodulin zu beleuchten.

Die Ursache für einige der postoperativ hochregulierten Proteine konnten wir bisher noch nicht erklären.

Wir haben außerdem ein DIGE Experiment mit dem postoperativen Urin von Patienten mit und ohne AKI durchgeführt. In diesen Untersuchungen waren nur einige Proteine differentiell reguliert. Hochreguliert war Albumin am 1. postoperativen Tag bei AKI Patienten und ZAG sowie ein Fragment von AMBP waren downreguliert.

ZAG ist ein 40 kilo Dalton (kD) großes Protein welches in Blut und Urin nachweisbar ist. ZAG, ein Glucocorticoid induziertes Protein, scheint eine Rolle bei der Tumorkachexie zu spielen und ist ein bekannter Tumormarker⁷². ZAG im Plasma ist erhöht bei Patienten mit AKI und CKD verglichen zu Patienten mit normaler Nierenfunktion⁷³. ZAG wird in der Niere vor allem im proximalen Tubulus exprimiert. Interessanterweise scheint ZAG bei der verminderten Proliferationsfähigkeit von älteren Nieren nach Ischämie-/Reperfusionsschaden eine Rolle zu spielen⁷⁴. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass der ZAG Knockout zu einer höheren Zellproliferation nach I-R-Schaden geführt hat, jedoch auch zu einer höheren Rate an Fibrose.

Diese neuen Daten weisen auf eine relevante Rolle von ZAG beim akuten Nierenschaden hin. Weitere Untersuchungen sind wichtig, um die Rolle von ZAG

genauer zu verstehen und um zu klären, ob ZAG potentiell ein Marker für die Erholung vom Nierenschaden ist.

Zu beachten ist, dass durch Proteomanalysen im Urin lediglich differentiell regulierte Proteine identifiziert werden können. Die Ursache dieser differentiellen Regulation kann durch das DIGE Experiment jedoch meist nicht geklärt werden. Dazu sind weitere Studien notwendig, um Rückschlüsse auf Pathomechanismen zu erhalten.

Zusammengefasst haben wir im Urin differentiell regulierte Proteine nach CS-Operationen gefunden, welche ein mögliches Korrelat von einem SIRS und einem subklinischen tubulären Schaden sind. Mehrere unserer differentiell regulierten Proteine sind Liganden von Megalin und Cubilin. Ob diese Endozytose-Rezeptoren eine Rolle in der Pathogenese spielen, bleibt unklar. Die Downregulation von ZAG bei AKI Patienten konnten wir in einem größeren Kollektiv bestätigen. Die weitere Evaluation der Rolle von ZAG beim Ischämie-Reperfusionsschaden ist von großem Interesse.

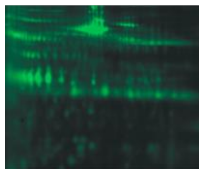
Identifikation von Markern für Prognose beim akuten Nierenschaden bei kritisch kranken Patienten

Der akute Nierenschaden ist häufig bei kritisch kranken Patienten und hat eine hohe Mortalität um 30 bis 80%³⁻⁶. Obschon das AKI auf Intensivstation häufig ist, fehlen exakte Daten bezüglich seiner Aetiologie. Aufgrund der hohen Morbidität und des hohen Risikos für Blutungen gibt es keine systematischen histologischen Studien. Mögliche Auslöser für den Nierenschaden werden in der Arbeit von Uchino mit folgenden beitragenden Faktoren beschrieben: 48% Sepsis, 34% große Chirurgie, 27% kardiogener Schock, 26% Hypovolämie, 19% medikamenteninduziert, 6% hepatorenal und 3% Obstruktion³.

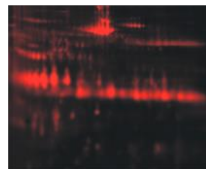
Daten der letzten 10 Jahre zeigen nun, dass das AKI auch langfristig eine negative Konsequenz hat. Ein AKI ist mit einer erhöhten Langzeitmortalität assoziiert⁷⁵⁻⁷⁶, und mit einem erhöhten Risiko, an einer CKD zu erkranken, oder chronisch dialysepflichtig zu werden¹¹. Eine fehlende Erholung vom AKI führt zu einem verminderten Langzeitüberleben^{75,76}. Deswegen ist eine frühe Voraussage der renalen Prognose von großem Interesse.

Wir haben mit unserer Proteomanalyse des Urins am ersten Tag des AKI mehrere Proteine identifiziert, welche unterschiedlich reguliert waren bei Patienten mit später Erholung vom AKI (LNR) verglichen zu jenen mit früher Erholung (ER) (Abbildung 4).

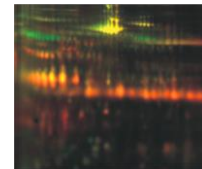
Proteomanalyse des Urins zur Identifikation von Markern für Prognose des AKI



Urin bei früher Erholung



Urin bei später Erholung



Bildüberlagerung frühe/späte Erholung

Differentiell regulierte Proteine bei schlechter Prognose

Hochreguliert

Apolipoprotein D
 α -1 Microglobulin
 α -1 Antitrypsin
 CD 59

Cathepsin D
 IGFBP-7
 NGAL

Downreguliert

Calreticulin

Abbildung 4: Schematische Darstellung des Proteomexperimentes im Urin zur Identifikation von Marker für Prognose des AKI am ersten Tag des AKI

Abbildung adaptiert von folgender Quelle: Aregger F, et al.⁷⁷

Hochreguliert bei Patienten mit später Erholung waren Apo D, α -1 microglobulin, α -1 antitrypsin, CD 59, cathepsin D, insulin-like growth factor binding protein 7 (IGFBP-7), neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) und runterreguliert war calreticulin. Wir haben diese Proteine in der Folge mit einer zweiten Methode beim gleichen Kollektiv validiert. Dazu haben wir ELISA sowie Nephelometrie eingesetzt. Die beste Performance in der Validierung ergab sich für IGFBP-7, sodass dieses Protein zusammen mit NGAL, welches bis dahin als bester untersuchter Biomarker beim AKI galt, für die Validierung in einem unabhängigen Kollektiv gewählt wurden. Die Anzahl Patienten für die unabhängige Validierung ergab sich durch die Poweranalyse. Ausserdem haben wir 12 Patienten mit vergleichbarem Krankheitsscores (SOFA und APACHE score) ohne AKI als Kontrollgruppen analysiert. Erneut zeigte sich eine signifikante Hochregulation von IGFBP-7 bei Patienten mit fehlender Erholung vom AKI und zu einem geringeren Grad auch von NGAL. Die Fläche unter der receiver

operating characteristic (ROC)-Kurve, um die Erholung am 1. Tag des AKIs vorauszusagen, war bei IGFBP-7 0.77 (95% CI 0.65-0.9, $p < 0.001$). Die Urinmarker haben nicht nur die Erholung vorausgesagt sondern auch den Schweregrad des AKI, die Dauer des AKI sowie die Mortalität.

Während der Revision unserer Arbeit ist eine große Multizenterstudie publiziert worden, in welcher gezeigt wurde, dass IGFBP-7 alleine sowie zusammen mit TIMP-2 neue Biomarker für die frühe Diagnose des AKIs sind⁷⁸. In dieser Studie wurden Patienten eingeschlossen, welche kritisch krank waren und einen Risikofaktor für ein AKI hatten. Bei Aufnahme auf die Intensivstation wurden unterschiedliche neue sowie bekannte Urin- sowie Plasmabiomarker bestimmt und im Verlauf evaluiert, welche das später nachweisbare AKI am besten frühzeitig erkennen können. Die Identifikation neuer Biomarker erfolgte dabei durch einen hypothesenbasierten Medline Search. Die zwei besten Marker zur frühen Erkennung eines AKIs waren dabei IGFBP-7 sowie TIMP-2.

