

Aus der Klinik für Nephrologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Validierung eines Urinproteom-Klassifikators zur Frühdiagnose  
der diabetischen Nephropathie

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Justyna Siwy

aus Breslau / Polen

**Datum der Promotion: 04.09.2015**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>I</b>
<b>2</b>	<b>Einführung</b> .....	<b>1</b>
<b>3</b>	<b>Methodik</b> .....	<b>5</b>
3.1	Probenbeschreibung und -gewinnung.....	5
3.2	Analyse mittels Kapillarelektrophorese-gekoppelter Massenspektrometrie .....	5
3.3	Analyse mittels MALDI-Massenspektrometrie.....	6
3.4	Analyse mittels Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie ...	6
3.5	Statistische Methoden.....	6
3.6	Identifizierung der Proteasen .....	7
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>8</b>
4.1	Publikation 1: Multizentrische Validierung des Urinproteom basierten „CKD273“-Klassifikators zur Diagnose der diabetischen Nephropathie .....	8
4.2	Publikation 2: Urin Peptidom-basierte Evaluierung der ZDF-Ratten als ein Modell für humane Krankheiten .....	10
4.3	Publikation 3: Vergleich der MALDI-Massenspektrometrie und der Kapillarelektrophorese-gekoppelten Massenspektrometrie zur Bewertung von Biomarkern der diabetischen Nephropathie .....	12
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>15</b>
<b>6</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>20</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>26</b>
7.1	Anteilsklärung an den erfolgten Publikationen .....	26
7.2	Ausgewählte Publikationen .....	27
7.2.1	<i>Multicentre prospective validation of a urinary peptidome-based classifier for the diagnosis of type 2 diabetic nephropathy</i> .....	28
7.2.2	<i>Evaluation of the Zucker diabetic fatty (ZDF) rat as a model for human disease based on urinary peptidomic profiles</i> .....	36
7.2.3	<i>A comparison between MALDI-MS and CE-MS data for biomarker assessment in chronic kidney diseases</i> .....	46
7.3	Curriculum vitae .....	56
7.4	Publikationsliste .....	58
7.5	Eidesstattliche Versicherung.....	65
7.6	Danksagung.....	66

## 1 Zusammenfassung

Nach Zahlen der International Diabetes Federation (IDF) von 2013 leiden derzeit 8,1 % der erwachsenen Bevölkerung in der Europäischen Union am Diabetes mellitus. Eine der wesentlichsten Spätkomplikationen des Diabetes ist die diabetische Nephropathie. Sie ist eine der Hauptursachen einer Niereninsuffizienz. Eine zuverlässige Frühdiagnostik der diabetischen Nephropathie ist daher höchst notwendig. Jüngst wurden 273 spezifische Peptide im Urin identifiziert, aufgrund derer ein diagnostischer Klassifikator genannt „CKD273“ (CKD: engl. für chronische Nierenerkrankungen) entwickelt werden konnte, der in der Lage ist, diabetische Nephropathie frühzeitig zu erkennen. Da sich diese Diagnostik auf Urinproteomprofile stützt, ist sie nicht-invasiv und theoretisch sowohl im klinischen als auch wissenschaftlichen Umfeld einsetzbar. Um den „CKD273“-Klassifikator diagnostisch einsetzen zu können, bedarf es jedoch noch einer umfassenden Validierung. Daher wurden im Rahmen der hier vorliegenden Dissertation Untersuchungen zur Validierung und Optimierung des betreffenden „CKD273“-Klassifikators durchgeführt.

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wurde der „CKD273“-Klassifikator in einer multizentrischen Kohorte getestet. Diese Validierung des „CKD273“-Klassifikators zeigte eine hohe statistische Genauigkeit ( $AUC=0,95$ ). Zusätzlich wurde die Zuverlässigkeit des „CKD273“-Klassifikators in Abhängigkeit von der Lagerung der Proben, sowie Alter und Geschlecht der Patienten untersucht. Hierbei zeigte sich, dass das Diagnoseergebnis unabhängig von diesen Parametern ist.

Im zweiten Abschnitt wurde das Urinproteom eines gängigen Tiermodells für Diabetes-Typ-II-assoziierte Komplikationen, das so genannte „Zucker diabetic fatty“ (ZDF) Rattenmodell, mittels Kapillarelektrophorese-gekoppelter Massenspektrometrie analysiert. Im Vergleich zu gesunden Ratten wurden 180 für das ZDF-Rattenmodell spezifische Peptide definiert und mit den humanen Peptidbiomarkern aus dem „CKD273“-Klassifikator, sowie mit Peptidbiomarkern für kardiovaskuläre Erkrankungen verglichen. Das ZDF-Rattenmodell wies in dieser vergleichenden Studie eine bessere Übereinstimmung mit den Peptidbiomarkern für kardiovaskuläre Schäden als mit den Peptidbiomarkern für chronische Nierenerkrankungen auf. Dies bestätigte sich bei der Analyse der mit den Peptidsequenzen assoziierten Proteaseaktivitäten.

Im dritten Teil dieser Dissertation wurden zur Reduzierung des Analysenaufwands bei der Diagnostik mit dem CKD273-Klassifikator Versuche durchgeführt, die betreffenden

Analysen auf eine weitere massenspektrometrische Technologieplattform zu übertragen. Als kostengünstigere und zeitsparende Diagnostik wurde dazu die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation-Massenspektrometrie (MALDI-Massenspektrometrie) gewählt. Die Diagnose der diabetischen Nephropathie mittels MALDI-Massenspektrometrie resultierte in einer geringeren statistischen Genauigkeit (AUC=0,83) verglichen mit der Kapillarelektrophorese-gekoppelten Massenspektrometrie (AUC=0,95), wies jedoch Potential zur Vorauswahl der Patienten auf.

Die vorliegende Dissertationsschrift bestätigt insgesamt die Validität und diagnostische Stabilität des „CKD273“-Klassifikators. Sie zeigt weitere Möglichkeiten zur weniger zeitaufwendigen und kostengünstigeren Diagnostik mittels MALDI-Massenspektrometrie auf. Des Weiteren wird das Potential der verwendeten Biomarker zur Beurteilung von Tiermodellen aufgezeigt, wobei die Ergebnisse jedoch darauf hinweisen, dass das ZDF-Rattenmodell eher zur Untersuchung von makrovaskulären Schäden geeignet ist.

## **Abstract**

According to results published by the International Diabetes Federation (IDF) in 2013, 8.1 % of the adult population in the European Union had diabetes mellitus. Diabetic nephropathy is one of the most critical complications of diabetes mellitus occurring at later stages and leading to renal failure. Thus, reliable and early diagnosis of diabetic nephropathy is highly desirable. Recently, 273 specific discriminatory peptides were identified in urine, which were used to establish the „CKD273“-classifier (CKD: chronic kidney disease) to early detect diabetic nephropathy. This non-invasive diagnostic tool is based on urine proteome profiles and is useful for research and clinical approaches. However, before this classifier could be considered for routine clinical diagnostics, extensive and comprehensive validation is necessary. Therefore, the analyses for validation and improvement of „CKD273“-classifier were performed within this thesis.

The „CKD273“-classifier was utilized in a multicenter study and it demonstrated a high accuracy (AUC=0.95) in the validation cohort. In addition, the dependence of the classifier on patients' age and sex as well as on storage conditions of the urine samples was investigated and showed independency of these parameters.

The urinary proteome of a commonly used animal model for diabetes-type-II-associated complications, the "sugar diabetic fatty" (ZDF) rat model, was analyzed by capillary-

electrophoresis coupled to mass-spectrometry. In comparison to control rats, 180 specific peptides for ZDF rats were identified. When further compared to the previously defined „CKD273“-classifier and human peptide biomarkers for cardiovascular diseases, the ZDF-specific peptides showed a better overlap with the biomarkers for cardiovascular damage rather than the ones for CKD. This result was confirmed in the analysis of the protease activities associated with identified peptides.

The third part of this thesis focused on the reduction of the analysis effort for diagnosis using the „CKD273“-classifier. An attempt was then made to transfer the model to another mass-spectrometry technology platform in order to optimize the diagnosis in terms of time and cost. For this matter, matrix-assisted laser desorption/ionization mass-spectrometry (MALDI mass-spectrometry) was used. However, the diagnosis of diabetic nephropathy by the MALDI mass-spectrometric approach resulted in lower accuracy (AUC=0.83) in comparison to capillary electrophoresis-coupled mass-spectrometry (AUC=0.95), but showed potential in the pre-selection of patients.

Results of the thesis confirm the validity and stability of the „CKD273“-classifier, highlighted the ability to transfer results in another mass-spectrometry platform in a less tedious and more cost-effective manner, and the potential of the biomarkers for the evaluation of animal models. In addition, the results show that the ZDF rat model is suitable for the investigation of macrovascular damages.

## 2 Einführung

Laut epidemiologischer Studien betreffen chronische Nierenerkrankungen annähernd 10 % der Bevölkerung der Industrienationen<sup>1</sup>. Die häufigste Ursache der chronischen Nierenerkrankungen sind diabetische Nephropathie, Bluthochdruck und Glomerulonephritis<sup>2</sup>. Daher stehen chronische Nierenerkrankungen bei Patienten mit Diabetes mellitus im Fokus dieser Arbeit. Die Früherkennung und Therapie chronischer Nierenerkrankungen ist auch aus ökonomischer Sicht höchst relevant, da durch die chronische Niereninsuffizienz, sowie deren Folgeerkrankungen hohe Kosten im öffentlichen Gesundheitswesen generiert werden. Vor diesem Hintergrund sind neue Biomarker, die Nierenkrankheiten im Frühstadium detektieren und die Krankheitsprogression abbilden können, von großer klinischer Relevanz.

Zurzeit werden chronische Nierenerkrankungen durch Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) diagnostiziert. Eine GFR unter  $60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$  deutet auf eine chronische Nierenerkrankung hin. Im Frühstadium der chronischen Niereninsuffizienz kann die Abnahme der GFR durch Zunahme des Filtrationsdrucks jedoch kompensiert werden. Dadurch fungiert die GFR nur als ein Biomarker für chronische Nierenerkrankungen nach beginnendem Fortschreiten. Zur Bestimmung einer sich entwickelnden chronischen Niereninsuffizienz, sowie zur Bewertung ihrer Progression im Stadium 1-3 ist die GFR ungeeignet.

Da die GFR nur ein Parameter der Nierenfunktion ist, können keine weitergehenden Informationen wie z.B. über spezifische Ursachen der Krankheit, über assoziierte pathophysiologische Prozesse oder über den Einfluss und Erfolg der Therapie abgeleitet werden.

Die am häufigsten verwendeten Proteinbiomarker für pathologische renale Veränderungen der Blut-Harn-Schranke (beeinträchtigte glomeruläre Filtration) und/oder der tubuläre Rückresorption von Proteinen sind die Albumin-Konzentrationen und/oder die Gesamtprotein-Konzentration im Urin<sup>3</sup>. Bei Patienten mit Diabetes mellitus ist die Mikroalbuminurie (20 bis 200 mg/L oder 30 bis 300 mg/Tag) das erste Zeichen einer beginnenden diabetischen Nephropathie. Allerdings zeigten Biopsiestudien, dass die intrarenale Pathologie bereits vor Eintritt der Mikroalbuminurie vorhanden ist<sup>4</sup>. Weiterhin ist der Nachweis der Mikroalbuminurie kein valider Hinweis, dass der betroffene Patient eine Makroalbuminurie ( $> 200 \text{ mg/L}$  oder  $> 300 \text{ mg/Tag}$ ) entwickeln wird. Ebenso ist auf der

Basis der Konzentration des Albumins nur begrenzt eine Aussage über die Schwere des Schadens der Nieren möglich. Ist die Albumin- und/oder Proteinkonzentration im Urin erhöht, ist in der Regel eine intervenierende Therapie wenig erfolgreich. Um einer chronischen Niereninsuffizienz mit präventiven Maßnahmen erfolgreich entgegenzuwirken, ist jedoch eine frühzeitige Diagnostik entscheidend. Die zurzeit zur Verfügung stehenden diagnostischen Parameter können somit nur in einem sehr begrenzten Umfang die Schwere der Nierenschädigung abbilden. Die differenzierte Proteindiagnostik mit Proteinmarkern wie Albumin erlaubt jedoch Differenzierung einer selektiven (ionische Komponente) beziehungsweise unselektiven (Porengrößenselektivität) glomerulären sowie tubulären Proteinurie. Die verschiedenen beteiligten pathophysiologischen Prozesse auf molekularer und zell Ebene können jedoch nicht durch die Bestimmung einzelner Proteine abgebildet werden. Dies ist durch eine Analyse von komplexen Peptid-Mustern viel besser möglich<sup>5</sup>. Dazu müssen relevante Peptide und Proteine isoliert, identifiziert und (patho-) physiologisch charakterisiert werden. Verschiedene Technologien der Chromatographie und der Massenspektrometrie stellen gegenwärtig erstmalig die Möglichkeit zur Verfügung, ein detailliertes Bild der jeweiligen Peptid/Protein-Zusammensetzung zu erzeugen.