Die Multiplikation der Konzentration beider Proteine (TIMP-2*IGFBP-7) wurde in der Folge als NEPHROCHECK™ patentiert. Im Jahr 2014 wurde NEPHROCHECK™ von der FDA als Biomarker zugelassen zur frühzeitigen Identifikation eines AKI. Seither sind viele Studien zur weiteren Analyse von IGFBP-7 und TIMP-2 beim AKI publiziert worden⁷⁹⁻⁸⁹. NEPHROCHECK™ zeigte sich als ein robuster Test mit minimalen Interferenzen und guter Stabilität⁷⁹. TIMP-2*IGFBP-7 steigen bereits vier Stunden nach renalem „Hit“ an und sinken nach 24 Stunden bereits wieder⁸⁰. Viele Arbeiten belegen, dass TIMP-2*IGFBP-7 im Urin frühzeitig ein AKI voraussagen kann. Dies wurde unter anderem bei Patienten nach großer Chirurgie gezeigt⁸¹, bei Patienten mit Sepsis auf Intensivstation⁸² sowie pädiatrischen Patienten nach Herzchirurgie⁸³. Höhere Konzentrationen von TIMP-2*IGFBP-7 sind mit einem ausgeprägteren Nierenschaden assoziiert⁸² sowie mit Dialysepflichtigkeit und erhöhter Mortalität nach 9 Monaten⁸⁴. Die Urinkonzentration von IGFBP-7 ist auch bei anderen renalen Erkrankungen erhöht, wie bei Patienten mit signifikanter Nierenarterienstenose verglichen zu Patienten mit essentieller Hypertonie⁸⁵. Ausserdem scheinen TIMP-2 sowie IGFBP-7 eine mögliche Rolle bei der Voraussage von verspäteter Nierentransplantationsfunktion (delayed graft function) zu spielen⁸⁶. Einige Studien haben auch weniger gute Resultate dieser Biomarker beschrieben, wie fehlende Voraussage eines AKI bei Patienten auf Intensivstationen⁸⁷ sowie schlechtere Performance bezüglich Voraussage der Dialysepflichtigkeit verglichen

zu anderen Markern und vor allem zum Furosemid-Stresstest⁸⁸. Insgesamt weisen aber viele Daten darauf hin, dass TIMP-2 und IGFBP-7 vielversprechende frühe Marker für ein AKI sowie Marker für schlechtes Outcome wie Dialysepflichtigkeit und Tod sind.

Die exakten Pathomechanismen, welche zu höherer Urinausscheidung von IGFBP-7 und TIMP-2 führen, waren bis vor kurzem unklar. IGFBP-7 spielt eine Rolle bei der Proliferation von Zellen, Apoptose und Alterung⁸⁹. Ausserdem scheint IGFBP-7 die Zellkinetik zu verändern, sodass die Zellen eher in der G1-Phase verbleiben. Mehrere Autoren haben postuliert, dass die differentielle Regulation von TIMP-2 und IGFBP-7 beim AKI im Zusammenhang mit Zellzyklus-Arrest stehen könnten⁹⁰. In einer kürzlich publizierten Arbeit konnte keine erhöhte Expression von IGFBP-7 oder TIMP-2 mRNA nach ischämischem oder toxischem AKI bei Ratten nachgewiesen werden⁹¹. Indes zeigten immunohistochemische Untersuchungen den Verlust von IGFBP-7 und TIMP-2 in geschädigten proximalen Tubuli. Außerdem konnten die Autoren zeigen, dass durch kompetitive Hemmung der Endozytose bei nierengesunden Tieren die Proteine in 3mal höheren Konzentrationen im Urin messbar waren. Somit scheint die erhöhte Ausscheidung von IGFBP-7 und TIMP-2 beim AKI durch proximal tubuläre Verluste und verminderte renale Rückresorption/Endozytose bedingt zu sein.

Zusammengefasst haben wir durch Proteomanalysen mehrere neue Marker für die renale Prognose beim AKI identifiziert. IGFBP-7, identifiziert durch Proteomanalyse, hatte die beste Performance zur Voraussage der renalen Prognose. IGFBP-7 sowie NGAL haben am ersten Tag des AKI den Schweregrad und die Dauer des AKI vorausgesagt sowie die Mortalität.

Analyse des Tryptophanmetabolismus beim akuten Nierenschaden

In einer zweiten Studie bei AKI Patienten auf Intensivstation haben wir Tryptophan und seine Metabolite zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen. Vorangehende Studien haben darauf hingewiesen, dass die Aktivität von IDO, dem wichtigsten Enzym im Abbau von Tryptophan, bei CKD mit zunehmendem Schweregrad ansteigt⁴⁸. Ziel der Studie war, die Rolle von Tryptophan und seinen Metaboliten beim AKI und der Prognose des AKIs zu klären.

Dazu haben wir Urinproben an den ersten 3 Tagen des AKI untersucht und die Tryptophanmetabolite bestimmt. Wir haben die Urinproben auch am Tag 2 und 3 des AKIs analysiert, um Rückschlüsse über die Kinetik der Metabolite zu erhalten. Wir haben die Konzentrationen von Tryptophanmetaboliten im Urin von 67 Patienten mit früher renaler Erholung (ER) verglichen mit der von 25 Patienten ohne frühe Erholung (LNR). Tryptophan und seine Metabolite haben wir mittels Massenspektrometrie gemessen. Patienten mit LNR hatten einen ausgeprägteren Nierenschaden mit längerer Dauer des AKI und benötigten häufiger ein Nierenersatzverfahren. Jedoch war am Tag 1 des AKI die Kreatininkonzentration zwischen ER und LNR nicht unterschiedlich. Am 1. Tag des AKI war KynA signifikant hochreguliert bei LNR Patienten wie auch der Quotient von KynA/Trp. Diese Hochregulation war konsistent und prägte sich zunehmend an den Tagen 2 und 3 aus. Alle anderen bestimmten Metabolite waren niedriger bei LNR Patienten, wobei diese verminderten Konzentrationen erst am 3. Tag des AKIs signifikant wurden. Mit ROC Analysen haben wir die prognostische Performance der Metabolite analysiert. Erneut zeigte sich, dass KynA die Erholung vom AKI gut voraussagen konnte. Wenn wir zusätzlich klinische Parameter in der ROC Analyse berücksichtigt haben, so war die AUC von KynA am Tag 1 0.73 und am Tag 3 0.93 und die AUC von KynA/Trp war am Tag 1 0.76 und am Tag 3 0.95. Auch in multivariaten Modellen zeigte sich, dass die Urinausscheidung von KynA der beste prognostische Faktor für die Erholung der Nierenfunktion in der ersten Woche ist. Ausserdem konnte durch die Bestimmung von KynA sowie der Ratio von KynA/Trp die Mortalität am ersten Tag des AKI vorausgesagt werden.

Tryptophan ist eine essentielle Aminosäure, die durch Indolamine 2,3 dioxygenase (IDO) und zu einem geringeren Ausmass durch tryptophan 2,3 dioxygenase metabolisiert wird. In der Literatur ist eine erhöhte IDO-Aktivität bei CKD beschrieben worden mit Nachweis erhöhter Serumkonzentration von Tryptophan und seinen Metaboliten in Abhängigkeit vom Schweregrad der renalen Erkrankung⁴⁸. Eine unterschiedliche IDO-Aktivität bei Patienten mit oder ohne frühe Erholung konnten wir bei unseren intensivpflichtigen AKI Patienten nicht feststellen. Da wir keine Kontrollpatienten ohne AKI untersucht haben, bleibt jedoch unklar, ob sich die IDO Aktivität beim AKI verändert. Hingegen haben wir eine konsistent erhöhte Ausscheidung von KynA bei Patienten mit schlechter renaler Prognose gefunden. Erneut bleibt bei solch analytischen

Studien unklar, wie der Mechanismus der erhöhten Ausscheidung von KynA und KynA/Trp bei AKI Patienten mit schlechter Prognose ist. Die erhöhte Serumkonzentration von KynA bei dialysepflichtigen Patienten ist mehrmalig mit unterschiedlichen Methoden nachgewiesen worden^{92,93}. Die Arbeitsgruppe der EuTox hat KynA auch als mögliches urämisches Toxin vorgeschlagen⁴⁹. Interessanterweise haben wir bei AKI-Patienten mit schlechtem Outcome im Urin eine hohe KynA sowie KynA/Trp Konzentration gemessen obwohl die Nierenfunktion zu diesem Zeitpunkt nicht unterschiedlich war von den ER Patienten. Weitere Studien zur Klärung des Mechanismus dieser erhöhten KynA Ausscheidung bei Patienten mit schlechter renaler Prognose sind notwendig.

Unsere Patienten mit LNR hatten einen ausgeprägteren Nierenschaden (höhere RIFLE-Klassen), längere Dauer des AKI, benötigten häufiger ein Nierenersatzverfahren und Bluttransfusionen, waren länger im Krankenhaus und hatten eine höhere 28-Tage Mortalität. Die Assoziation zwischen fehlender Erholung und schlechter Prognose ist in der Literatur mehrmals beschrieben worden⁷⁵⁻⁷⁶. Bisher gab es jedoch keine uniforme Definition der Erholung. Die ADQI-Gruppe (acute dialysis quality initiative), welche im Jahr 2004 die RIFLE-Klassifikation vorgeschlagen hatte, beschrieb die Erholung als die fehlende Klassifikation für ein AKI⁷. Die exakte Zeitspanne dafür blieb bisher unklar. In unserer Arbeit bei Patienten mit sehr hoher Mortalität haben wir eine relativ kurze Zeitspanne von 7 Tagen gewählt. Nun hat die ADQI vor knapp 2 Jahren eine einheitliche Definition zum Verlauf des AKI vorgeschlagen⁹⁴. ADQI beschreibt neu ein Kontinuum des Nierenschadens nach ursprünglichem Insult. Dabei schlägt die ADQI vor, das AKI mit schneller Erholung innerhalb von 48 Stunden als „rapid reversal“ zu bezeichnen. Ein AKI mit einer Dauer von bis zu 7 Tagen bleibt weiterhin ein AKI. Wenn es zu keiner Erholung kommt, so schlägt ADQI vor, dies acute kidney disease (AKD) zu nennen. Bei fehlender Erholung des AKD nach 3 Monaten erfolgt der Wechsel vom AKD zur CKD. Dies widerspiegelt, dass ein akuter Nierenschaden in eine chronische Nierenerkrankung übergehen kann. Diese vorgeschlagene Terminologie ist allerdings nicht unumstritten.

Wir haben in unserer Studie eine Beobachtungszeit von einer Woche gewählt, lange bevor ADQI die neuen Vorschlägen zur Definition der Erholung publiziert hat. Diese Beobachtungszeit von einer Woche ist genau jene welche AKI und

AKD unterscheidet. Somit haben wir (primär unwillentlich) in unserer Arbeit Tryptophan und seine Metabolite zwischen AKI und AKD verglichen sowie diese beiden Gruppen klinisch charakterisiert. Wie erwartet, haben Patienten mit einem AKD eine deutlich schlechtere renale und nicht renale Prognose verglichen zu Patienten mit AKI.

Evaluation der Inzidenz und der Prognose des akuten Nierenschaden nach perkutanem Aortenklappenersatz sowie die Identifikation von Markern für eine schlechte Prognose

Die Aortenstenose ist das häufigste Vitium im hohen Alter. Im Jahr 2002 wurde erstmalig der Transkatheter-Aortenklappenersatz (TAVI) beschrieben⁵⁰. Diese weniger invasive Methode machte den Aortenklappenersatz nun auch bei schwer kranken Patienten möglich, welche bis dahin als inoperabel galten. Die Inzidenz des AKI war in den ersten Jahren nach Einführung von TAVI nicht bekannt. Ziel unserer Studie war die Erfassung der Inzidenz des AKI nach TAVI sowie die Charakterisierung dieser Patienten.

Wir untersuchten ein Kollektiv von 54 konsekutiven Patienten mit TAVI. Die Inzidenz des AKI betrug 27%. Postinterventionell benötigten 7% aller Patienten ein Nierenersatzverfahren. Bei 30 von 54 Patienten verbesserte sich die GFR nach Behebung der Aortenstenose, bei 21 von 54 verschlechterte sich die GFR und bei den restlichen Patienten kam es zu keiner Veränderung. Univariate Regressionsmodelle wiesen auf einen Zusammenhang mit dem transapikalen Zugang, periinterventioneller Thrombopenie, Bluttransfusionen und erhöhtem CRP am Tag 1 nach TAVI hin.

Mehrere folgende Studien mit grösseren Patientenkollektiven ergaben ähnliche Inzidenzen für das AKI um 12-21%⁹⁵⁻⁹⁷. In einer größeren Arbeit mit über 200 Patienten nach TAVI konnte bestätigt werden, dass sich die Nierenfunktion bei etwa 60% der Patienten nach Behebung der Aortenstenose verbessert⁹⁴. In den erwähnten Studien zeigten sich folgende Risikofaktoren für das AKI nach TAVI: vorbestehende Erkrankungen wie Hypertonie, PAVK, Herzinsuffizienz und CKD. Ausserdem waren transapikaler Zugang, maximale periinterventionelle Leukozytenzahl sowie Anzahl der Bluttransfusionen als Risikofaktoren ebenfalls nachgewiesen worden.

Eine Assoziation zwischen Bluttransfusionen und AKI wurde in vielen Arbeiten beschrieben. In einer Reviewarbeit aus dem Jahr 2012 wurden 22 Studien identifiziert, die sich mit diesem Thema beschäftigten⁹⁸. In 18 von 22 Studien ergaben sich Hinweise für eine Assoziation zwischen Transfusionen und AKI. Der kausale Zusammenhang ist bisher nicht geklärt. Möglich ist, dass Komorbiditäten und/oder Komplikationen, die zu Anämie und Bluttransfusionen führen, auch Risikofaktoren für ein AKI sind. Einige der Daten weisen jedoch auch darauf hin, dass Anämie-unabhängige Faktoren eine Rolle spielen und Transfusionen per se zu einem AKI führen können⁹⁹. Mögliche Mechanismen sind das Auftreten von Hämolyse aufgrund des Lagerungsschadens von Konserven mit Anstieg von Hämoglobin sowie freiem Eisen. Insgesamt bleibt aber der kausale Zusammenhang zwischen Transfusionen und AKI unklar.

Die Assoziation zwischen dem transapikalen Zugang mit höherem Risiko für ein AKI scheint jedoch kein kausaler zu sein^{95,97,100}. In den meisten Zentren werden Aortenklappen transfemoral gelegt. Bei ausgeprägter femoraler Arteriosklerose ist dies nicht möglich, sodass dann der apikale Zugang gewählt wird. Diesen Zusammenhang haben wir in unserer relativ kleinen Serie bereits feststellen können; spätere Studien konnten dies bestätigen^{95,97,100}. Ein weiterer Risikofaktor für das AKI nach TAVI ist das Auftreten eines SIRS. Wir haben beobachtet, dass eine pathologische Leukozytenzahl postinterventionell mit einem AKI assoziiert war. Die Gruppe um Sinning beschrieb ebenfalls die Assoziation eines SIRS mit einem AKI¹⁰¹. Bei 60% der AKI Patienten konnte die Gruppe ein SIRS beobachten. Unklar ist die Rolle des Kontrastmittels als Ursache des AKI. In unserer Arbeit konnten wir keinen Zusammenhang finden zwischen der Kontrastmittelmenge und dem Auftreten eines AKIs. Die publizierten Arbeiten sind widersprüchlich; die meisten Arbeiten berichten von einem Zusammenhang zwischen Kontrastmittelmenge und AKI^{95, 97,99,101}, jedoch beobachteten andere Gruppen, wie wir, keinen Zusammenhang¹⁰².

Zusammengefasst haben wir eine Verbesserung der Nierenfunktion bei einem großen Teil der Patienten nach TAVI beobachtet. Die Inzidenz des AKI war mit 27% hoch. Als mögliche Risikofaktoren für ein AKI haben wir ein SIRS, den transapikalen Zugang sowie die Transfusion von Erythrozyten erstmalig beschrieben. Diese Patientenpopulation bietet sich für weitere Studien zur Prädiktion des AKI durch Biomarker an.