Die Kapillarelektrophorese-gekoppelte Massenspektrometrie erlaubt dabei eine hocheffiziente Separation und Analyse der Peptide und Proteine. Das Verfahren bildet eine große Anzahl von Peptiden und Proteinen schnell und verlässlich ab<sup>6</sup>. Die Kapillarelektrophorese trennt dabei die Peptide mit hoher Auflösung durch deren Migration im elektrischen Feld auf. Kommerziell verfügbare Kapillarelektrophorese-Geräte sind auf einen hohen Probendurchsatz ausgelegt und bieten ein automatisiertes Analyseverfahren. Es werden für die Analyse nur sehr kleine Probenvolumina benötigt. Jedoch ist dieses Verfahren nicht zur Analyse von Proteinen >20 kDa geeignet<sup>7</sup>. Die Kapillarelektrophorese-gekoppelte Massenspektrometrie erlaubt die Untersuchung sehr komplexer und proteinreicher Körperflüssigkeiten wie Plasma, Urin oder Rückenmarksflüssigkeit.

In der heutigen Zeit gewinnt die Analyse der Zusammensetzung des Urins zunehmend an Bedeutung. Zum einen werden im Urin frühzeitig vermehrt Substanzen ausgeschieden, die erste Hinweise auf ein krankhaftes Geschehen im Körper geben, so dass die Analyse der physikalischen Eigenschaften und der chemischen Zusammensetzung des Urins wichtige diagnostische Hinweise liefern kann<sup>8</sup>. Zum anderen stellt Urin ein Probenmaterial dar, das ohne invasive Probenentnahme zur Verfügung steht. Da annä-

hernd 70% der Proteine und Peptide des Urins aus der Niere und dem Urogenitaltrakt stammen<sup>9</sup>, stellt der Urin eine entscheidende Quelle zur Definition von Biomarkern für Nierenkrankheiten dar<sup>8</sup>. Zwischen der Ausscheidung sowie der Detektion der Peptide und Proteine im Urin besteht ein direkter Zusammenhang, so dass Rückschlüsse auf den bestehenden physiologischen beziehungsweise pathophysiologischen Zustand der Niere möglich sind. Für einige Nierenerkrankungen wurden bereits eine Vielzahl von spezifischen Biomarkern im Urin mit der Kapillarelektrophorese-gekoppelten Massenspektrometrie definiert<sup>10-17</sup>. In jüngster Zeit wurden für chronische Verlaufsformen von Nierenerkrankungen insgesamt 273 spezifische Peptide (Biomarker) identifiziert<sup>3</sup>. Diese umfassen verschiedene Kollagenfragmente, Fragmente von Blutproteinen wie z.B.  $\alpha$ -1-Antitrypsin, Albumin, Fibrinogen- $\alpha$ , sowie nierenspezifische Proteinfragmente wie z.B. Fragmente des Uromodulins. Die insgesamt 273 Biomarker wurden mit einem hochdimensionalen Klassifikator, einer „Support Vector Machine“ kombiniert<sup>16,18-20</sup>, um zwischen gesunden Probanden und Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen zu unterscheiden. Der Klassifikator wurde als „CKD273“ („Chronic Kidney Disease“) bezeichnet. Die Leistung des „CKD273“-Klassifikators wurde mit einem unabhängigen Datensatz überprüft<sup>3</sup>. Es wurde gezeigt, dass der „CKD273“-Klassifikator eine frühzeitige Diagnose bei chronischem Verlauf von Nierenkrankungen erlaubt<sup>21,22</sup>. Damit das Modell in der Diagnostik jedoch eingesetzt werden kann, ist eine breite Validierung notwendig. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde daher unter anderem die Reproduzierbarkeit des „CKD273“-Klassifikators unter dem Einfluss verschiedener Patientenpopulationen aus internationalen Zentren kontrolliert<sup>23</sup>.

Eine frühzeitige Diagnostik einer beginnenden Niereninsuffizienz wäre für eine maßgeschneiderte Therapie wünschenswert. Eine bessere Therapie und Prävention sind notwendig um die Krankheit zu überwinden<sup>24</sup>. Hierzu sind jedoch die spezifischen Therapeutika noch klinisch zu testen. Um diese Studien möglichst effizient durchführen zu können, sind präklinische Tiermodelle von essentieller Bedeutung. Die entsprechenden Modelle sollen möglichst identische pathophysiologische Verläufe zur Erkrankung beim Menschen aufzeigen und somit eine Validierung von Therapieansätzen vor der klinischen Prüfung unter *in-vivo*-Bedingungen ermöglichen.

Neben den humanen Peptiden, spezifisch für chronische Nierenkrankheiten, wurde auch in dieser Arbeit die Peptidzusammensetzung des Urins von Tiermodellen analysiert<sup>25</sup>. Die Verwendung eines Tiermodells soll zukünftig erleichtern, mit dem Frühstadi-

um der Nierenerkrankung assoziierte Prozesse im Detail unter *in-vivo* Bedingungen zu untersuchen. Die im Tiermodell definierten spezifischen Peptide wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertationsschrift mit humanen Biomarker für chronische Nierenerkrankungen verglichen. Ziel war es zu prüfen, ob das Tiermodell die gleichen pathophysiologischen Verläufe bei Nierenerkrankungen wie beim Menschen aufweist und ob das zurzeit weit verbreitete Tiermodell der „Zucker-Diabetic-Fatty“-Ratte (ZDF-Ratte)<sup>24</sup> zur Untersuchung von möglichen Therapeutika in klinischen Studien geeignet ist. Die ZDF-Ratte ist als Modell für Adipositas, Typ II-Diabetes, arterielle Hypertonie und Hyperlipidämie<sup>26,27</sup> bekannt. Dieses Tiermodell entwickelt spontan einen Typ II Diabetes im Alter von 7-8 Wochen durch die verstärkte Apoptose von  $\beta$ -Zellen, die dann nicht mehr in der Lage sind, die Insulinresistenz auszugleichen<sup>28</sup>.

Da die Kapillarelektrophorese-gekoppelte Massenspektrometrie-Technologie sich für die Biomarkerdefinition als sehr geeignet erwiesen hat<sup>5,8,16,17,29-35</sup>, wurde dieses Verfahren in der vorliegenden Arbeit angewandt. Die Technologie ist jedoch aufgrund ihrer Zeit- und infolge des erhöhten Kostenaufwands nur bedingt für ein breites Screening geeignet. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit auch untersucht, ob der „CKD273“-Klassifikator auch auf eine kostengünstigere Technologieplattform wie der Matrix-unterstützten Laser-Desorption/Ionisation–Massenspektrometrie (MALDI-Massenspektrometrie) übertragen werden kann<sup>36</sup>.

### **3 Methodik**

#### **3.1 Probenbeschreibung und -gewinnung**

Die humanen Urinproben stammen von Typ II-Diabetes mellitus-Patienten mit und ohne diabetische Nephropathie aus neun internationalen Zentren. Die humanen Urinproben wurden für die Untersuchung als Mittelstrahl des zweiten Morgenurins isoliert. Eine detaillierte Beschreibung der betreffenden Kohorten ist den Publikationen Siwy et al.<sup>23</sup> und Molin et al.<sup>36</sup> zu entnehmen.

Als Tiermodell wurden männliche ZDF-Ratten (ZDF/Gmi-fa/fa) und altersgematchte LEAN-Kontrollen (ZDF/Gmi-fa/+) verwendet. Der Urin der Ratten wurden jeweils über 24 Stunden in metabolischen Käfigen gesammelt. Die Details zur Probengewinnung sowie zum Tiermodell befinden sich in Siwy et al.<sup>25</sup>. Sämtliche Proben wurden unmittelbar nach ihrer Gewinnung bei -20°C tiefgefroren und erst zur Probenpräparation aufgetaut.

#### **3.2 Analyse mittels Kapillarelektrophorese-gekoppelter Massenspektrometrie**

Die Urinproben wurden unmittelbar vor der weiteren Untersuchung bei Raumtemperatur aufgetaut. Sie wurden 1:1 mit Harnstoffpuffer (2M Harnstoff, 10mM NH<sub>4</sub>OH and 0,02% Natriumdodecylsulfat) in einer Ultrafiltereinheit (Sartorius, Germany) gemischt und anschließend zentrifugiert. Das Filtrat wurde aus der Zentrifugationseinheit auf die zuvor mit Ammoniakpuffer (0,01% NH<sub>4</sub>OH) vorgespülte PD 10-Säule (GE Healthcare, Sweden) aufgetragen. Die Säulen wurden mit Ammoniakpuffer gereinigt. Die Elution erfolgte ebenfalls mit Ammoniakpuffer. Die Eluate wurden über Nacht in der Gefriertrocknungsanlage lyophilisiert. Die lyophilisierten Proben wurden bis zur Messung im Kühlschrank gelagert.

Zu Chromatographie wurde eine P/ACE-Kapillarelektrophorese verwendet. Zur massenspektrometrischen Signaldetektion wurde ein Elektrospray Flugzeit-Massenspektrometer (Micro-TOF, Bruker-Daltonik, Bremen) verwendet. Die Kopplung zwischen Kapillarelektrophorese und Massenspektrometrie erfolgte über ein ESI-MS-Sprayer Kit (Agilent Technologies, USA). Die Datenaufzeichnung erfolgte durch die Gerätesoftware „microTOFControl“ (Bruker-Daltonik, Germany) in einem Messbereich von 450-3.000 m/z. Die Spektrenakkumulationszeit betrug 3 Sekunden pro Spektrum.

Die Auswertungen der Messungen sowie die dreidimensionale Visualisierung (über Masse, Migrationszeit, Intensität) erfolgte mit Hilfe des Programms „MosaiquesVisu“ (biomosaiques software GmbH, Hannover). Signale, die das gleiche Molekül

repräsentieren, wurden zu einer Masse dekonvolutiert. Das Programm verwendet zur Berechnung der Peptidmassen sowohl eine Isotopenerkennung als auch eine Erkennung konjugierter Massen. Die Migrationszeiten der Kapillarelektrophorese und die Signalintensität wurden automatisch anhand einer zuvor erstellten Referenzliste normiert<sup>37,38</sup>. Alle detektierten Peptide wurden in einer „Structured Query Language“ (SQL)-Datenbank (Microsoft Corporation, USA) hinterlegt, abgestimmt und annotiert.

### **3.3 Analyse mittels MALDI-Massenspektrometrie**

Die Urinproben wurden in einer 30 kDa cut-off-Zentrifugationseinheit zentrifugiert. Das Filtrat wurde 1:1 mit 0,1% wässriger Trifluoressigsäure (TFA) -Lösung verdünnt und mit C18-Pipettenspitzen entsalzt.

Die Analyse wurde mit UltrafleXtreme MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Germany) durchgeführt. 5 µl Probe wurde mit Matrix vermischt und 1 µl dieser Lösung für die Analyse verwendet. Eine externe Massenkalkulation mit Protein-Standard wurde durchgeführt. Alle Spektren wurden automatisch in ASCII-Dateien konvertiert. Die ASCII-Dateien wurden in MetaboAnalyst Web-Server für die Datenanalyse implementiert. Die Signalintensitäten wurden  $\log_2$ -normiert<sup>39</sup>. Sie wurden für weitere Analysen analog zu den Kapillarelektrophorese-gekoppeltem Massenspektrometrie-Daten<sup>37</sup> normiert. Es wurden insgesamt 16 interne Standardpeptide definiert und für die Normierung der MALDI-Daten verwendet.

### **3.4 Analyse mittels Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie**

Für die Identifizierung der Peptide wurden die Urinproben mit dem Dionex Ultimate 3000 RSLC Nano Flow System (Dionex, UK) analysiert. Eine genauere Beschreibung ist in der Publikation Siwy et al.<sup>25</sup> zu finden.

### **3.5 Statistische Methoden**

Für die Identifizierung der Biomarker wurden die p-Werte mit dem Wilcoxon-Rangsummentest berechnet. Die p-Werte wurden dann für ein multiples Testen nach der Benjamini- und Hochberg-Methode adjustiert<sup>40</sup>. Die Klassifikation der Proben wurde unter Verwendung des „Support Vector Machine“-basierten Klassifikators, der Clusteranalyse und der Hauptkomponentenanalyse durchgeführt. Die Sensitivitäten und Spezifitäten wurden mit Hilfe einer Grenzwertoptimierungskurve (ROC, engl. für receiver ope-

rating characteristic) berechnet<sup>41</sup>. Eine entsprechende Beschreibung dieser Methoden befindet sich in der Publikation Molin et al.<sup>36</sup>.