In unserer Arbeit, welche sich mit operationsinduzierten Stressoren im Urinproteom bei Patienten mit CS beschäftigt, haben wir vor allem Patienten mit Bypass-Operationen untersucht. Das Validierungskollektiv beinhaltete auch Patienten mit Aortenklappenersatz. Bei einigen dieser Patienten war die Ursache der Aortenstenose das Bestehen einer bicuspiden Aortenklappe. Mit großem Interesse haben wir die neu entdeckten Pathomechanismen bei der Entstehung der Aortendilatation bei Patienten mit bicuspiden Aortenklappenersatz zur Kenntnis genommen¹⁷. Eine Reduktion von Fibrillin-1 wurde bei einigen dieser Patienten beobachtet in Kombination mit erhöhter Aktivität von Metalloproteinasen und konsekutivem Remodeling der Aortenwand. Zur gleichen Zeit gab es höchst beachtenswerte neue Erkenntnisse im Pathomechanismus der Aortendilatation beim Marfansyndrom²⁰. Aufgrund dieser bedeutenden neuen Erkenntnisse haben wir uns entschieden, die Aorta von Patienten mit Marfan Syndrom und bicuspiden Aortenklappe mit DIGE zu untersuchen, um potentielle neue Erkenntnisse im Mechanismus der Aortendilatation zu erhalten.

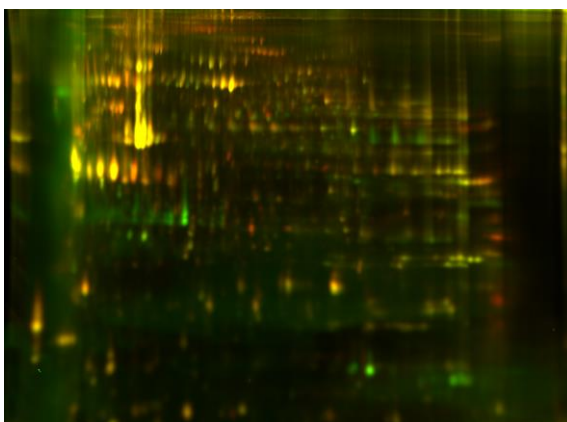
Proteomanalyse der aortalen Media beim Marfansyndrom zur Identifikation von Pathomechanismen für die Entstehung der aortalen Dilatation

Das Marfansyndrom (MFS) ist eine autosomal dominant vererbte Erkrankung welche zu kardialen, vaskulären, skelettalen und Augenveränderungen führt¹⁷. Gefürchtet ist die Aortendissektion, welche tödlich verlaufen kann. Die Diagnose wird durch festgelegte klinische Kriterien gestellt¹⁸. Die Mutation im Fibrillin-1 Gen ist hauptverantwortlich für das MFS aber auch Mutationen im TGF- β -Rezeptor führen zum Phänotyp des MFS^{17,19,23}. Es besteht eine ausgeprägte phänotypische Varianz bei Marfan Patienten. Der Mechanismus, der zur Gewebedilatation führt, blieb lange Zeit unklar und ist auch bis jetzt nicht abschließend geklärt. Verändertes Fibrillin scheint andere mechanische Eigenschaften zu besitzen, jedoch auch geringer TGF- β zu sequestrieren^{19,23}. TGF- β spielt eine große Rolle in der Aortendilatation. In einem Mausmodell konnte durch Blockierung von TGF- β die Aortendilatation verhindert werden²³. Eine wesentliche Rolle spielt aber auch Angiotensin II, welches beim Marfan Syndrom hochreguliert ist²⁰. Die Infusion von Angiotensin II führt zur Aortendilatation. Die Blockierung von Angiotensin II durch Losartan²³ führte bei

Marfan Patienten zu einem geringeren Fortschreiten der Aortendilatation. Bei der Aortendilatation scheinen aber auch Metalloproteinasen (MMP-2 und MMP-9) eine relevante Rolle zu spielen¹⁰³.

Die Assoziation zwischen bicuspidaler Aortenklappe und der Aortendilatation ist erstmalig im Jahr 1928 beschrieben worden¹⁰⁴. Viele Jahre wurde postuliert, dass hämodynamische Faktoren massgeblich für die Aortendilatation verantwortlich seien¹⁰⁵. Der exakte Mechanismus zwischen veränderter Klappenmorphologie und Aortendilatation blieb jedoch unklar. Neue Erkenntnisse weisen nun darauf hin, dass auch strukturelle Veränderungen an der Aortenwand mit zystischer Medianekrose und erhöhter Aktivität von MMPs eine relevante Rolle spielen^{106,107}. Um neue Erkenntnisse im Pathomechanismus der Aortendilatation zu erhalten, haben wir eine Proteomanalyse der Gefäßmedia durchgeführt. Um eine Kontamination durch Blutgefäße zu minimieren und um die Aortenwandanteile zu untersuchen, die beim MFS von grösster Bedeutung sind, haben wir die Aortenschichten getrennt und lediglich die Tunica Media für unser Experiment verwendet. Mit DIGE haben wir die aortale Media von Marfanpatienten verglichen mit jener von Patienten ohne Aortendilatation (Organspender oder Patienten mit tricuspidaler Aortenklappe mit Aortenoperation). Hochreguliert waren myosin-10-heavy chain, vinculin, filamin A, microfibril-associated glykoprotein 4, calponin 1. Runterreguliert waren bei Patienten mit MFS Vitamin-D binding protein, fructose-biphosphate-aldolase C, apolipoprotein A-I, serum amyloid P, transgelin, hemoglobin β and α -Ketten (Abbildung 5).

Proteomanalyse der aortalen Media bei Patienten mit Marfan Syndrom (MFS)



Differentiell regulierte Proteine beim MFS

Hochreguliert

Myosin-10
Vinculin
Filamin A
MFAP 4
Calponin 1

Downreguliert

Vitamin-D binding Protein
Fructose-biphosphate Aldolase C
Apolipoprotein A-I
Serum Amyloid-P
Transgelin
Hemoglobin β chain
Hemoglobin α chain

Bildüberlagerung des Aortenproteoms bei Patienten mit MFS verglichen zu Kontrollpatienten ohne Aneurysmen

Abbildung 5: Differentiell regulierte Proteine der aortalen Media bei Patienten mit MFS verglichen zu Kontrollpatienten ohne Aortenaneurysma.

Abbildung adaptiert von folgender Quelle: Pilop C, et al.¹⁰⁸

Von besonderem Interesse war für uns Filamin A, welches wir lediglich als C-terminales Fragment hochreguliert fanden und dessen Mutation bekannt ist als Ursache der familiären kardialen vaskulären Dystrophie¹⁰⁷. Eine hochregulierte Fragmentierung von Filamin A haben wir mit Western Blot sowohl bei den 22 Marfan Patienten als auch bei 9 Patienten mit bicuspide Aortenklappen bestätigen können. Calpain, caspase-3 und granzyme-B sind die bekannten Proteasen, welche Filamin A spalten. Bei unseren Patienten konnten wir keine erhöhte caspase 3 noch granzyme-B Aktivität nachweisen, jedoch eine erhöhte Aktivität von Calpain-2. Die Calpain-2 Aktivität haben wir bestimmt durch die Quantifizierung seines Substrates (Spectrin) und seiner Spaltprodukte (Spectrin-Fragmente). Außerdem haben wir eine ausgeprägte Korrelation zwischen der Filamin-A und Spectrin-Spaltung beobachtet, sodass wir von einer erhöhten Calpain-2 Aktivität bei Patienten mit Aortendilatation ausgehen.

Eine funktionelle Bedeutung von Calpainen bei der Aortendilatation ist nun durch verschiedene Untersuchungen bekräftigt worden. Calpain 1 und 2 scheinen eine Rolle bei der Angiotensin II induzierten Dilatation zu spielen¹⁰⁹. Eine erhöhte Filamin-Spaltung wurde nach Infusion von Angiotensin II in einem Mausmodell ebenfalls beschrieben¹⁰⁹. Die Angiotensin II Infusion führte bei diesen Calpain-1 defizienten Mäusen zu einer Aortendilatation. Die pharmakologische Hemmung von Calpain-1 verminderte die Angiotensin II induzierte Aortendilatation der abdominalen Aorta in einem Mausmodell mit LDL defizienten Mäusen¹¹⁰. Calpain-1 scheint auch beim Alterungsprozess eine Rolle zu spielen. Die Hochregulation von Calpain-1 und MMP-2 wurde bei außerdem beim Alterungsprozess in der Aorta von Ratten beobachtet¹¹¹.