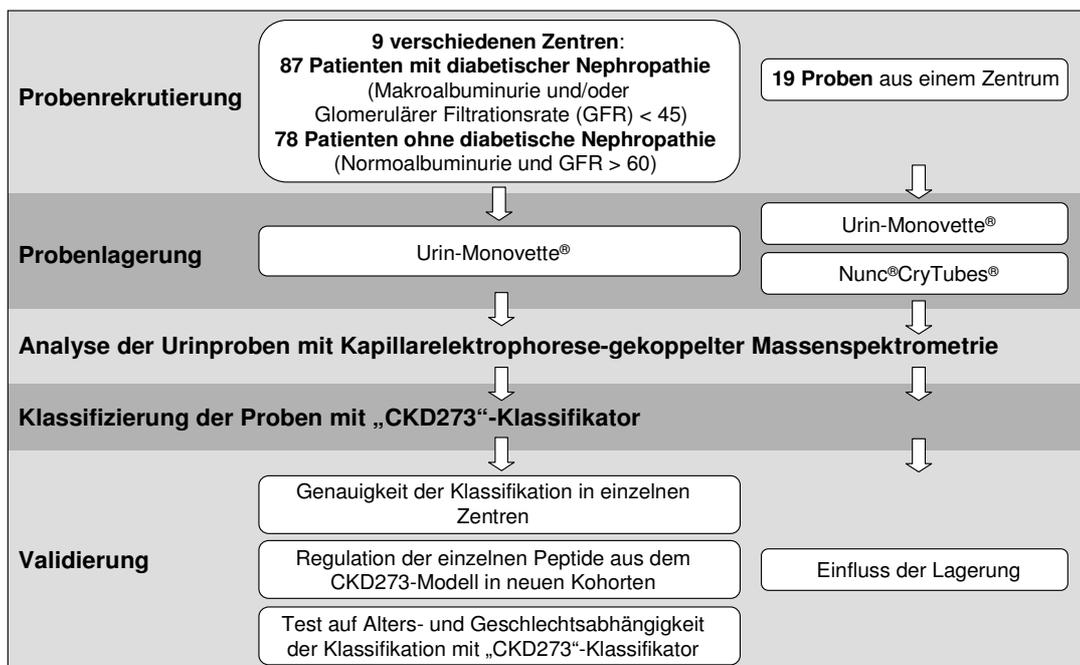
### **3.6 Identifizierung der Proteasen**

Für die in der Publikation Siwy et al.<sup>25</sup> definierten spezifischen Peptide, die durch die Aminosäuresequenz identifiziert wurden, wurden auch die für die Entstehung der spezifischen Peptidfragmente zugrunde liegenden Proteasen bestimmt. Die Methodenbeschreibung befindet sich in Siwy et al.<sup>25</sup>.

## 4 Ergebnisse

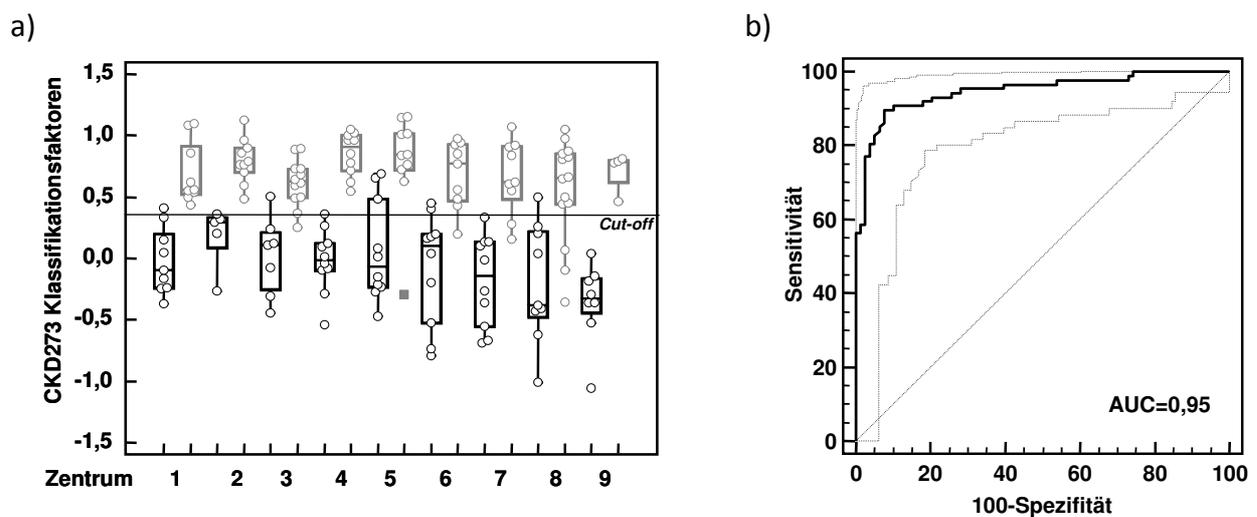
### 4.1 **Publikation 1: Multizentrische Validierung des Urinproteom basierten „CKD273“-Klassifikators zur Diagnose der diabetischen Nephropathie**

Die diabetische Nephropathie ist eine der häufigsten Spät komplikationen von Diabetes mellitus. Zurzeit gibt es Behandlungsmethoden mit dem Ziel, das Fortschreiten der diabetischen Nephropathie zu verlangsamen<sup>42-44</sup>. Methoden zur Früherkennung sowie zum Nachweis des Fortschreitens der diabetischen Nephropathie fehlen jedoch gegenwärtig noch. In jüngster Zeit wurde der „CKD273“-Klassifikator beschrieben, der eine frühere Diagnose der diabetischen Nephropathie erlauben soll<sup>3</sup>. Um diesen Klassifikator zur Früherkennung der diabetischen Nephropathie (und anschließender Behandlung) einzusetzen, wurde die aus EU-Fördermitteln finanzierte Interventionsstudie "Proteomic Prediction and Renin Angiotensin Aldosterone System Inhibition Prevention Of Early Diabetic nephropathy In Type 2 Diabetic Patients With Normoalbuminuria" (PRIORITY) initiiert. Vor Beginn der Studie war es notwendig, eine multizentrische Anwendbarkeit des „CKD273“-Klassifikators zu prüfen. Daher wurde in dieser vorliegenden ergänzenden Studie zur PRIORITY-Studie erstmals der „CKD273“-Klassifikator in einer multizentrischen Kohorte (Proben von 165 Diabetes Typ II-Patienten aus neun verschiedenen Institutionen) validiert<sup>23</sup>. Das Studiendesign ist in **Abbildung 1** dargestellt.



**Abbildung 1:** Studiendesign der Publikation 1<sup>23</sup>. Der „CKD273“-Klassifikator wurde multizentrisch validiert. Zusätzlich wurde ein möglicher Einfluss der Lagerung sowie der Alters- und Geschlechtsabhängigkeit untersucht.

Im ersten Schritt wurde die Genauigkeit der Klassifikation mit dem „CKD273“-Klassifikator in neun unabhängigen Zentren untersucht. Es wurde eine konsistente Diskriminierung zwischen Patienten mit und ohne diabetischer Nephropathie in allen Zentren beobachtet (**Abbildung 2a**). Eine Statistik unter Einsatz von Grenzwertoptimierungskurven (ROC, engl. für: receiver operating characteristic) über sämtliche Proben resultierte in einem „area under the curve“ (AUC)-Wert von 0,95 (**Abbildung 2b**). In den einzelnen Zentren wurde eine hohe Konsistenz des „CKD273“-Klassifikators mit AUC-Werten von 0,95 bis 1,00 beobachtet.

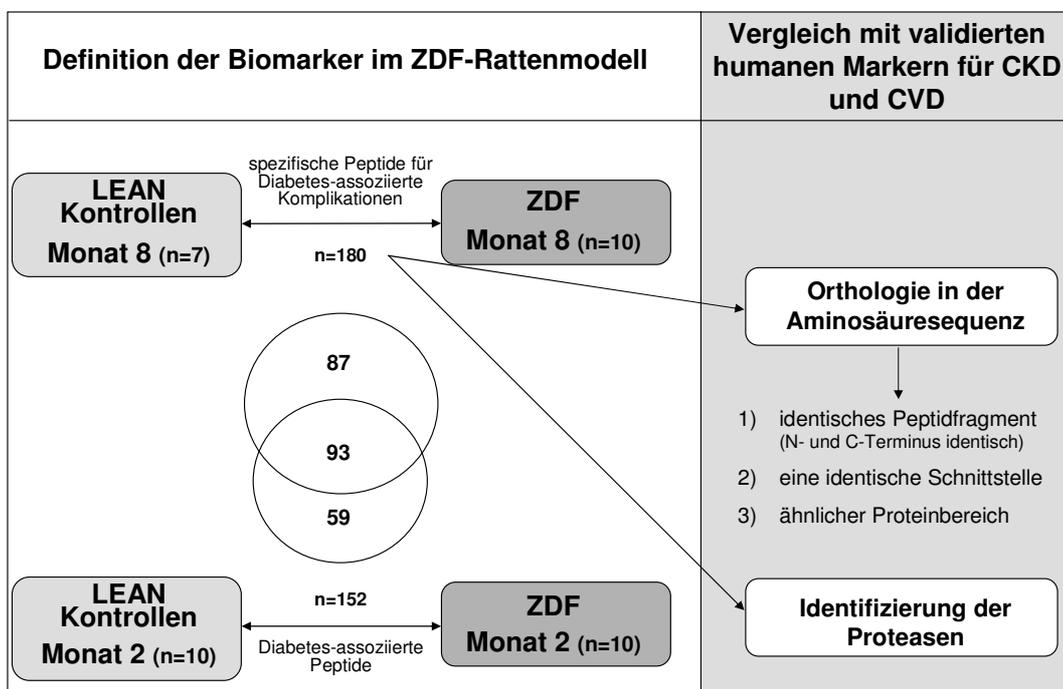


**Abbildung 2:** Klassifikationsergebnisse der Proben aus neun Zentren. a) Gezeigt sind „CKD273“-Klassifikationsfaktoren aller Patienten pro Zentrum. Die Klassifikationsfaktoren der Patienten mit diabetischer Nephropathie sind grau, ohne diabetische Nephropathie schwarz markiert. Der Diagnose-cut-off-Wert von 0,343 ist ebenfalls eingefügt. Die Zentren-Nummer ist auf der x-Achse angegeben (Details siehe Publikation 1). b) Die „Receiver Operating Characteristic“ (ROC)-Kurve stellt die Ergebnisse des „CKD273“-Klassifikators, basierend auf allen Proben (n = 165, AUC = 0,95), dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich der Einfluss des Alters und des Geschlechts der Patienten sowie der Einfluss von verschiedenen Probenbehältern auf die Klassifikation mit dem „CKD273“-Klassifikator untersucht. Der „CKD273“-Klassifikator war unabhängig von den erstgenannten Parametern. Darüber hinaus hatte die Verwendung von unterschiedlichen Urin-Lagerbehältern keinen Einfluss auf die Klassifikationsfaktoren gezeigt. Des Weiteren zeigte die Analyse der Verteilung der einzelnen, durch den „CKD273“-Klassifikator analysierten Peptide in den neun Zentren, dass die Fragmente von Blutproteinen und extrazellulären Matrixproteinen die beste Konsistenz aufwiesen.

#### 4.2 **Publikation 2: Urin Peptidom-basierte Evaluierung der ZDF-Ratten als ein Modell für humane Krankheiten**

Tiermodelle für Diabetes-assoziierte vaskuläre Komplikationen sind für die Beurteilung potenzieller therapeutischer Medikamente äußerst relevant. Obwohl mehrere Nagermodele für Typ II-Diabetes zur Verfügung stehen, ist deren Relevanz und Vergleichbarkeit mit den zusammenhängenden Komplikationen der Nieren- sowie Herz-Kreislauf-Funktionen bei Diabetes-Patienten nicht abschließend geklärt. In dieser Arbeit wurde daher das Tiermodell der „Zucker-Diabetic-Fatty“-Ratten für Diabetes-assoziierte vaskuläre Komplikationen<sup>26</sup> und Erkrankungen des Menschen auf molekularer Ebene mittels Urin-Proteomanalyse bewertet<sup>25</sup>. Das Studiendesign ist in **Abbildung 3** dargestellt.



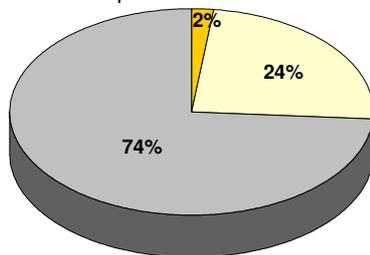
**Abbildung 3:** Studiendesign der Publikation 2<sup>25</sup>: Für die Definition der Biomarker wurden Urinproben von „Zucker-Diabetic-Fatty“ (ZDF)- und LEAN-Kontroll-Ratten verwendet. Die definierten ZDF-Ratten-Biomarker im späten Stadium der Krankheit wurden anhand der Aminosäuresequenzen mit Biomarkern bei humanen chronischen Nierenerkrankungen (CKD, engl. Für chronic kidney disease) und Herz-Kreislauf-Erkrankungen (CVD, engl. für cardiovascular disease) verglichen.