Die 2D Gelelektrophorese hat verglichen zu anderen Proteomanalysen unterschiedliche Vor- und Nachteile. Ein wesentlicher Vorteil ist die Identifikation von posttranslationalen Modifikationen wie Fragmentierungen²⁷. In unserer Arbeit hat die Hochregulation eines Fragmentes darauf hingewiesen, dass die erhöhte Aktivität von Calpainen bei der Aortendilatation eine wesentliche Rolle spielt.

Zusammengefasst haben unsere Proteomanalysen der aortalen Media bei Patienten mit MFS oder bicuspiden Aortenklappe eine Hochregulation von Filamin-A Fragmenten ergeben. Die Ursache dieser Filamin-Fragmentation scheint in der erhöhten Aktivität von Calpainen zu liegen. Weitere Studien sind notwendig, um die Rolle von Calpainen beim Marfansyndrom besser verstehen zu können.

Biomaterial Urin

Es bleibt ein Traum vieler Wissenschaftler und Ärzte, durch die Analyse von Urin Diagnosen stellen und Rückschlüsse über die Prognose schliessen zu können. Die Urinschau, die in der Literatur bereits im 16. Jahrhundert beschrieben wurde, diente eben diesem Zwecke¹¹². Durch Inspektion des Urins mit Fokus auf Farbe und Konsistenz, durch Riechen und Schmecken wurden Rückschlüsse auf bestehende Erkrankungen geschlossen. Systematische Evaluation dieser Untersuchungen sind nicht publiziert. Mit dem großen Revival in der Proteinanalytik durch Proteomics ist dieser Traum wieder aufgelebt. Urin als biologisches Material hat viele Vorteile, aber auch einige Nachteile und Limitationen¹¹³. Ein großer Vorteil ist die einfache und komplikationslose Gewinnung. Die Urinanalytik bietet sich besonders bei Kollektiven mit hohem Risikoprofil an, wie bei kritisch kranken Patienten oder besonders schützenswerten Populationen wie Säuglingen und Kleinkindern. Weiterhin vorteilhaft ist, dass Urin als Filtrat des Plasmas Rückschlüsse auf nicht-renale Erkrankungen zulässt. Aufgrund des komplexen renalen Handlings der filtrierten Moleküle können auch Rückschlüsse über renale Erkrankungen gezogen werden. Urinproteine sind aufgrund der normalerweise geringen Proteinkonzentration relativ stabil, sodass sie bei korrekter Vorbehandlung bei -80° für relativ lange Zeit stabil sind¹¹⁴. Herausforderungen bei der Proteinanalytik im Urin sind die hohe intraindividuelle als auch die hohe interindividuelle Varianz. Die Diurese kann in Abhängigkeit von der Flüssigkeitszufuhr zwischen 100ml/24h und 10'000ml/24h variieren, was zu Konzentrationsunterschieden von bis zu Faktor 100 führen kann ohne dass relevante Pathologien bestehen. Diese große Varianz vermindert Sensitivitäten und Spezifitäten in Markerstudien und ist ein möglicher Grund, weswegen es das „renale Troponin“ bisher nicht gibt. Diese Limitation kann theoretisch durch Normalisierung der Proteinkonzentration zur

Kreatininkonzentration korrigiert werden. Jedoch belegen mehrere Arbeiten, dass bei fehlendem steady-state, wie dies bei akuten Nierenerkrankungen der Fall ist, sich auch die Kreatininausscheidung dynamisch verändert^{115,116}. Momentan ist nicht klar, ob eine Normalisierung sinnvoll ist und ob Kreatinin das optimalste Molekül zur Normalisierung ist.

Für die Gelelektrophorese ist Urin eine große Herausforderung. Zum einen ist die Konzentration von Proteinen im Urin normalerweise gering (< 150mg/l), gleichzeitig besteht eine hohe Konzentration von Salzen, was zu erschwerter Proteomtrennung besonderes in der IEF führt.

Um Gele mit hoher Spotanzahl (Trennung vieler unterschiedlicher Proteine) ohne Streifenbildung zu erhalten, ist eine optimierte Vorbehandlung des Urins von höchster Wichtigkeit. Wir haben viele publizierte Protokolle bei unseren Patienten angewandt und analysiert. Wir haben Urin dialysiert, filtriert mit einem Zentrifugationsdevice mit definiertem cut-off, Proteine gefällt mit Ethanol, Trichloracetic acid (TCA) und vieles mehr. Zu viele Vorbehandlungen haben jeweils zu Verlusten von Spots geführt. Inadäquate Elimination von Salz führte zu schlechter Gelqualität mit ausgedehnter horizontaler Streifenbildung. Die besten optischen Resultate mit bester Reproduzierbarkeit erhielten wir durch Fällung mit TCA. Dieses Protokoll haben wir erfolgreich in unseren Urinanalysen angewandt und konnten damit unsere Resultate mit einer zweiten unabhängigen Methoden auch weitgehend bestätigen.

4. Zusammenfassung

Wir haben mit unterschiedlichen Methoden den akuten Nierenschaden untersucht. Durch Analyse des Urins mit Proteomanalysen haben wir Urinmarker für die frühe Diagnosestellung eines AKI, für einen subklinischen Nierenschaden sowie neue Marker für die Prognose beim AKI identifiziert.

Wir konnten dabei im postoperativen Urin nach Herzchirurgie Marker für ein SIRS sowie für einen tubulären Schaden bei Patienten mit und ohne AKI identifizieren. Einige differentiell regulierte Proteine wurden auch von anderen Gruppen im gleichen Kontext beschrieben. Einige der differentiell regulierten Proteine konnten wir bisher nicht genau erklären. Bei Patienten mit postoperativem AKI haben wir eine Runterregulation von ZAG gefunden, welche wir mit ELISA bestätigen konnten. Die exakte Ursache dafür ist zwar unklar. Jedoch von

großem Interesse ist die mögliche Rolle von ZAG bei Proliferation und Regeneration nach Ischämie-Reperfusionsschaden, welcher in der Literatur beschrieben wurde.

Durch Proteomanalysen im Urin haben wir am ersten Tag des AKI Marker identifiziert für die weitere Prognose. Dies ist von besonderer Bedeutung, da eine fehlende Erholung vom AKI mit einer schlechteren renalen und nicht-renalen Langzeitprognose assoziiert ist. Die beste Performance ergab sich für IGFBP-7, welches wir erstmalig mit einer Proteomanalyse im Urin identifiziert haben. IGFBP-7 ist zwischenzeitlich einer der am besten untersuchten Marker für die frühe Diagnosestellung des AKI und ist in Kombination mit TIMP-2 von der FDA als Diagnosekit beim AKI zugelassen worden.

Um die Rolle vonIDO beim akuten Nierenschaden zu studieren, haben wir bei Patienten mit und ohne frühe Erholung an den ersten 3 Tagen eines AKI die Tryptophanmetabolite bestimmt. Dabei ergaben sich keine Hinweise für eine Rolle vonIDO bei der Prognose vom AKI. Jedoch konnten wir konsistent an den ersten 3 Tagen des AKI eine höhere Ausscheidung von KynA bei Patienten mit schlechter Prognose feststellen. Ob differentielles tubuläres Handling die Ursache dieser erhöhten KynA Ausscheidung ist, bleibt unklar.

Wir haben erstmalig die Inzidenz des AKI nach TAVI beschrieben. In unserer relativ kleinen Population war diese mit 28% hoch. Interessanterweise ergaben unsere Untersuchungen auch eine Verbesserung der Nierenfunktion bei mehr als der Hälfte der Patienten nach Behebung der Aortenstenose. Durch klinische Untersuchungen konnten wir mehrere Risikofaktoren für das Auftreten eines AKI nach TAVI identifizieren, wie ein SIRS, Bluttransfusionen sowie der transapikale Zugang.