Die Peptidprofile der ZDF-Ratten in frühen und späten Stadien der Erkrankung wurden mit Peptidprofilen der LEAN-Ratten gleichen Alters verglichen. Dadurch wurden 180 Peptide identifiziert, die mit Komplikationen bei Diabetes mellitus potenziell assoziiert sind. Diese Peptide wurden mit menschlichen Biomarkern für chronische Nierenerkrankungen, die in dem „CKD273“-Klassifikator beinhaltet sind und Herz-Kreislauf-Erkrankungen (CVD, engl. für cardiovascular disease) verglichen. In Ratte und Mensch

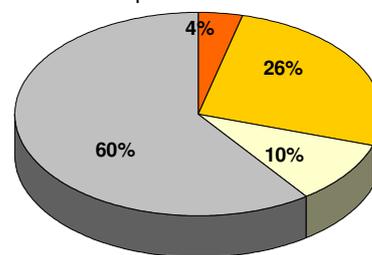
wurden Fragmente der Proteine beobachtet, die charakteristisch für chronische Nierenerkrankungen sind (z.B. Albumin,  $\alpha$ -1-Antitrypsin) oder mit der Krankheitsentwicklung (z.B. Kollagenbildung) assoziiert werden. Die Vergleichbarkeit der Aminosäuresequenz und der Regulierung dieser Peptide in Ratten gegenüber dem Menschen war ausgeprägter in den CVD- als in den CKD-Biomarkern (**Abbildung 4a**). Zusätzlich zeigten die krankheitsassoziierten Protease-Aktivitäten in ZDF-Ratten eine stärkere Übereinstimmung zu den vorhergesagten Aktivitäten bei menschlichen Herz-Kreislauf-Erkrankungen (**Abbildung 4b**).

a)

50 humane CKD-Marker im Vergleich mit den 180 Markern bei der ZDF-Ratte im späten Stadium

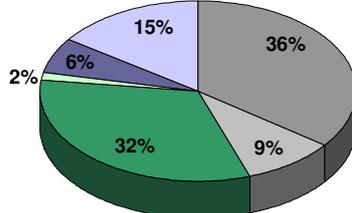


50 humane CVD-Marker im Vergleich mit den 180 Markern bei der ZDF-Ratte im späten Stadium

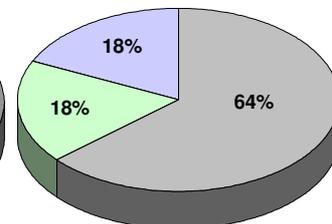


b)

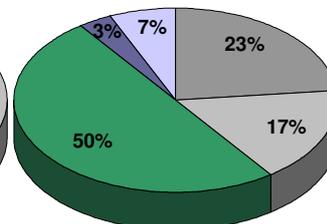
ZDF-Marker in spätem Stadium



Humane CKD-Marker



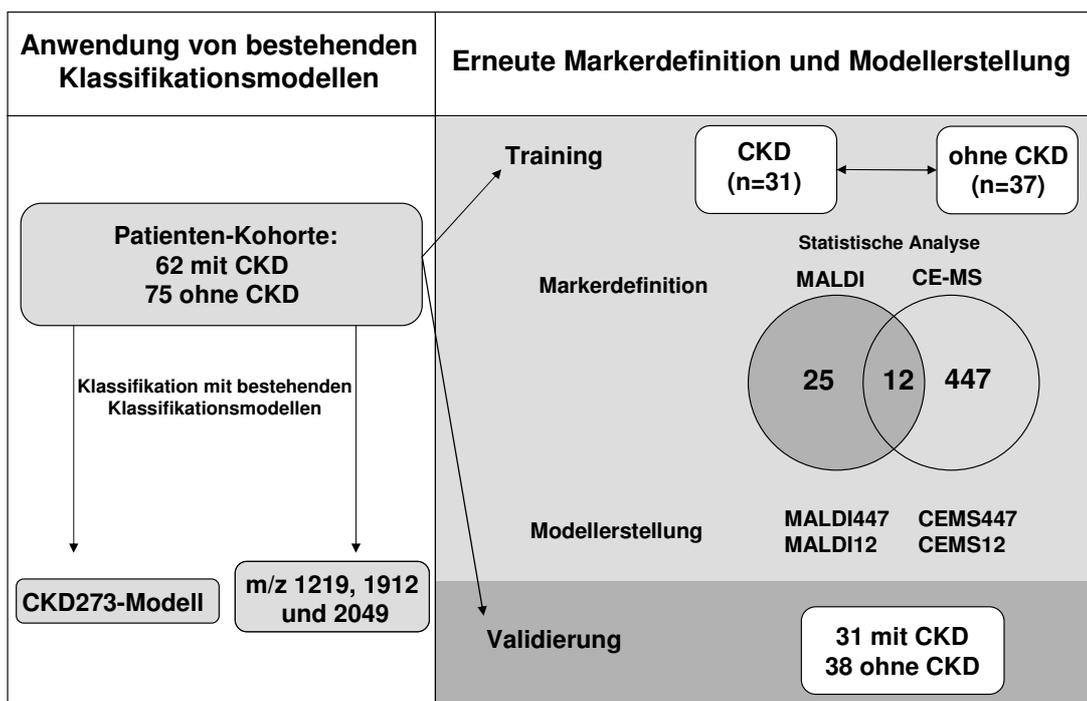
Humane CVD-Marker



**Abbildung 4:** Ähnlichkeiten in den Aminosäuresequenzen zwischen Biomarkern bei den Ratten sowie humanen Biomarkern mit vorhergesagten Protease-Aktivitäten. a) Aminosäure-Orthologie zwischen den 50 wichtigsten menschlichen Biomarkern für CKD und CVD und den definierten 180 Ratten-Biomarkern für Diabetes-assoziierte Komplikationen. Um die Orthologie zwischen humanen Biomarkern und Ratten-Biomarkern zu überprüfen, wurden drei Kriterien verwendet: 1. Das Fragment ist gleich (beide Schnittstellen identisch bei Mensch und Ratte); 2. eine identische Schnittstelle; 3. ein Peptidfragment aus dem gleichen Proteinbereich mit Überlappung von mindestens zwei Aminosäuren. b) Vorhergesagte Proteaseaktivitäten in Ratten und Menschen, basierend auf Kollagen alpha-1 Typ I-Biomarker-Fragmente. Dargestellt ist die relative Anzahl von spezifischen Schnittstellen für die entsprechende Protease.

### 4.3 **Publikation 3: Vergleich der MALDI-Massenspektrometrie und der Kapillarelektrophorese-gekoppelten Massenspektrometrie zur Bewertung von Biomarkern der diabetischen Nephropathie**

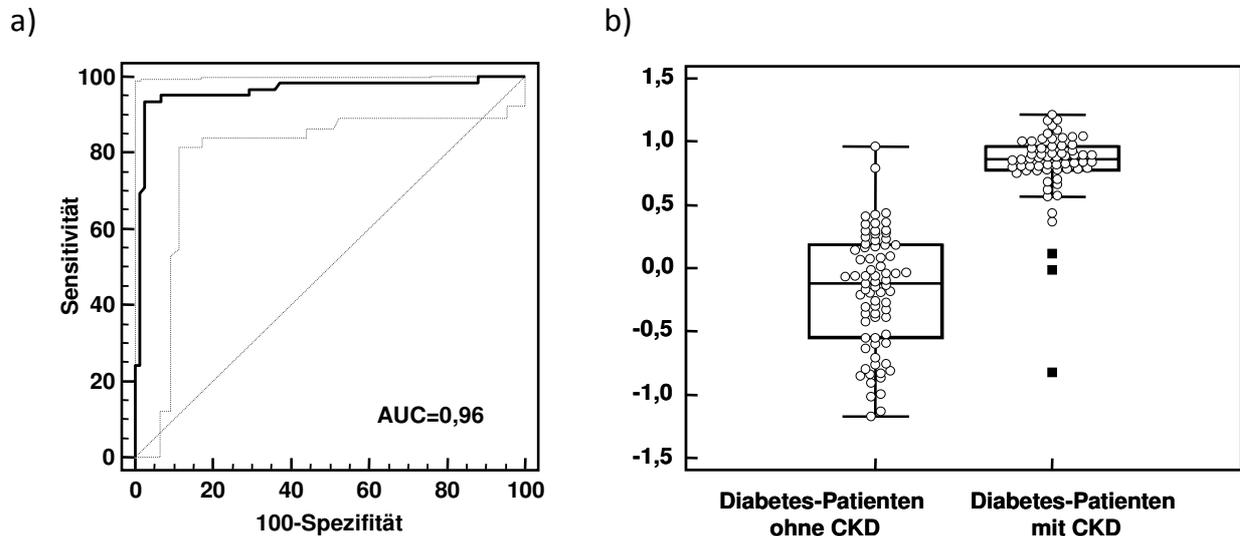
Bisher wurden unterschiedliche Plattformen in unabhängigen Studien verwendet, darunter meist die Kapillarelektrophorese-gekoppelte Massenspektrometrie<sup>3,5,16,29,30,33,35</sup>, die Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie<sup>45</sup>, sowie die MALDI-Massenspektrometrie<sup>46</sup>, um Biomarker für chronische Nierenkrankheiten zu definieren. In der Publikation 3 wurden die Leistungen der Kapillarelektrophorese-gekoppelten Massenspektrometrie und der MALDI-Massenspektrometrie zur Erkennung von diabetischen Nephropathien verglichen<sup>36</sup> (**Abbildung 5**). Hierzu wurde eine Kohorte von 137 Urinproben (62 Fall- und 75 Kontrollproben) verwendet. Übereinstimmende Datensätze zwischen den beiden Plattformen wurden für den Vergleich der erfassten Biomarker ermittelt.



**Abbildung 5:** Studiendesign der Publikation 3<sup>36</sup>. Im ersten Schritt (linker Teil der Abbildung) wurden die bereits definierten Klassifikationsmodelle auf die Kohorte von 137 Patienten angewendet. Danach wurde die Kohorte auf ein Trainings- und Validierungsset aufgeteilt. Für beide Plattformen, die Kapillarelektrophorese-gekoppelte Massenspektrometrie (CE-MS) und die MALDI-Massenspektrometrie (MALDI), wurden die Marker für chronische Nierenkrankheiten (CKD) neu definiert und validiert (rechter Teil der Abbildung).

Die Ergebnisse zeigten eine bessere Leistung der Kapillarelektrophorese-gekoppelten Massenspektrometrie in Hinblick auf die Peptid-Auflösung und die Vorhersagegenauigkeit der Erkrankung im Vergleich zur MALDI-Massenspektrometrie. In **Abbildung 6** sind

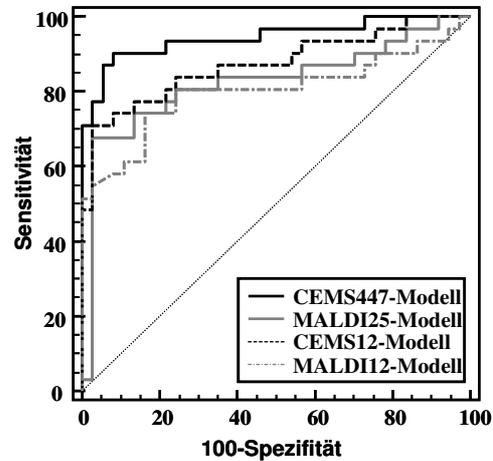
die Klassifikationsergebnisse des „CKD273“-Klassifikators in der verwendeten Kohorte dargestellt. Die Analyse ergab einen AUC-Wert von 0,96. Die mittels MALDI-Massenspektrometrie zuvor definierten drei Marker<sup>46</sup> resultierten in dieser neuen Kohorte in AUC-Werten von 0,76, 0,52 und 0,73.



**Abbildung 6:** Analyse der Klassifikationsfaktoren, die mit dem „CKD273“-Klassifikator (unter Einsatz der Kapillarelektrophorese-gekoppelte Massenspektrometrie) ermittelt wurden. a) „Receiver Operating Characteristic“ (ROC)-Kurve und b) Boxplot.

Im nächsten Schritt wurden die Proben auf ein Trainings- und Validierungsset aufgeteilt und die Marker für chronische Nierenkrankheiten in dieser Kohorte definiert und validiert. Für beide Plattformen wurden jeweils zwei Klassifikationsmodelle erstellt. Ein, was alle für die entsprechende Plattform definierten Biomarker beinhaltet. Bei Kapillarelektrophorese-gekoppelter Massenspektrometrie waren das 447 Biomarker (CEMS447-Modell) und bei MALDI-Massenspektrometrie 25 Biomarker (MALDI25-Modell). Das zweite Klassifikationsmodell wurde mit den 12 überlappenden Biomarkern erstellt, die in beiden Plattformen definiert wurden (CEMS12- und MALDI12-Modell). Die mittels MALDI-Massenspektrometrie erstellten Klassifikationsmodelle resultierten in AUC=0,83 (MALDI25-Modell) und 0,80 (MALDI12-Modell) in dem unabhängigen Testset (**Abbildung 7**). Die im Vergleich mittels Kapillarelektrophorese-gekoppelter Massenspektrometrie ermittelten Klassifikationsmodelle zeigten eine bessere Genauigkeit mit AUC=0,95 (CEMS447-Modell) und 0,87 (CEMS12-Modell). Die MALDI-Massenspektrometrie kann die Patienten mit diabetischer Nephropathie von den Kontrollen bei leicht reduzierter Genauigkeit, jedoch mit einem reduzierten Kosten- und Zeitaufwand, trennen (**Abbildung 7**). Das MALDI25-Modell klassifizierte die Testdaten mit einer Sensitivität von 71% und einer Spezifität von 87%. Um die Sensitivität zu

verbessern wurden alle hier falsch klassifizierten Kontrollen mittels Kapillarelektrophorese-gekoppelter Massenspektrometrie re-analysiert. Dieses Vorgehen ergab eine verbesserte Sensitivität von 90%.



**Abbildung 7:** „Receiver Operating Characteristic“ (ROC)-Kurve für die Differenzierung der Test-Kohorte mit neu definierten Biomarkern mittels Kapillarelektrophorese-gekoppelter Massenspektrometrie (schwarz) und MALDI-Massenspektrometrie (grau).

## 5 Diskussion

Für eine frühzeitige und erfolgreiche Therapie der diabetischen Nephropathie sind zwingend Biomarker zur Vorhersage der Erkrankung sowie zur Abbildung des Krankheitsverlaufs notwendig. Mittels des „CKD273“-Klassifikators<sup>3</sup> wird möglicherweise eine verbesserte nicht-invasive Früherkennung der diabetischen Nephropathie und eine bessere Prognosestellung durch einen früheren Therapieanfang ermöglicht. Ziel der vorliegenden Dissertation war daher eine umfassende Validierung dieses Klassifikators sowie eine Prüfung der Möglichkeiten zur Optimierung der Analysedurchführung.

Darüber hinaus dient die vorliegende Dissertation als eine der Vorarbeiten für die PRIORITY-Studie („**P**roteomic prediction and **R**enin angiotensin aldosterone system **I**nhibition prevention **O**f early diabetic nephropathy **I**n **T**ype 2 diabetic patients with normoalbuminuria“), die eine prospektive Untersuchung des Probenmaterials von Patienten mit Typ II-Diabetes auf diabetische Nephropathie mit dem „CKD273“-Klassifikator beabsichtigt, um bei einem positiven Befund mit einer entsprechenden Therapie den weiteren Fortschritt der diabetischen Nephropathie zu verzögern oder aufzuhalten.

Im Rahmen der Dissertation konnte gezeigt werden, dass der „CKD273“-Klassifikator bei der Aufklärung der Pathophysiologie der Krankheit<sup>3</sup> hilfreich sein kann. Mit diesem Klassifikator ist nicht nur eine frühzeitige Diagnosestellung, sondern auch eine Kontrolle der Krankheitsprozesse auf der Ebene der Urinpeptide offenbar möglich. Dieser Umstand könnte der Therapieentwicklung und -festlegung zukünftig dienlich sein.

Im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurde der „CKD273“-Klassifikator erstmalig auf eine multizentrische Kohorte von Proben aus unterschiedlichen internationalen Zentren angewendet. Dabei wurde nachgewiesen, dass der „CKD273“-Klassifikator in der Lage ist, Patienten aus verschiedenen Populationen mit gleicher Genauigkeit zu diagnostizieren. Sowohl das Alter als auch das Geschlecht der Patienten sowie verschiedene Lagerungsoptionen beeinflussten die Diagnoseergebnisse nicht.

Der „CKD273“-Klassifikator ist durch eine hohe Stabilität und Reproduzierbarkeit in der untersuchten multizentrischen Kohorte charakterisiert. Damit nähert sich der „CKD273“-Klassifikator der Definition eines „idealen Biomarkers“ nach Wasung et al. (2014)<sup>47</sup> an. Ein „idealer Biomarker“ sollte mit hoher Sensitivität als auch Spezifität bei verschiede-

nen Populationen anwendbar sein. Die angestrebte nicht-invasive Erhebung ist durch Urin als mögliches Probenmaterial gegeben. Des Weiteren sollte ein „idealer Biomarker“ nach Wasung et al.<sup>47</sup> mit der Schwere der Erkrankung korrelieren und rapide eine Nierenerkrankung abbilden. Für den „CKD273“-Klassifikator wurde letzteres durch Argiles et al.<sup>48</sup> gezeigt. Aussagen über eine mögliche Prognose sowie Hinweise auf mögliche Mechanismen der Schädigung durch Einsatz des Biomarkers sind nutzbringend<sup>47</sup>. Es wurde bereits bewiesen, dass der „CKD273“-Klassifikator zur Vorhersage von Nierenerkrankung geeignet ist<sup>21,48,49</sup>. Mögliche Erklärungen für pathophysiologische Mechanismen bei chronischen Nierenerkrankungen wurden von Good et al.<sup>3</sup> unter Einsatz des „CKD273“-Klassifikators beschrieben.

Ein „idealer Biomarker“ darf des Weiteren keine Wechselwirkungen mit Arzneimitteln<sup>50</sup> aufweisen und muss über die Zeit und in verschiedenen Lagerungsmethoden stabil bleiben<sup>47</sup>. Die fehlende Wechselwirkungen des „CKD273“-Klassifikators mit Arzneimitteln konnte bereits in einer früheren Studie gezeigt werden<sup>50</sup>. In dieser Arbeit konnte die Stabilität bei einer Lagerung des Probenmaterials in zwei verschiedenen Gefäßen nachgewiesen werden.

Die Unabhängigkeit der Ergebnisse des „CKD273“-Klassifikators vom Geschlecht und Alter der Patienten stellt zusätzlich zur früheren Diagnosestellung einen entscheidenden Vorteil zur glomerulären Filtrationsrate (GFR) dar. Die GFR zeigt eine starke Abhängigkeit sowohl vom Alter als auch vom Geschlecht<sup>51,52</sup>. Zudem ist eine hohe interindividuelle Variabilität bei den ersten Stadien der Erkrankung für die GFR aber auch für Albumin ein limitierender Faktor<sup>53</sup>. Darüber hinaus wurden bereits weitere technische Aspekte untersucht<sup>50</sup>. Mischak et al.<sup>50</sup> beschreiben die Temperaturstabilität, Einfrier- und Auftauzyklen, die Stabilität nach Präparation, die Reproduzierbarkeit, Laborpräzision und den zeitlichen Verlauf des „CKD273“-Klassifikators. Die relative Intra- und Inter-Assay-Standardabweichung des Klassifikators liegt unter 7% und 10%<sup>50</sup>.

Für die Entwicklung der therapeutischen Intervention sind Tiermodelle weiterhin essentiell<sup>25</sup>. Eine Vielzahl von Tiermodellen werden als konventionelle Modelle für Typ I- oder Typ II-Diabetes entwickelt, die wiederum nicht die spezifischen Komplikationen bei Diabetes aufzeigen können<sup>54</sup>. Ein passendes Tiermodell soll aber entweder so gut wie möglich die Pathophysiologie des Diabetes widerspiegeln oder die mit humanen Diabe-

tes assoziierten Komplikationen vergleichbare Konditionen aufweisen<sup>55</sup>. Insbesondere für die diabetische Nephropathie ist die Suche nach einem geeigneten Tiermodell daher noch nicht abgeschlossen. Es scheint kein einzelnes Tiermodell, das sämtliche Eigenschaften dieser sehr komplexen Erkrankung abbildet, zu existieren. Es gibt aber viele, die sehr gut einzelne Aspekte der humanen Erkrankung adressieren<sup>55</sup>. Im zweiten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurden daher in ZDF-Ratten für die diabetische Nephropathie spezifische Peptide im Spätstadium der Erkrankung neu definiert. Im Anschluss wurde die Orthologie zwischen diesen Peptiden und den humanen Peptiden aus dem „CKD273“-Klassifikator untersucht. Das untersuchte ZDF-Rattenmodell zeigte keine überzeugende Orthologie zu dem „CKD273“-Klassifikator. Einige der detektierten Peptide des Rattenmodells sind jedoch mit progressiver Arteriosklerose assoziiert. Zum Beispiel  $\alpha$ -2-HS-Glycoprotein, das auch als Fetuin-A<sup>56</sup> bekannt ist, bildet lösliche Komplexe von ansonsten unlöslichem Calciumphosphat und wirkt als ein potenter Inhibitor der pathologischen Verkalkung. Zusätzlich scheint Fetuin-A bei der Progression der Koronarsklerose beteiligt zu sein<sup>57</sup>. Die Überlappung zwischen den menschlichen Biomarkern für makrovaskuläre Erkrankungen und den im ZDF-Rattenmodell definierten Biomarkern war erheblich, da mehrere ähnliche Peptide identifiziert wurden, die als Biomarker in beiden Fällen dienen. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Toblli et al.<sup>58</sup> überein. Insgesamt scheinen ZDF-Ratten ein attraktives Tiermodell zur Untersuchung von Herz-Kreislauf-Schäden, die dem menschlichen metabolischen Syndrom entsprechen, darzustellen. Des Weiteren zeigten Oltman et al.<sup>59</sup>, dass die vaskuläre Dysfunktion bei ZDF-Ratten in koronaren und mesenterialen Arterien fortschreitet und arterielle Veränderungen verursacht. Die Analyse der involvierten Proteasen im ZDF-Rattenmodell zeigte auch eine höhere Vergleichbarkeit mit menschlichen kardiovaskulären Erkrankungen als chronischen Nierenerkrankungen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine erhöhte Matrix-Metallopeptidase-Aktivität bei Ratten wie bei menschlichen kardiovaskulären Erkrankungen festgestellt<sup>60</sup>. Eine erhöhte Aktivität der Matrix-Metallopeptidase-13 wurde bereits bei arteriosklerotischen Maus-Plaques beschrieben<sup>61</sup>. Bei der chronischen Nierenerkrankung des Menschen beobachtet man im Gegensatz eine erniedrigte Matrix-Metallopeptidase-Aktivität<sup>3</sup>.

Obwohl die Daten der vorliegenden Dissertation andeuten, dass das ZDF-Rattenmodell eher zur Untersuchung makrovaskulärer Erkrankungen und weniger zur Bewertung mikrovaskulärer Erkrankungen geeignet scheint, zeigt diese Studie das Potential der Proteomanalyse zur Beurteilung der Vergleichbarkeit zwischen einem Tiermodell und

humanen Erkrankungen auf der molekularen Ebene. Die Vergleichbarkeit zwischen Tier und Mensch ist bei der Entwicklung und Verwendung von zukünftigen Tiermodellen auch für andere humane Erkrankungen von großer Relevanz. Diese Arbeit legt daher den Grundstein zur Etablierung von entsprechenden Tiermodellen und erhöht die Übertragbarkeit der im Tiermodell ermittelten Ergebnisse auf die Erkrankung beim Menschen. Auf der anderen Seite zeigt die Studie die Komplexität der Diabetes-Endorgan-Krankheit und verweist auf den Bedarf an weiteren Tiermodellen mit verstärkter Analogie zur humanen diabetischen Nephropathie.

Im dritten Abschnitt dieser Dissertation wurde die Möglichkeit zur Übertragung des „CKD273“-Klassifikators auf die MALDI-Massenspektrometrie überprüft. Mehrere Studien bestätigen, dass sich die Kapillarelektrophorese-gekoppelte Massenspektrometrie sehr gut für die Definition von Biomarkern geeignet ist<sup>5,8,16,17,29-35</sup>. Obwohl die Analyse mit Kapillarelektrophorese-gekoppelter Massenspektrometrie innerhalb von 60 Minuten möglich ist, ist eine Optimierung des Zeit- und damit auch des Kostenaufwands wünschenswert. Daher wurde im Rahmen der Arbeit versucht, das „CKD273“-Klassifikator auf eine andere Technologieplattform zu übertragen, die bei der Analyse weniger Zeit und geringere Kosten verursacht. Verwendet wurde die MALDI-Massenspektrometrie wo mehrere Proben hintereinander auf einem Target analysiert werden können, was die Analysezeit reduziert. Mit dem Analysezeit werden gleichzeitig schon die Kosten reduziert. Zusätzlich können die sinken Kosten durch niedrigeren Chemikalienverbrauch und Wiederverwendbarkeit von der Targets. Es konnte gezeigt werden, dass die MALDI-Massenspektrometrie, einsatzfähig ist, jedoch dabei eine signifikant geringere Sensitivität in Vergleich zu Kapillarelektrophorese-gekoppelter Massenspektrometrie aufweist. Im direkten Vergleich mit der Kapillarelektrophorese-gekoppelten Massenspektrometrie kann die MALDI-Massenspektrometrie nach dem heutigen Ergebnisstand gegebenenfalls als Präscreening-Methode angewendet werden. Die mittels MALDI-Massenspektrometrie als „gesund“ klassifizierten Proben bedürfen dann jedoch einer Reanalyse mit der Kapillarelektrophorese-gekoppelten Massenspektrometrie. Diese Vorgehensweise zeigt eine verbesserte Sensitivität, aber eine schlechtere Spezifität im Vergleich zur Kapillarelektrophorese-gekoppelten Massenspektrometrie als alleinige Methode. Aus diesem Grund sind weitere Optimierungsschritte, wie beispielsweise eine Fraktionierung der Proben vor der MALDI-massenspektrometrischen Analyse und/oder Optimierung des cut-offs notwendig, um eine effektive Kopplung der zwei Verfahren zu

gewährleisten. Zusätzlich ist eine größere prospektive Kohorte nötig, um diese Präscreening-Methode zu validieren.

Schlussfolgernd lässt sich festhalten, dass der „CKD273“-Klassifikator in multizentrischen Studien verwendbar und als Untersuchungsmodell für die PRIORITY-Studie valide ist. Das ZDF-Rattenmodell ist nur begrenzt zur Abbildung der diabetischen Nephropathie geeignet. Es ist vorrangig zur Untersuchung makrovaskulärer Erkrankungen in diesem Zusammenhang dienlich. Darüber hinaus kann der „CKD273“-Klassifikator verwendet werden, um Tiermodelle hinsichtlich ihrer Fähigkeit, die diabetische Nephropathie beim Menschen abbilden zu können, zu beurteilen. Der praktische Einsatz der MALDI-Massenspektrometrie ist als ein schnelles und kostengünstiges Präscreening-Tool zur Diagnose von chronischer Nierenerkrankung denkbar. Die Übertragung des „CKD273“-Klassifikators auf diese Technologie bedarf jedoch zukünftig weiterer Optimierungsschritte.