In unserer Proteomarbeit der aortalen Media konnten wir eine Hochregulation von Filaminfragmenten bei Patienten mit MFS und bei Patienten mit bicuspidaler Aortenklappe nachweisen. Die Identifikation von posttranslationellen Modifikation, wie der von uns beschriebenen Fragmentierung von Filamin A, ist ein großer Vorteil der 2-D-Gelelektrophorese. Als Ursache dieser Fragmentierung konnten wir eine erhöhte Aktivität von Calpain 2 nachweisen. Weitere Untersuchungen zur Klärung der exakten Rolle von Calpain 1 und 2 sind von großer Wichtigkeit, um deren Rolle bei der Dilatation der Aorta besser zu verstehen und allfällig neue therapeutische Ansätze bei der Behandlung von Aortenaneurysmen zu erhalten.

5. Literaturverzeichnis

1. Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV. Acute renal failure. *N Engl J Med* 1996; 1448-1460.
2. Liano F, Pascual J. Epidemiology of acute renal failure: a prospective, multicenter, community-based study. Madrid Acute Renal Failure Study Group. *Kidney Int* 1996;811-818.
3. Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, et al. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *JAMA* 2005; 813–818.
4. de Mendonca A, Vincent JL, Suter PM, et al. Acute renal failure in the ICU: risk factors and outcome evaluated by the SOFA score. *Intensive Care Med* 2000; 915-921.
5. Metnitz PG, Krenn CG, Steltzer H, et al. Effect of acute renal failure requiring renal replacement therapy on outcome in critically ill patients. *Crit Care Med* 2002; 2051-2058.
6. Cosentino F, Chaff C, Piedmonte M. Risk factors influencing survival in ICU acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 1994; 179-182.
7. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, et al. Acute renal failure – definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) group. *Crit Care* 2004; R204-R212.
8. Susantitaphong P, Cruz DN, Cerda J, et al. World incidence of AKI: a meta-analysis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2013; 1482-1493.
9. Ricci Z, Cruz D, Ronco C. The RIFLE criteria and mortality in acute kidney injury: A systematic review. *Kidney Int* 2008; 538-546.
10. Hobson CE, Yavas S, Segal MS, et al. Acute kidney injury is associated with increased long-term mortality after cardiothoracic surgery. *Circulation* 2009; 2444-2453.
11. Coca SG, Singanamala S, Parikh CR. Chronic kidney disease after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Kidney Int* 2012; 442-448.
12. Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, et al. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care* 2007; 11(2):R31.

13. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Acute Kidney Injury Workgroup KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. *Kidney Int Suppl.* 2012; 1-138.
14. Stevens LA, Coresh J, Greene T, et al. Assessing kidney function – measured and estimated glomerular filtration rate. *N Engl J Med* 2006; 2473-2483.
15. Charlton JR, Portilla D, Okusa MD. A basic science view of acute kidney injury biomarkers. *Nephrol Dial Transplant* 2014; 1301-1311.
16. Alge JL, Arthur JM. Biomarkers of AKI: A review of mechanistic relevance and potential therapeutic implications. *Clin J Am Soc Nephrol* 2015; 147-155.
17. Robinson PN, Godfrey M. The molecular genetics of Marfan syndrome and related microfibrilopathies. *J Med Genet* 2000; 9-25.
18. Loeys BL, Dietz HC, Braverman AC, et al. The revised Ghent nosology for the Marfan syndrome. *J Med Genet* 2010; 476-485.
19. Neptune ER, Frischmeyer PA, Arking DE, et al. Dysregulation of TGF- β activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. *Nat Genet* 2003; 407-411.
20. Nagashima H, Sakomura Y, Aoka Y, et al. Angiotensin II type 2 receptor mediates vascular smooth muscle cell apoptosis in cystic medial degeneration associated with Marfan's syndrome. *Circulation* 2001; I282-I287.
21. Ikonomidis JS, Jones JA, Barbour JR, et al. Expression of matrix metalloproteinases and endogenous inhibitors within ascending aortic aneurysms of patients with Marfan syndrome. *Circulation* 2006; I365-I370.
22. Judge DB, Biery NJ, Keene DR, et al. Evidence for a critical contribution of haploinsufficiency in the complex pathogenesis of Marfan syndrome. *J Clin Invest* 2004; 172-181.
23. Habashi JP, Judge PD, Holm TM, et al. Losartan, an AT1 antagonist, prevents aortic aneurysm in a mouse model of Marfan syndrome. *Science* 2006; 117-121.
24. Brooke BS, Habashi JP, Judge DP, et al. Angiotensin II blockade and aortic root dilatation in Marfan's syndrome. *N Engl J Med* 2008; 2787-2795.

25. Fedak PW, De Sa MP, Verma S, et al. Vascular matrix remodeling in patients with bicuspid aortic valve malformations: implications for aortic dilatation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 797-806.
26. Graves PR, Haystead TA. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002; 39-63.
27. Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev* 1996; 19-50.
28. Wright PC, Noirel J, Ow SY, et al. A review of current proteomics technologies with a survey on their widespread use in reproductive biology investigations. *Theriogenology* 2012; 738-765.
29. Chandrasekhar K, Dileep A, Lebonah DE, et al. A short review on proteomics and its application. *Int Lett of Nat Sci* 2014; 77-84.
30. Brewis IA, Brennan P. Proteomics technologies for the global identification and quantification of proteins. *Adv Protein Chem Struct Biol* 2010; 1-44.
31. Klose J, Kobalz U. Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis* 1995; 1034-1059.
32. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry based proteomics. *Nature* 2003; 198-207.
33. Unlü M, Morgan ME, Minden JS. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 1997; 2071-2077.
34. Wiese S, Reidegeld KA, Meyer HE, et al. Protein labelling by iTRAQ: a new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. *Proteomics* 2007; 340-350.
35. Rabilloud T. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics* 2002; 3-10.
36. Görg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 2004; 3665-3685.
37. Lilley KS, Friedman DB. All about DIGE: quantification technology for differential display 2D-gel proteomics. *Expert Rev Proteomics* 2004; 401-409.

38. Candiano G, Bruschi M, Musante L, et al. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 2004; 1327-1333.
39. Karp NA, Lilley KS. Maximising sensitivity for detecting changes in protein expression: experimental design using minimal CyDyes. *Proteomics* 2005; 3105-3115.
40. Kuitunen A, Vento A, Suojaranta-Ylinen R, et al. Acute renal failure after cardiac surgery: evaluation of the RIFLE classification. *Ann Thorac Surg* 2006; 542-546.
41. Robert AM, Kramer RS, Dacey LJ, et al. Cardiac surgery-associated acute kidney injury: a comparison of two criteria. *Ann Thorac Surg* 2010; 1939-1943.
42. Rosner MH, Okusa MD. Acute kidney injury associated with cardiac surgery. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006; 19-32.
43. Swaminathan M, Hudson CC, Philips-Bute BG, et al. Impact of early renal recovery on survival after cardiac surgery-associated acute kidney injury. *Ann Thorac Surg* 2010; 1098-1104.
44. Pannu N, James M, Hemmelgarn B, et al. Association between AKI, recovery of renal function, and long-term outcomes after hospital discharge. *Clin J Am Soc Nephrol* 2013; 194-202.
45. Dewitte A, Johannes-Boyau O, Sidobre C, et al. Kinetic eGFR and Novel AKI Biomarkers to Predict Renal Recovery. *Clin J Am Soc Nephrol* 2015; 1900-1910.
46. Srisawat N, Wen X, Lee M, et al. Urinary biomarkers and renal recovery in critical ill patients with renal support. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011; 1815-1823.
47. Mellor AL, Munn HD. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* 2004; 762-774.
48. Schefold JC, Zeden JP, Fotopoulou C, et al. Increased indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) activity and elevated serum levels of tryptophan catabolites in patients with chronic kidney disease: a possible link between chronic inflammation and uraemic symptoms. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 1901-1908.