## 6 Literatur

1. Hallan, S. I.; Coresh, J.; Astor, B. C.; Asberg, A.; Powe, N. R.; Romundstad, S.; Hallan, H. A.; Lydersen, S.; Holmen, J. International comparison of the relationship of chronic kidney disease prevalence and ESRD risk. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2006**, *17* (8), 2275-2284.
2. Alebiosu, C. O.; Ayodele, O. E. The global burden of chronic kidney disease and the way forward. *Ethn. Dis.* **2005**, *15* (3), 418-423.
3. Good, D. M.; Zürbig, P.; Argiles, A.; Bauer, H. W.; Behrens, G.; Coon, J. J.; Dakna, M.; Decramer, S.; Delles, C.; Dominiczak, A. F.; Ehrich, J. H.; Eitner, F.; Fliser, D.; Frommberger, M.; Ganser, A.; Girolami, M. A.; Golovko, I.; Gwinner, W.; Haubitz, M.; Herget-Rosenthal, S.; Jankowski, J.; Jahn, H.; Jerums, G.; Julian, B. A.; Kellmann, M.; Kliem, V.; Kolch, W.; Krolewski, A. S.; Luppi, M.; Massy, Z.; Melter, M.; Neusus, C.; Novak, J.; Peter, K.; Rossing, K.; Rupperecht, H.; Schanstra, J. P.; Schiffer, E.; Stolzenburg, J. U.; Tarnow, L.; Theodorescu, D.; Thongboonkerd, V.; Vanholder, R.; Weissinger, E. M.; Mischak, H.; Schmitt-Kopplin, P. Naturally occurring human urinary peptides for use in diagnosis of chronic kidney disease. *Mol. Cell Proteomics* **2010**, *9* (11), 2424-2437.
4. Fioretto, P.; Steffes, M. W.; Mauer, M. Glomerular structure in nonproteinuric IDDM patients with various levels of albuminuria. *Diabetes* **1994**, *43* (11), 1358-1364.
5. Rossing, K.; Mischak, H.; Dakna, M.; Zürbig, P.; Novak, J.; Julian, B. A.; Good, D. M.; Coon, J. J.; Tarnow, L.; Rossing, P. Urinary proteomics in diabetes and CKD. *J Am Soc Nephrol.* **2008**, *19* (7), 1283-1290.
6. Neuhoff, N.; Kaiser, T.; Wittke, S.; Krebs, R.; Pitt, A.; Burchard, A.; Sundmacher, A.; Schlegelberger, B.; Kolch, W.; Mischak, H. Mass spectrometry for the detection of differentially expressed proteins: a comparison of surface-enhanced laser desorption/ionization and capillary electrophoresis/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2004**, *18* (2), 149-156.
7. Schiffer, E.; Mischak, H.; Novak, J. High resolution proteome/peptidome analysis of body fluids by capillary electrophoresis coupled with MS. *Proteomics.* **2006**, *6* (20), 5615-5627.
8. Decramer, S.; Gonzalez de, P. A.; Breuil, B.; Mischak, H.; Monsarrat, B.; Bascands, J. L.; Schanstra, J. P. Urine in clinical proteomics. *Mol Cell Proteomics* **2008**, *7* (10), 1850-1862.
9. Thongboonkerd, V.; Malasit, P. Renal and urinary proteomics: current applications and challenges. *Proteomics.* **2005**, *5* (4), 1033-1042.
10. Decramer, S.; Wittke, S.; Mischak, H.; Zürbig, P.; Walden, M.; Bouissou, F.; Bascands, J. L.; Schanstra, J. P. Predicting the clinical outcome of con-

genital unilateral ureteropelvic junction obstruction in newborn by urinary proteome analysis. *Nat. Med.* **2006**, *12* (4), 398-400.

11. Haubitz, M.; Wittke, S.; Weissinger, E. M.; Walden, M.; Rupprecht, H. D.; Floege, J.; Haller, H.; Mischak, H. Urine protein patterns can serve as diagnostic tools in patients with IgA nephropathy. *Kidney Int.* **2005**, *67* (6), 2313-2320.
12. Haubitz, M.; Good, D. M.; Woywodt, A.; Haller H; Rupprecht, H.; Theodorescu, D.; Dakna, M.; Coon, J. J.; Mischak, H. Identification and validation of urinary biomarkers for differential diagnosis and dvaluation of therapeutic intervention in ANCA associated vasculitis. *Mol. Cell. Proteomics* **2009**, *8*, 2296-2307.
13. Rossing, K.; Mischak, H.; Parving, H. H.; Christensen, P. K.; Walden, M.; Hillmann, M.; Kaiser, T. Impact of diabetic nephropathy and angiotensin II receptor blockade on urinary polypeptide patterns. *Kidney Int.* **2005**, *68* (1), 193-205.
14. Theodorescu, D.; Fliser, D.; Wittke, S.; Mischak, H.; Krebs, R.; Walden, M.; Ross, M.; Eltze, E.; Bettendorf, O.; Wulfing, C.; Semjonow, A. Pilot study of capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry as a tool to define potential prostate cancer biomarkers in urine. *Electrophoresis* **2005**, *26* (14), 2797-2808.
15. Theodorescu, D.; Wittke, S.; Ross, M. M.; Walden, M.; Conaway, M.; Just, I.; Mischak, H.; Frierson, H. F. Discovery and validation of new protein biomarkers for urothelial cancer: a prospective analysis. *Lancet Oncol* **2006**, *7* (3), 230-240.
16. Weissinger, E. M.; Wittke, S.; Kaiser, T.; Haller, H.; Bartel, S.; Krebs, R.; Golovko, I.; Rupprecht, H. D.; Haubitz, M.; Hecker, H.; Mischak, H.; Fliser, D. Proteomic patterns established with capillary electrophoresis and mass spectrometry for diagnostic purposes. *Kidney Int.* **2004**, *65* (6), 2426-2434.
17. Weissinger, E. M.; Schiffer, E.; Hertenstein, B.; Ferrara, J. L.; Holler, E.; Stadler, M.; Kolb, H. J.; Zander, A.; Zürbig, P.; Kellmann, M.; Ganser, A. Proteomic patterns predict acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* **2007**, *109* (12), 5511-5519.
18. Girolami, M.; Mischak, H.; Krebs, R. Analysis of complex, multidimensional datasets. *Drug Discov Today: Technologies* **2006**, *3* (1), 13-19.
19. Yang, Z. R.; Chou, K. C. Bio-support vector machines for computational proteomics. *Bioinformatics* **2004**, *20* (5), 735-741.
20. Yang, Z. R. Biological applications of support vector machines. *Brief. Bioinform.* **2004**, *5* (4), 328-338.
21. Roscioni, S. S.; de, Z. D.; Hellemons, M. E.; Mischak, H.; Zurbig, P.; Bakker, S. J.; Gansevoort, R. T.; Reinhard, H.; Persson, F.; Lajer, M.; Rossing, P.;

- Heerspink, H. J. A urinary peptide biomarker set predicts worsening of albuminuria in type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* **2012**, *56* (2), 259-267.
22. Zürbig, P.; Jerums, G.; Hovind, P.; Maclsaac, R.; Mischak, H.; Nielsen, S. E.; Panagiotopoulos, S.; Persson, F.; Rossing, P. Urinary Proteomics for Early Diagnosis in Diabetic Nephropathy. *Diabetes* **2012**, *61* (12), 3304-3313.
  23. Siwy, J.; Schanstra, J. P.; Argiles, A.; Bakker, S. J.; Beige, J.; Boucek, P.; Brand, K.; Delles, C.; Durantou, F.; Fernandez-Fernandez, B.; Jankowski, M. L.; Al, K. M.; Kunt, T.; Lajer, M.; Lichtinghagen, R.; Lindhardt, M.; Maahs, D. M.; Mischak, H.; Mullen, W.; Navis, G.; Noutsou, M.; Ortiz, A.; Persson, F.; Petrie, J. R.; Roob, J. M.; Rossing, P.; Ruggenenti, P.; Rychlik, I.; Serra, A. L.; Snell-Bergeon, J.; Spasovski, G.; Stojceva-Taneva, O.; Trillini, M.; von der, L. H.; Winklhofer-Roob, B. M.; Zurbig, P.; Jankowski, J. Multicentre prospective validation of a urinary peptidome-based classifier for the diagnosis of type 2 diabetic nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2014**.
  24. Yokoi, N.; Hoshino, M.; Hidaka, S.; Yoshida, E.; Beppu, M.; Hoshikawa, R.; Sudo, K.; Kawada, A.; Takagi, S.; Seino, S. A Novel Rat Model of Type 2 Diabetes: The Zucker Fatty Diabetes Mellitus ZFDM Rat. *J. Diabetes Res.* **2013**, *2013*, 103731.
  25. Siwy, J.; Zoja, C.; Klein J.; Benigni, A.; Mullen, W.; Mayer, B.; Mischak, H.; Jankowski, J.; Stevens, R.; Vlahou, A.; Kossida, S.; Perco, P.; Bahlmann, F. Evaluation of the Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rat as a model for human disease based on urinary peptidomic profiles. *PLoS One* **2012**, *7* (12), e51334.
  26. Kurtz, T. W.; Morris, R. C.; Pershadsingh, H. A. The Zucker fatty rat as a genetic model of obesity and hypertension. *Hypertension* **1989**, *13* (6 Pt 2), 896-901.
  27. Zoja, C.; Cattaneo, S.; Fiordaliso, F.; Lionetti, V.; Zambelli, V.; Salio, M.; Corna, D.; Pagani, C.; Rottoli, D.; Bisighini, C.; Remuzzi, G.; Benigni, A. Distinct cardiac and renal effects of ETA receptor antagonist and ACE inhibitor in experimental type 2 diabetes. *Am. J. Physiol Renal Physiol* **2011**, *301* (5), F1114-F1123.
  28. Chatzigeorgiou, A.; Halapas, A.; Kalafatakis, K.; Kamper, E. The use of animal models in the study of diabetes mellitus. *In Vivo* **2009**, *23* (2), 245-258.
  29. Chalmers, M. J.; Mackay, C. L.; Hendrickson, C. L.; Wittke, S.; Walden, M.; Mischak, H.; Fliser, D.; Just, I.; Marshall, A. G. Combined top-down and bottom-up mass spectrometric approach to characterization of biomarkers for renal disease. *Anal. Chem.* **2005**, *77* (22), 7163-7171.
  30. Fliser, D.; Novak, J.; Thongboonkerd, V.; Argiles, A.; Jankowski, V.; Girolami, M.; Jankowski, J.; Mischak, H. Advances in urinary proteome analysis and biomarker discovery. *J Am Soc Nephrol.* **2007**, *18* (4), 1057-1071.

31. Kistler, A. D.; Siwy, J.; Breunig, F.; Jeevaratnam, P.; Scherl, A.; Mullen, W.; Warnock, D. G.; Wanner, C.; Hughes, D. A.; Mischak, H.; Wuthrich, R. P.; Serra, A. L. A distinct urinary biomarker pattern characteristic of female Fabry patients that mirrors response to enzyme replacement therapy. *PLoS ONE*. **2011**, *6* (6), e20534.
32. Kistler, A. D.; Serra, A. L.; Siwy, J.; Poster, D.; Krauer, F.; Torres, V. E.; Mrug, M.; Grantham, J. J.; Bae, K. T.; Bost, J. E.; Mullen, W.; Wuthrich, R. P.; Mischak, H.; Chapman, A. B. Urinary proteomic biomarkers for diagnosis and risk stratification of autosomal dominant polycystic kidney disease: a multicentric study. *PLoS One* **2013**, *8* (1), e53016.
33. Mischak, H.; Coon, J. J.; Novak, J.; Weissinger, E. M.; Schanstra, J. P.; Dominiczak, A. F. Capillary electrophoresis-mass spectrometry as a powerful tool in biomarker discovery and clinical diagnosis: An update of recent developments. *Mass Spectrom. Rev.* **2009**, *28* (5), 703-724.
34. Schiffer, E.; Vlahou, A.; Petrolekas, A.; Stravodimos, K.; Tauber, R.; Geschwend, J. E.; Neuhaus, J.; Stolzenburg, J. U.; Conaway, M. R.; Mischak, H.; Theodorescu, D. Prediction of muscle-invasive bladder cancer using urinary proteomics. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15* (15), 4935-4943.
35. Snell-Bergeon, J. K.; Maahs, D. M.; Ogden, L. G.; Kinney, G. L.; Hokanson, J. E.; Schiffer, E.; Rewers, M.; Mischak, H. Evaluation of urinary biomarkers for coronary artery disease, diabetes, and diabetic kidney disease. *Diabetes Technol. Ther.* **2009**, *11* (1), 1-9.
36. Molin, L.; Seraglia, R.; Lapolla, A.; Ragazzi, E.; Gonzalez, J.; Vlahou, A.; Schanstra, J. P.; Albalat, A.; Dakna, M.; Siwy, J.; Jankowski, J.; Bitsika, V.; Mischak, H.; Zurbig, P.; Traldi, P. A comparison between MALDI-MS and CE-MS data for biomarker assessment in chronic kidney diseases. *J Proteomics* **2012**, *75* (18), 5888-5897.
37. Jantos-Siwy, J.; Schiffer, E.; Brand, K.; Schumann, G.; Rossing, K.; Delles, C.; Mischak, H.; Metzger, J. Quantitative Urinary Proteome Analysis for Biomarker Evaluation in Chronic Kidney Disease. *J. Proteome. Res.* **2009**, *8* (1), 268-281.
38. Rouse, R.; Siwy, J.; Mullen, W.; Mischak, H.; Metzger, J.; Hanig, J. Proteomic candidate biomarkers of drug-induced nephrotoxicity in the rat. *PLoS One* **2012**, *7* (4), e34606.
39. Xia, J.; Wishart, D. S. Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst. *Nat. Protoc.* **2011**, *6* (6), 743-760.
40. Reiner, A.; Yekutieli, D.; Benjamini, Y. Identifying differentially expressed genes using false discovery rate controlling procedures. *Bioinformatics.* **2003**, *19* (3), 368-375.
41. DeLeo, J. M. DeLeo, J.M. Receiver operating characteristic laboratory (ROCLAB): Software for developing decision strategies that account for

uncertainty. Second International Symposium on Uncertainty Modeling and Analysis: College Park, MD, USA, 1993; pp 318-325.

42. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. UK Prospective Diabetes Study Group. *BMJ* **1998**, *317* (7160), 703-713.
43. Brenner, B. M.; Cooper, M. E.; de Zeeuw, D.; Keane, W. F.; Mitch, W. E.; Parving, H. H.; Remuzzi, G.; Snapinn, S. M.; Zhang, Z.; Shahinfar, S. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N. Engl. J Med.* **2001**, *345* (12), 861-869.
44. Lewis, E. J.; Hunsicker, L. G.; Bain, R. P.; Rohde, R. D. The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N. Engl. J Med.* **1993**, *329* (20), 1456-1462.
45. Zhou, H.; Hoek, M.; Yi, P.; Rohm, R. J.; Mahsut, A.; Brown, P.; Saunders, J.; Chmielowski, R. A.; Ren, N.; Shuster, D.; Southwick, K.; Ayanoglu, G.; Gorman, D.; Laface, D.; Santino, S.; Conway, J.; Liu, Z.; Cully, D.; Cleary, M.; Roddy, T. P.; Blom, D. Rapid detection and quantification of apolipoprotein L1 genetic variants and total levels in plasma by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2013**, *27* (23), 2639-2647.
46. Lapolla, A.; Seraglia, R.; Molin, L.; Williams, K.; Cosma, C.; Reitano, R.; Sechi, A.; Ragazzi, E.; Traldi, P. Low molecular weight proteins in urines from healthy subjects as well as diabetic, nephropathic and diabetic-nephropathic patients: a MALDI study. *J Mass Spectrom.* **2009**, *44* (3), 419-425.
47. Wasung, M. E.; Chawla, L. S.; Madero, M. Biomarkers of renal function, which and when? *Clin. Chim. Acta* **2014**.
48. Argiles, A.; Siwy, J.; Durantou, F.; Gayraud, N.; Dakna, M.; Lundin, U.; Osaba, L.; Delles, C.; Mourad, G.; Weinberger, K. M.; Mischak, H. CKD273, a New Proteomics Classifier Assessing CKD and Its Prognosis. *PLoS One* **2013**, *8* (5), e62837.
49. Zürlbig, P.; Mischak, H.; Conrads, S. Urinary proteome analysis for early diagnosis of diabetes and its complications. *Diabetes Stoffwechsel und Herz* **2009**, *18* (6), 483-494.
50. Mischak, H.; Vlahou, A.; Ioannidis, J. P. Technical aspects and inter-laboratory variability in native peptide profiling: The CE-MS experience. *Clin. Biochem.* **2013**, *46* (6), 432-443.
51. Eriksen, B. O.; Ingebretsen, O. C. The progression of chronic kidney disease: a 10-year population-based study of the effects of gender and age. *Kidney Int.* **2006**, *69* (2), 375-382.

52. Khatami, Z.; Handley, G.; Narayanan, K.; Weaver, J. U. Applicability of estimated glomerular filtration rate in stratifying chronic kidney disease. *Scand. J. Clin. Lab Invest* **2007**, *67* (3), 297-305.
53. Miller, W. G.; Bruns, D. E.; Hortin, G. L.; Sandberg, S.; Aakre, K. M.; McQueen, M. J.; Itoh, Y.; Lieske, J. C.; Seccombe, D. W.; Jones, G.; Bunk, D. M.; Curhan, G. C.; Narva, A. S. Current issues in measurement and reporting of urinary albumin excretion. *Clin. Chem.* **2009**, *55* (1), 24-38.
54. Islam, M. S. Animal models of diabetic neuropathy: progress since 1960s. *J. Diabetes Res.* **2013**, *2013*, 149452.
55. Cefalu, W. T. Animal models of type 2 diabetes: clinical presentation and pathophysiological relevance to the human condition. *ILAR. J.* **2006**, *47* (3), 186-198.
56. Westenfeld, R.; Schafer, C.; Kruger, T.; Haarmann, C.; Schurgers, L. J.; Reutelingsperger, C.; Ivanovski, O.; Drueke, T.; Massy, Z. A.; Ketteler, M.; Floege, J.; Jahnke-Dechent, W. Fetuin-A protects against atherosclerotic calcification in CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2009**, *20* (6), 1264-1274.
57. Voros, K.; Graf, L., Jr.; Prohaszka, Z.; Graf, L.; Szenthe, P.; Kaszas, E.; Borocz, Z.; Cseh, K.; Kalabay, L. Serum fetuin-A in metabolic and inflammatory pathways in patients with myocardial infarction. *Eur. J. Clin. Invest* **2011**, *41* (7), 703-709.
58. Toblli, J.; Cao, G.; Rivas, C.; Munoz, M.; Giani, J.; Dominici, F.; Angerosa, M. Cardiovascular protective effects of nebivolol in Zucker diabetic fatty rats. *J. Hypertens.* **2010**, *28* (5), 1007-1019.
59. Oltman, C. L.; Richou, L. L.; Davidson, E. P.; Coppey, L. J.; Lund, D. D.; Yorek, M. A. Progression of coronary and mesenteric vascular dysfunction in Zucker obese and Zucker diabetic fatty rats. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **2006**, *291* (4), H1780-H1787.
60. Delles, C.; Schiffer, E.; von Zur, M. C.; Peter, K.; Rossing, P.; Parving, H. H.; Dymott, J. A.; Neisius, U.; Zimmerli, L. U.; Snell-Bergeon, J. K.; Maahs, D. M.; Schmieder, R. E.; Mischak, H.; Dominiczak, A. F. Urinary proteomic diagnosis of coronary artery disease: identification and clinical validation in 623 individuals. *J. Hypertens.* **2010**, *28* (11), 2316-2322.
61. Deguchi, J. O.; Aikawa, E.; Libby, P.; Vachon, J. R.; Inada, M.; Krane, S. M.; Whittaker, P.; Aikawa, M. Matrix metalloproteinase-13/collagenase-3 deletion promotes collagen accumulation and organization in mouse atherosclerotic plaques. *Circulation* **2005**, *112* (17), 2708-2715.

## 7 Anhang

### 7.1 Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Justyna Siwy hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

**Publikation 1: Siwy J**, Schanstra JP, Argiles A, Bakker SJ, Beige J, Boucek P, Brand K, Delles C, Durantou F, Fernandez-Fernandez B, Jankowski ML, Al Khatib M, Kunt T, Lajer M, Lichtinghagen R, Lindhardt M, Maahs DM, Mischak H, Mullen W, Navis G, Noutsou M, Ortiz A, Persson F, Petrie JR, Roob JM, Rossing P, Ruggenenti P, Rychlik I, Serra AL, Snell-Bergeon J, Spasovski G, Stojceva-Taneva O, Trillini M, von der Leyen H, Winklhofer-Roob BM, Zürlbig P, *Jankowski J.*, Multicentre prospective validation of a urinary peptidome-based classifier for the diagnosis of type 2 diabetic nephropathy, *Nephrol Dial Transplant.*, 2014

Beitrag im Einzelnen: Entwurf der Studienprotokoll / Beteiligung an experimentellen Arbeiten / Datenprozessierung / Auswertung der Daten/ statistische Analysen / Verfassen der Publikation

**Publikation 2: Siwy J**, Zoja C, Klein J, Benigni A, Mullen W, Mayer B, Mischak H, *Jankowski J*, Stevens R, Vlahou A, Kossida S, Perco P, Bahlmann FH., Evaluation of the Zucker diabetic fatty (ZDF) rat as a model for human disease based on urinary peptidomic profiles, *PLoS One*, 2012

Beitrag im Einzelnen: Entwurf der Studienprotokoll / Beteiligung an experimentellen Arbeiten / Datenprozessierung, Auswertung und statistische Analysen der Proteomdaten/ Bestimmung der Orthologie zwischen human und Ratte / Verfassen der Publikation

**Publikation 3:** Molin L, Seraglia R, Lapolla A, Ragazzi E, Gonzalez J, Vlahou A, Schanstra JP, Albalat A, Dakna M, **Siwy J**, *Jankowski J*, Bitsika V, Mischak H, Zürlbig P, Traldi P., A comparison between MALDI-MS and CE-MS data for biomarker assessment in chronic kidney diseases, *J Proteomics.*, 2012

Beitrag im Einzelnen: Beteiligung an Datenprozessierung, Auswertung der Daten, statistische Analysen / kritische Korrekturlesung

## **7.2 Ausgewählte Publikationen**

7.2.1 *Multicentre prospective validation of a urinary peptidome-based classifier for the diagnosis of type 2 diabetic nephropathy*

**Siwy J**, Schanstra JP, Argiles A, Bakker SJ, Beige J, Boucek P, Brand K, Delles C, Duranton F, Fernandez-Fernandez B, Jankowski ML, Al Khatib M, Kunt T, Lajer M, Lichtinghagen R, Lindhardt M, Maahs DM, Mischak H, Mullen W, Navis G, Noutsou M, Ortiz A, Persson F, Petrie JR, Roob JM, Rossing P, Ruggenenti P, Rychlik I, Serra AL, Snell-Bergeon J, Spasovski G, Stojceva-Taneva O, Trillini M, von der Leyen H, Winklhofer-Roob BM, Zürlbig P, *Jankowski J.*, *Nephrol Dial Transplant.*, 2014

<http://doi.org/10.1093/ndt/gfu039>

*7.2.2 Evaluation of the Zucker diabetic fatty (ZDF) rat as a model for human disease based on urinary peptidomic profiles*

**Siwy J**, Zoja C, Klein J, Benigni A, Mullen W, Mayer B, Mischak H, *Jankowski J*, Stevens R, Vlahou A, Kossida S, Perco P, Bahlmann FH., PLoS One, 2012

<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0051334>

*7.2.3 A comparison between MALDI-MS and CE-MS data for biomarker assessment in chronic kidney diseases*

Molin L, Seraglia R, Lapolla A, Ragazzi E, Gonzalez J, Vlahou A, Schanstra JP, Albalat A, Dakna M, **Siwy J**, Jankowski J, Bitsika V, Mischak H, Zürbig P, Traldi P., *J Proteomics.*, 2012

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2012.07.024>

### **7.3 *Curriculum vitae***

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## 7.4 Publikationsliste

1. Schanstra JP, Zürbig P, Alkhalaf A, Argiles A, Bakker SJ, Beige J, Bilo HJ, Chatzi-kyrkou C, Dakna M, Dawson J, Delles C, Haller H, Haubitz M, Husi H, Jankowski J, Jerums G, Kleefstra N, Kuznetsova T, Maahs DM, Menne J, Mullen W, Ortiz A, Persson F, Rossing P, Ruggenenti P, Rychlik I, Serra AL, **Siwy J**, Snell-Bergeon J, Spasovski G, Staessen JA, Vlahou A, Mischak H, Vanholder R.  
Diagnosis and Prediction of CKD Progression by Assessment of Urinary Peptides.  
J Am Soc Nephrol. 2015 Jan 14. [Epub ahead of print]
2. Silva S, Bronze MR, Figueira ME, **Siwy J**, Mischak H, Combet E, Mullen W.  
Impact of a 6-wk olive oil supplementation in healthy adults on urinary proteomic biomarkers of coronary artery disease, chronic kidney disease, and diabetes (types 1 and 2): a randomized, parallel, controlled, double-blind study.  
Am J Clin Nutr. 2015 Jan;101(1):44-54.
3. Milongo D, Bascands JL, Huart A, Esposito L, Breuil B, Moulos P, **Siwy J**, Ramírez-Torres A, Ribes D, Lavayssière L, Bello AD, Muscari F, Alric L, Bureau C, Rostaing L, Schanstra JP, Kamar N.  
Pre transplant urinary proteome analysis does not predict development of chronic kidney disease after liver transplantation.  
Liver Int. 2014 Dec 17. [Epub ahead of print]
4. Seetho IW, **Siwy J**, Albalat A, Mullen W, Mischak H, Parker RJ, Craig S, Duffy N, Hardy KJ, Burniston JG, Wilding JP.  
Urinary proteomics in obstructive sleep apnoea and obesity.  
Eur J Clin Invest. 2014 Nov;44(11):1104-15.
5. Koss MJ, Hoffmann J, Nguyen N, Pfister M, Mischak H, Mullen W, Husi H, Rejdak R, Koch F, *Jankowski J*, Krueger K, Bertelmann T, Klein J, Schanstra JP, **Siwy J**.  
Proteomics of vitreous humor of patients with exudative age-related macular degeneration.  
PLoS One. 2014 May 14;9(5):e96895.