49. Vanholder R, De Smet R, Glorieux G, et al. Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int* 2003; 1934-1943.
50. Cribier A, Eltchaninoff H, Bash A et al. Percutaneous transcatheter implantation of an aortic valve prosthesis for calcific aortic stenosis: first human case description. *Circulation* 2002; 3006-3008.
51. Letavernier E, Perez J, Bellocq A, et al. Targeting the calpain/calpastatin system as a new strategy to prevent cardiovascular remodeling in angiotensin II-induced hypertension. *Circ Res* 2008; 720-728.
52. Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, et al. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology* 2001; 464-470.
53. Knaus WA, Zimmerman JE, Wagner DP, et al. APACHE-acute physiology and chronic health evaluation: a physiology based classification system. *Crit Care Med* 1981; 591-597.
54. Chertow GM, Lazarus JM, Christiansen CL, et al. Preoperative renal risk stratification. *Circulation* 1997; 878-884.
55. Thakar CV, Worley S, Arrigain S, et al. Improved survival in acute kidney injury after cardiac surgery. *Am J Kidney Dis* 2007; 703-711.
56. O'Neal JB, Shaw AD, Billings FT 4th. Acute kidney injury following cardiac surgery: current understanding and future directions. *Crit Care* 2016; 4(20):187.
57. Thiele RH, Isbell JM, Rosner MH. AKI associated with cardiac surgery. *Clin J Am Soc Nephrol* 2015; 500-514.
58. Rosner MH, Okusa MD. Acute kidney injury associated with cardiac surgery. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006; 19-32.
59. Laffey LG, Boylan JF, Cheng DC. The systemic inflammatory response to cardiac surgery: implications for the anesthesiologist. *Anesthesiology* 2002; 215-252.
60. Bernard AM, Vyskocil AA, Mahieu P, et al. Assessment of urinary retinol-binding protein as an index of proximal tubular injury. *Clin Chem* 1987; 775-779.
61. Herget-Rosenthal S, Poppen D, Hüsing J, et al. Prognostic value of tubular proteinuria and enzymuria in nonoliguric acute tubular necrosis. *Clin Chem* 2004; 552-558.

62. Mishra J, Dent C, Tarabishi R, et al. Neutrophil-gelatinase associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet* 2005; 1231-1238.
63. Parikh CR, Mishra J, Thiessen-Philbrook H, et al. Urinary IL-18 is an early predictive biomarker of acute kidney injury after cardiac surgery. *Kidney Int* 2006; 199-203.
64. Han WK, Wagener G, Zhu Y, et al. Urinary biomarkers in the early detection of acute kidney injury after cardiac surgery. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 873-882.
65. Verroust PJ, Birn H, Nielsen R. The tandem endocytic receptors megalin and cubilin are important proteins in renal pathology. *Kidney Int* 2002; 745-756.
66. Christensen EI, Birn H. Megalin and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; F562-F573.
67. Leheste JR, Rolinski B, Vorum H, et al. Megalin knockout mice as an animal model of low molecular weight protein. *Am J Pathol* 1999; 1361-1370.
68. Tamm I, Horsfall FL Jr. A mucoprotein derived from human urine which reacts with influenza, mumps, and newcastle disease viruses. *J Exp Med* 1952; 71-97.
69. El-Achkar TM, Wu XR, Rauchman M, et al. Tamm-Horsfall protein protects the kidney from ischemic injury by decreasing inflammation and altering TLR4 expression. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; F534-544.
70. Dehne MG, Sablotzki A, Mühling J. Acute kidney failure. Non-invasive diagnosis of acute kidney failure in operative intensive care patients. *Anaesthesist* 1998; 193-201.
71. El-Achkar TM, McCracken R, Liu Y, et al. Tamm-Horsfall protein translocates to the basolateral domain of the thick ascending limbs, interstitium, and circulation during recovery from acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013; F1066-1075.
72. Hassan MI, Waheed A, Yadav S, et al. Zinc α -2 glycoprotein: a multidisciplinary protein. *Mol Cancer Res* 2008; 892-906.
73. Sörensen-Zender I, Beneke J, Schmidt BM, et al. Zinc α -2 glycoprotein in patients with acute and chronic kidney disease. *BMC Nephrology* 2013; 14:145.

74. Schmitt R, Marlier A, Cantley LG. ZAG expression during aging suppresses proliferation after kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 2008; 2375-2383.
75. Newsome BB, Warnock DG, McClellan, et al. Long-term risk of mortality and end-stage renal disease among the elderly after small increases in serum creatinine level during hospitalization for acute myocardial infarction. *Arch Int Med* 2008; 609-616.
76. Lafrance JP, Miller DR. Acute kidney injury associates with increased long-term mortality. *J Am Soc Nephrol* 2010; 345-352.
77. Aregger F, Pilop C, Uehlinger DE, et al. Urinary proteomics before and after extracorporeal circulation in patients with and without acute kidney injury. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2010; 692-700.
78. Kashani, K, Al-Khafaji A, Ardiles T, et al. Discovery and validation of cell cycle arrest biomarkers in human acute kidney injury. *Crit Care* 2013; R25
79. Uettwiller-Geiger DL, Vijayendran R, Kellum JA, et al. Analytical characteristics of a biomarker-based risk assessment test for acute kidney injury (AKI). *Clin Chim Acta* 2016; 93-98.
80. Meersch M, Schmidt C, van Aken H, et al. Urinary TIMP-2 and IGFBP7 as early biomarkers of acute kidney injury and renal recovery following cardiac surgery. *PLoS one*. 2014 Mar27 9(3)e93460.
81. Gocze I, Koch M, Renner P et al. Urinary biomarkers TIMP-2 and IGFBP7 early predict acute kidney injury after major surgery. *PLoS one*. 2015 Mar23 10(3):e0120863.
82. Honore PM, Nguyen HB, Gong M, et al. Urinary tissue inhibitor of Metalloproteinase-2 and Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein 7 for Risk Stratification of Acute Kidney Injury in Patients With Sepsis. *Crit Care Med* 2016; 1851-1860.
83. Westhoff JH, Tönshoff B, Waldherr S, et al. Urinary Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 (TIMP-2)-Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein 7 (IGFBP7) Predicts Adverse Outcome in Pediatric Acute Kidney Injury. *PloS One*. 2015 Nov25 10(11):e0143628.
84. Koyner JL, Shaw AD, Chawla LS, et al. Tissue Inhibitor Metalloproteinase-2 (TIMP-2)*IGF Binding Protein-7 (IGFBP7) Levels are Associated with Adverse Long-Term Outcomes in Patients with AKI. *J Am Soc Nephrol* 2015; 1747-1757.

85. Saad A, Wang W, Herrmann SM, et al. Atherosclerotic renal artery stenosis is associated with elevated cell cycle arrest markers related to reduce renal blood flow and postcontrast hypoxia. *Nephrol Dial Transplant* 2016; 1855-1863.
86. Pianta TJ, Peake PW, Pickering JW, et al. Evaluation of biomarkers of cell cycle arrest and inflammation in prediction of dialysis or recovery after kidney transplantation. *Transplant Int* 2015; 1392-1404.
87. Bell M, Larsson A, Venge P, et al. Assessment of cell-cycle arrest biomarkers to predict early and delayed acute kidney injury. *Dis Markers* 2015; 2015:158658.
88. Koyner JL, Davison DL, Brasha-Mitchell E, et al. Furosemid Stress Test and Biomarkers for the Prediction of AKI Severity. *J Am Soc Nephrol* 2015; 2023-2031.
89. Sprenger CC, Vail ME, Evans K. et al. Over-expression of insulin-like growth factor binding protein-related protein-1 (IGFBP-rP1/mac25) in the M12 prostate cancer cell line alters tumor growth by a delay in G1 and cyclin A associated apoptosis. *Oncogene* 2002; 140-147.
90. Kellum JA, Chawla LS. Cell-cycle arrest and acute kidney injury: the light and the dark sides. *Nephrol Dial Transplant* 2016; 16-22
91. Johnson ACM, Zager RA. Mechanisms Underlying Increased TIMP2 and IGFBP7 Urinary Excretion in Experimental AKI. *J Am Soc Nephrol* 2018; 2157-2167.
92. Swan JS, Kragten EY, Veening H. Liquid-chromatographic study of fluorescent materials in uremic fluids. *Clin Chem* 1983; 1082-1084.
93. Rhee EP, Clish CB, Ghorbani A, et al. A combined epidemiologic and metabolomic approach improves CKD prediction. *J Am Soc Nephrol* 2013; 1330-1338.
94. Chawla LS, Bellomo R, Bihorac A, et al. Acute kidney disease and renal recovery: consensus report of the Acute Disease Quality Initiative (ADQI) 16 Workgroup. *Nat Rev Nephrol* 2017; 241-257.
95. Bagur R, Webb JG, Nietlispach F, et al. Acute kidney injury following transcatheter aortic valve implantation: predictive factors, prognostic value, and comparison with surgical aortic valve replacement. *Eur Heart J* 2010; 865-874.

96. Elhimdi Y, Bleiziffer S, Piazza N, et al. Incidence and predictors of acute kidney injury in patients undergoing transcatheter aortic valve implantation. *Am Heart J* 2011; 735-739.
97. Saia F, Ciuca C, Taglieri N, et al. Acute kidney injury following transcatheter aortic valve implantation: incidence, predictors and clinical outcome. *Int J Cardiol* 2013;1034-40.
98. Karkouti K. Transfusion and risk of acute kidney injury in cardiac surgery. *Br J Anesth* 2012; i29-38.
99. Nuis RJ, Rodes-Cabau J, Sinning JM, et al. Blood transfusion and the risk of acute kidney injury after transcatheter aortic valve implantation. *Circ Cardiovasc Interv* 2012; 680-688.
99. Scherner , Wahlers T. Acute kidney injury after transcatheter aortic valve implantation. *J Thorac Dis* 2015; 1527-1535.
100. Sinning JM, Ghanem A, Steinhäuser H, et al. Renal function as predictor of mortality in patients after percutaneous transcatheter aortic valve implantation. *JACC Cardiovasc Interv* 2010; 1141-1149.
101. Barbanti M, Latib A, SgROI C, et al. Acute kidney injury after transcatheter aortic valve implantation with self-expanding CoreValve prosthesis: results from a large multicentre Italian research project. *EuroIntervention* 2014; 133-140.
102. Van Linden A, Kempfert J, Rastan AJ, et al. Risk of acute kidney injury after minimally invasive transapical aortic valve implantations in 270 patients. *Eur J Cardiothorac Surg* 2011; 835-842.
103. Ikonomidis JS, Jones JA, Barbour JR, et al. Expression of matrix metalloproteinases and endogenous inhibitors within ascending aortic aneurysms of patients with Marfan syndrome. *Circulation* 2006; I365-I370.
104. Abbott ME. Coarctation of the aorta of the adult type. II. A statistical study and historical retrospect of 200 recorded cases with autopsy , of stenosis or obliteration of the descending arch in subjects above the age of two years. *American Heart Journal* 1928; 574-618.
105. Losenno KL, Goodman RL, Chu MW. Bicuspid aortic valve disease and ascending aortic aneurysms: gaps in knowledge. *Cardiol Res Pract* 2012:145202.

106. De Sa M, Moshkovitz Y, Butany J, et al. Histologic abnormalities of the ascending aorta and pulmonary trunk in patients with bicuspid aortic valve disease: clinical relevance to the Ross procedure. *J Thorac Cardiovasc Surgery* 1999; 588-594.
107. Kyndt F, Gueffet JP, Probst V, et al. Mutations in the gene encoding filamin A as a cause for familial cardiac valvular dystrophy. *Circulation* 2007; 40-49.
108. Pilop C, Aregger F, Gorman RC, et al. Proteomic analysis in aortic media of patients with Marfan syndrome reveals increased activity of calpain 2 in aortic aneurysms. *Circulation* 2009; 983-991.
109. Subramanian V, Moorleggen JJ, Balakrishnan A, et al. Calpain-2 compensation promotes angiotensin II-induced ascending and abdominal aortic aneurysms in calpain-1 deficient mice. *PLoS One* 2013; e72214.
110. Subramanian V, Uchida HA, Ijaz T, et al. Calpain inhibition attenuates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysms and atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *J Cardiovasc Pharmacol* 2012; 66-76.
111. Jiang L, Wang M, Zhang J, et al. Increased aortic calpain-1 activity mediates age associated angiotensin II signaling of vascular smooth muscle cells. *PLoS one*. 2008 May 21; 3(5):e2231.
112. Stolberg M. Die Harnschau im 16. und frühen 17. Jahrhundert. *Pirckheimer-Jahrbuch für Renaissance- und Humanismusforschung* 2009/2010; 129-143.
113. Decramer S, Gonzalez de Peredo A, Breuil B, et al. Urine in clinical proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2008; 1850-1862.
114. Petri AL, Hogdall C, Christensen IJ, et al. Sample handling for mass spectrometric proteomic investigations of human urine. *Proteomics Clin Appl* 2008; 1184-1193.
115. Waikar SS, Sabbiseti VS, Bonventre JV. Normalization of urinary biomarkers to creatinine during changes in glomerular filtration rate. *Kidney int* 2010; 486-494.
116. McMahon GN, Waikar SS. Biomarkers in nephrology: Core Curriculum 2013. *Am J Kidney Dis* 2013; 165-178.

Danksagung

Sehr viele Menschen haben mich auf meinem Weg als Klinikerin und Wissenschaftlerin begleitet und bereichert!

Auch wenn ich nun nicht alle wichtigen Menschen persönlich erwähnen kann, so bin ich sehr dankbar für all die guten Begegnungen und lehrreichen Gespräche.

Besonders bedanken möchte ich mich bei:

Professor Felix Frey

Auch nach Jahrzehnten als etablierter Chefarzt war Dein medizinisches Interesse und Deine Neugierde eindrucksvoll und ansteckend! Dein eindruckliches Wissen und Deine analytische Lehre haben wesentlich zu meinem Bildungsfundament beigetragen. Du hast mich gefördert, gefordert, unterstützt, inspiriert und vorangetrieben.

Professor Dominik Uehlinger

Mit Deiner Klugheit und Deinem über jeden Zweifel erhabenen gesunden Menschenverstand bist Du für mich ein Vorbild. Du hast mir die Angst genommen, eine graue Labormaus zu werden und hast immer die richtigen Worte gefunden, wenn es bei mir nicht so gut lief. Klinisch habe ich unglaublich viel von Dir gelernt und Du hast mich in meinen Projekten unterstützt wie sonst niemand!

Christiane Pilop, Ph

Du hast mir mit Wissen und Fundament sowie mit viel Geduld die Basics der Laborarbeit gelernt und unzählige Gele mit mir gegossen. Du hast Dich auf meine klinischen Ideen eingelassen und so haben wir mehrere Projekte gemeinsam mit viel Freude durchgeführt. Deine klare, ehrliche und zuverlässige Art war eine große Bereicherung.

Professor Brigitte Frey

Du warst im Labor eine tolle Vorgesetzte! Du hast mir Freiheit gelassen wenn ich einen Plan hatte, und Du hast mir neue Wege gezeigt wenn ich nicht mehr weiterkam und hast immer an mich geglaubt!

Professor Achim Jörres

Du hast mir die Türen in Berlin geöffnet sowohl im Labor als auch in der Klinik und hast mich in meinem Projekt unterstützt mit Rat und Tat.

Professor Martin Kuhlmann

Im klinischen Alltag haben Sie mir viele Türen geöffnet und neue Interessensfelder gezeigt. Sie haben mich stets motiviert und vorangetrieben in meinen wissenschaftlichen Projekten und mich bestärkt weiterzumachen.

Professor Kai-Uwe Eckardt

Ich bin Ihnen sehr dankbar, dass Sie mich in meiner wissenschaftlichen Tätigkeit unterstützen und mir die Tür zur Charité weiter geöffnet haben.

PD Dr. A. Kahl

Ich habe im Alltag viel von Ihnen gelernt und ihre witzige und trotzdem respektvolle Art sehr geschätzt.

Meine Eltern und meine Schwester Nicole

Mit Euch habe ich das Glückslos gezogen! Danke für Alles!

Norman

Ich danke Dir für Deine Unterstützung meiner Projekte und das Verständnis für meine Arbeit! Gleichzeitig zeigst Du mir immer wieder, dass es im Alltag viele andere spannende und wichtige Dinge gibt. Dafür und für vieles Mehr danke ich Dir!

Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

.....
Datum

.....
Unterschrift