6. **Siwy J**, Schanstra JP, Argiles A, Bakker SJ, Beige J, Boucek P, Brand K, Delles C, Duranton F, Fernandez-Fernandez B, Jankowski ML, Al Khatib M, Kunt T, Lajer M, Lichtinghagen R, Lindhardt M, Maahs DM, Mischak H, Mullen W, Navis G, Noutsou M, Ortiz A, Persson F, Petrie JR, Roob JM, Rossing P, Ruggenenti P, Rychlik I, Serra AL, Snell-Bergeon J, Spasovski G, Stojceva-Taneva O, Trillini M, von der Leyen H, Winklhofer-Roob BM, Zürbig P, *Jankowski J*.  
Multicentre prospective validation of a urinary peptidome-based classifier for the diagnosis of type 2 diabetic nephropathy.  
*Nephrol Dial Transplant*. 2014 Aug;29(8):1563-70.
7. Albalat A, Husi H, **Siwy J**, Nally JE, McLaughlin M, Eckersall PD, Mullen W.  
Capillary electrophoresis interfaced with a mass spectrometer (CE-MS): technical considerations and applicability for biomarker studies in animals.  
*Curr Protein Pept Sci*. 2014 Feb;15(1):23-35.
8. Dissard R, Klein J, Caubet C, Breuil B, **Siwy J**, Hoffman J, Sicard L, Ducassé L, Rascalou S, Payre B, Buléon M, Mullen W, Mischak H, Tack I, Bascands JL, Buffin-Meyer B, Schanstra JP.  
Long term metabolic syndrome induced by a high fat high fructose diet leads to minimal renal injury in C57BL/6 mice.  
*PLoS One*. 2013 Oct 3;8(10):e76703.
9. Neuhaus J, Schiffer E, **Siwy J**, Mannello F, Horn LC, Stolzenburg JU.  
[Proteome-based diagnostic and prognostic biomarkers of prostate cancer].  
*Urologe A*. 2013 Sep;52(9):1251-5
10. Klein J, Lacroix C, Caubet C, **Siwy J**, Zürbig P, Dakna M, Muller F, Breuil B, Stalmach A, Mullen W, Mischak H, Bandin F, Monsarrat B, Bascands JL, Decramer S, Schanstra JP.  
Fetal Urinary Peptides to Predict Postnatal Outcome of Renal Disease in Fetuses with Posterior Urethral Valves (PUV).  
*Sci Transl Med*. 2013 Aug 14;5(198):198ra106

11. Albalat A, Stalmach A, Bitsika V, **Siwy J**, Schanstra JP, Petropoulos AD, Vlahou A, *Jankowski J*, Persson F, Rossing P, Jaskolla TW, Mischak H, Husi H.  
Improving peptide relative quantification in MALDI-TOF MS for biomarker assessment.  
Proteomics. 2013 Oct;13(20):2967-75
12. Klein G, Schanstra JP, Hoffmann J, Mischak H, **Siwy J**, Zimmermann K.  
Proteomics as a Quality Control Tool of Pharmaceutical Probiotic Bacterial Lysate Products.  
PLoS One. 2013 May 14;8(5):e62837.
13. Rodríguez-Suárez E, **Siwy J**, Zürbig P, Mischak H.  
Urine as a source for clinical proteome analysis: From discovery to clinical application.  
Biochim Biophys Acta. 2014 May;1844(5):884-98
14. Neuhaus J, Schiffer E, von Wilcke P, Bauer HW, Leung H, **Siwy J**, Ulrici W, Paasch U, Horn LC, Stolzenburg JU.  
Seminal plasma as a source of prostate cancer peptide biomarker candidates for detection of indolent and advanced disease.  
PLoS One. 2013 Jun 24;8(6):e67514.
15. Argilés A, **Siwy J**, Durantón F, Gayraud N, Dakna M, Lundin U, Osaba L, Delles C, Mourad G, Weinberger KM, Mischak H.  
CKD273, a New Proteomics Classifier Assessing CKD and Its Prognosis.  
PLoS One. 2013 May 14;8(5):e62837.
16. Albalat A, Bitsika V, Zürbig P, **Siwy J**, Mullen W.  
High-Resolution Proteome/Peptidome Analysis of Body Fluids by Capillary Electrophoresis Coupled with MS.  
Methods Mol Biol. 2013;984:153-65
17. Kistler AD, Serra AL, **Siwy J**, Poster D, Krauer F, Torres VE, Mrug M, Grantham JJ, Bae KT, Bost JE, Mullen W, Wüthrich RP, Mischak H, Chapman AB.

- Urinary proteomic biomarkers for diagnosis and risk stratification of autosomal dominant polycystic kidney disease: a multicentric study.  
PLoS One. 2013;8(1):e53016.
18. **Siwy J**, Zoja C, Klein J, Benigni A, Mullen W, Mayer B, Mischak H, *Jankowski J*, Stevens R, Vlahou A, Kossida S, Perco P, Bahlmann FH.  
Evaluation of the Zucker Diabetic Fatty (ZDF) Rat as a Model for Human Disease Based on Urinary Peptidomic Profiles.  
PLoS One. 2012;7(12):e51334.
19. Molin L, Seraglia R, Lapolla A, Ragazzi E, Gonzalez J, Vlahou A, Schanstra JP, Albalat A, Dakna M, **Siwy J**, *Jankowski J*, Bitsika V, Mischak H, Zürgbig P, Traldi P.  
A comparison between MALDI-MS and CE-MS data for biomarker assessment in chronic kidney diseases.  
J Proteomics. 2012 Oct 22;75(18):5888-97
20. Rouse R, **Siwy J**, Mullen W, Mischak H, Metzger J, Hanig J.  
Proteomic Candidate Biomarkers of Drug-Induced Nephrotoxicity in the Rat.  
PLoS One. 2012;7(4):e34606.
21. Mullen W, Albalat A, Gonzalez J, Zerefos P, **Siwy J**, Franke J, Mischak H.  
Performance of different separation methods interfaced in the same MS-reflection TOF detector: A comparison of performance between CE versus HPLC for biomarker analysis.  
Electrophoresis. 2012 Feb;33(4):567-74
22. Bandin F, **Siwy J**, Breuil B, Mischak H, Bascands JL, Decramer S, Schanstra JP.  
Urinary Proteome Analysis at 5-Year Followup of Patients With Nonoperated Ureteropelvic Junction Obstruction Suggests Ongoing Kidney Remodeling.  
J Urol. 2012 Mar;187(3):1006-11
23. Mullen W, Gonzalez J, **Siwy J**, Franke J, Sattar N, Mullan A, Roberts S, Delles C, Mischak H, Albalat A.

- A pilot study on the effect of short-term consumption of a polyphenol rich drink on biomarkers of coronary artery disease defined by urinary proteomics.  
J Agric Food Chem. 2011 Dec 28;59(24):12850-7
24. Kistler AD, **Siwy J**, Breunig F, Jeevaratnam P, Scherl A, Mullen W, Warnock DG, Wanner C, Hughes DA, Mischak H, Wüthrich RP, Serra AL.  
A distinct urinary biomarker pattern characteristic of female Fabry patients that mirrors response to enzyme replacement therapy.  
PLoS One. 2011;6(6):e20534.
25. **Siwy J**, Mullen W, Golovko I, Franke J, Zürbig P.  
Human urinary peptide database for multiple disease biomarker discovery.  
Proteomics Clin Appl. 2011 Jun; 5(5-6):367-74
26. Carty DM, **Siwy J**, Brennand JE, Zürbig P, Mullen W, Franke J, McCulloch JW, North RA, Chappell LC, Mischak H, Poston L, Dominiczak AF, Delles C.  
Urinary proteomics for prediction of preeclampsia.  
Hypertension 2011, 57(3):561-569
27. **Siwy J**, Vlahou A, Zimmerli LU, Zürbig P, Schiffer E.  
Clinical proteomics: Current techniques and potential applications in the elderly.  
Maturitas 2011; 68(3):233-244
28. Lankisch TO, Metzger J, Negm AA, Voskuhl K, Schiffer E, **Siwy J**, Weismüller TJ, Schneider AS, Thedieck K, Baumeister R, Zürbig P, Weissinger EM, Manns MP, Mischak H, Wedemeyer J.  
Bile proteomic profiles differentiate cholangiocarcinoma from primary sclerosing cholangitis and choledocholithiasis.  
Hepatology. 2011 Mar;53(3):875-84
29. Maahs DM\*, **Siwy J\***, Argilés À, Cerna M, Delles C, Dominiczak AF, Gayrard N, Iphöfer A, Jänsch L, Jerums G, Medek K, Mischak H, Navis G, Roob JM, Rossing K, Rossing P, Rychlík I, Schiffer E, Schmieder RE, Wascher TC, Winklhofer-Roob BM, Zimmerli LU, Zürbig P, Snell-Bergeon JK.

Urinary collagen fragments are significantly altered in diabetes: a link to pathophysiology.

PLoS ONE 2010; 5(9). pii: e13051

30. Mischak H, Kolch W, Aivalotis M, Bouyssie D, Court M, Dihazi H, Dihazi GH, Franke J, Garin J, Gonzales de Peredo A, Iphöfer A, Jansch L, Lacroix C, Makridakis M, Masselon C, Metzger J, Monsarrat B, Mrug M, Norling M, Novak J, Pich A, Pitt A, Bongcam-Rudloff E, **Siwy J**, Suzuki H, Thongboonkerd V, Wang L, Zoidakis J, Züribig P, Schanstra JP, Vlahou A.

Comprehensive human urine standards for comparability and standardization in clinical proteome analysis.

PROTEOMICS - Clinical Applications 2010; 4(4):464-478

31. **Jantos-Siwy J**, Schiffer E, Brand K, Schumann G, Rossing K, Delles C, Mischak H, Metzger J.

Quantitative urinary proteome analysis for biomarker evaluation in chronic kidney disease.

Journal of Proteome Research 2009, 8(1): 268-281

32. Züribig P, Decramer S, Dakna M, **Jantos J**, Good DM, Coon JJ, Mischak H, Bascands JL, Schanstra JP

The human urinary proteome reveals high similarity between kidney aging and chronic kidney disease.

Proteomics. 2009 Apr;9(8):2108-17

33. Jiang H, Schiffer E, Song Z, Wang J, Züribig P, Thedieck K, Moes S, Bantel H, Saal N, **Jantos J**, Brecht M, Jenoe P, Hall MN, Hager K, Manns MP, Hecker H, Ganser A, Doehner K, Bartke A, Meissner C, Mischak H, Ju Z, Rudolph KL

Proteins induced by telomere dysfunction and DNA damage represent biomarkers of human aging and disease.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Aug 12;105(32):11299-304

34. Frommberger M, Züribig P, **Jantos J**, Krahn T, Mischak H, Pich A, Just I, Schmitt-Kopplin P, Schiffer E

Peptidomic analysis of rat urine using capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry.

Proteomics Clin Appl. 2007 Jul;1(7):650-60

## 7.5 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Justyna Siwy, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Validierung eines Urinproteom-Klassifikators zur Frühdiagnose der diabetischen Nephropathie“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

---

Datum

---

Unterschrift

## 7.6 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt:

- Herrn Prof. Dr. Joachim Jankowski bisher an der Charité Universitätsmedizin Berlin, nun am Universitätsklinikum RWTH Aachen tätig, danke ich für seine Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung, für stete Erreichbarkeit bei offenen Fragen, sowie für die Korrektur der vorliegenden Dissertationsschrift.
- Herrn Prof. Dr. Dr. Harald Mischak (mosaiques diagnostics GmbH Hannover) für seine Betreuung, Hilfestellung, seine Ratschläge, Unterstützung und Motivation bei der Durchführung und Fertigstellung meiner Arbeit.
- Herrn Dr. Joost P. Schanstra von Inserm U1048 Laboratorium Toulouse für die Hilfestellung und Unterstützung bei der Durchführung des Dissertationsvorhabens.
- Frau Dr. Petra Züribig (mosaiques diagnostics GmbH Hannover) für die wunderbare Zusammenarbeit, die vielen Ratschläge und jederzeit gewährte Unterstützung in allen fachlichen Fragestellungen.
- Herrn Joachim Conrads (mosaiques diagnostics GmbH Hannover) für die Motivation und die Möglichkeit meine Arbeit in seinem Unternehmen zu realisieren.
- Frau Dr. Julie Klein (mosaiques diagnostics GmbH Hannover) für die Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Versuchsreihen.
- Herrn Dr. Jochen Metzger und Herrn Dr. Eric Schiffer (mosaiques diagnostics GmbH Hannover) für die anregenden fachlichen Diskussionen.
- Herrn Dr. William Mullen der Universität Glasgow für die Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Sequenzierungsdaten.
- Herrn Dr. Mohammed Dakna (mosaiques diagnostics GmbH Hannover) für die Beratung bei der Auswertung der Daten und bei Statistikfragen.
- allen Mitarbeitern der Firma mosaiques diagnostics GmbH Hannover für die allseits freundliche Zusammenarbeit, für die Unterstützung im Labor, sowie für die Unterstützung bei der Auswertung und Prozessierung der Daten.
- den Kooperationspartner der SysKid-, Predictions- und PRIORITY-Konsortien für die Bereitstellung der analysierten Proben und die Zusammenarbeit an den publizierten Manuskripten.

- der Arbeitsgruppe um Dr. Pietro Traldi von CNR-ISTM Padova für die Durchführung der MALDI-MS Analysen.
- meiner Bekannte Dr. Inga Schwarzlose für die Durchsicht meiner Dissertationsschrift und die Korrekturanregungen.
- meinem Vater, meiner Stiefmutter und meinem Bruder für die Unterstützung in jeglicher Hinsicht und liebevolle Begleitung.
- meinen Schwiegereltern, vor allem meiner Schwiegermutter für die Unterstützung während des Schreibens der Dissertationsschrift
- meiner Schwägerin Ela Siwy für ihr jederzeit offenes Ohr und ihre Unterstützung.
- meinem lieben Sohn Oliver für seine Geduld und für alle durchgeschlafenen Stunden, die mir ermöglicht haben, die Arbeit fertig zu stellen.
- und meinem lieben Mann Jerzy für seine Hilfsbereitschaft, Unterstützung, den bedingungslosen Halt, sowie seine Geduld und sein Verständnis bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

In memoriam danke ich meiner Mutter, die mich leider bei der Promotion nicht mehr begleiten durfte, der ich aber alles zu verdanken habe. Dank ihrer Erziehung und Lehre habe ich dies alles erreicht.