

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie und internistische
Intensivmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

„Evaluation von CHAC1 als Marker der akuten Nierenschädigung nach renaler
Ischämie“

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Paula Caroline Antonia Halbeisen
aus Berlin

Datum der Promotion: 04.03.2022

Inhaltsverzeichnis

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis.....	7
1. Einleitung	8
1.1. Definition und Klassifikation der akuten Nierenschädigung	8
1.2. Diagnostik und Therapie der akuten Nierenschädigung.....	10
1.3. Neue Biomarker der akuten Nierenschädigung.....	13
1.4. Cation transport regulator like protein 1 (CHAC1).....	17
1.5. CHAC1 im Mausmodell der Nierenschädigung durch Ischämie-Reperfusion	19
1.6. Zielsetzung dieser Arbeit.....	22
2. Methodik	23
2.1. Teilnephrektomie-Studie	23
2.2. AKI-Fallserie.....	24
2.3. Verwendete Chemikalien sowie Materialien und Geräte	24
2.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Coomassie Färbung.....	27
2.5. Western Blot.....	27
2.6. Verwendete Antikörper und Auswertung der Western Blots	29
2.7. Immunopräzipitation und Massenspektrometrie	30
2.8. Enzyme-linked immunosorbent assay	32
2.9. Statistische Auswertung	32
3. Ergebnisse der Entwicklung des Western Blot-Protokolls.....	33
4. Ergebnisse der Teilnephrektomie-Studie.....	35
4.1. Charakterisierung der Studienpopulation	35
4.2. Auswertung der Nierenfunktionsparameter und der Biomarker NGAL und Calprotectin im Urin	37
4.3. CHAC1 im Urin	40
5. Ergebnisse der Fallserie (NMKD-Studie)	42
5.1. Patientencharakteristika.....	42
5.2. CHAC1 im Urin und Serumkreatinin.....	44
6. Diskussion	46
6.1. Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse.....	46
6.2. NGAL, CHAC1 und Co. – Klinische Relevanz neuer Biomarker der akuten Nierenschädigung .	49
6.3. Limitationen dieser Arbeit.....	53

6. 4. Schlussfolgerung und Ausblick.....	55
Literaturverzeichnis.....	56
Eidesstattliche Versicherung.....	62
Lebenslauf.....	63
Danksagung.....	65

Abstrakt

Englisch:

Introduction: Acute kidney injury (AKI) has a high prevalence among hospital patients and is associated with unfavorable clinical courses. Novel biomarkers such as neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) improve the early detection of AKI, but they are sensitive to stimuli other than kidney injury. We identified cation transport regulator homolog 1 (CHAC1) as a potential new biomarker for early AKI in a mouse model of ischemia-reperfusion injury (IRI). The goal of this project was to translate these findings into a clinical setting. Therefore, I developed a Western Blot protocol to evaluate the utility of urinary CHAC1 in a cohort of patients who underwent unilateral clamping of the renal artery inducing IRI during partial nephrectomy. Secondly, I put together a case series including patients with different forms of AKI to determine promising clinical settings for future research.

Methods: The study population consisted of 37 patients. 27 underwent partial nephrectomy with unilateral clamping of the renal artery (group 1). 10 patients underwent partial nephrectomy without renal ischemia (group 2). Urinary samples were collected before surgery and serially after surgery. The case series consisted of 15 patients with different forms of AKI and 26 patients without AKI (control group) donating one urine sample each. Urinary CHAC1 was detected by Western blotting. Semiquantitative analysis of band intensity was performed using *ImageJ* calibrating to known quantities of recombinant CHAC1 loaded onto adjacent lanes. Urinary NGAL and calprotectin were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Results: In patients undergoing partial nephrectomy with renal ischemia urinary CHAC1-concentrations significantly increased compared to preoperative baseline from 6h up to 3 days after surgery. In group 2 there was no significant increase in CHAC1-concentrations after surgery. Highest CHAC1- concentrations in group 1 were reached 6h after surgery. There was no significant difference in the highest change from baseline CHAC1 after surgery between the two groups ($p=0,77$). Regarding the case series, CHAC1 was detectable in all samples of AKI patients and concentrations were significantly higher than in patients without AKI ($p<0,001$).

Conclusion: Urinary CHAC1 is a promising new biomarker for the detection of AKI. It is detectable in the urine of patients with different forms of AKI using Western blot. In the setting of AKI after unilateral renal ischemia, a rather mild form of AKI, CHAC1 shows a low diagnostic value. Future studies in different clinical settings need to further evaluate the diagnostic value of urinary CHAC1.

Deutsch

Einleitung: Die akute Nierenschädigung (AKI) hat eine hohe Prävalenz bei hospitalisierten Patienten und ist mit ungünstigen klinischen Verläufen assoziiert. Neue Biomarker, wie *neutrophil gelatinase-associated lipocalin* (NGAL), verbessern zwar die frühe Detektion einer AKI, können jedoch von diversen Störfaktoren beeinflusst werden. Wir haben *cation transport regulator homolog 1* (CHAC1) in einem Mausmodell der Nierenschädigung durch Ischämie-Reperfusion (IRI) als potenziellen neuen Biomarker der hyperakuten Nierenschädigung identifiziert. Ziel dieser Arbeit ist die Übertragung der Ergebnisse in ein klinisches Setting. Hierzu wurde zunächst ein Western Blot-Protokoll entwickelt, das zur Messung von CHAC1 im Urin bei einer Kohorte von Patienten verwendet wurde, bei denen durch unilaterales Abklemmen der Nierenarterie während einer Teilnephrektomie eine IRI induziert wurde. Zusätzlich wurde eine Fallserie mit Patienten mit verschiedenen AKI-Formen zusammengestellt, um potenziell vielversprechende klinische Szenarien für zukünftige Studien zu identifizieren.

Methoden: Die Studienpopulation bestand aus 37 Patienten, von denen 27 eine Teilnephrektomie mit unilateralem Abklemmen der Nierenarterie erhielten (Gruppe 1). 10 Patienten erhielten eine Teilnephrektomie ohne renale Ischämie (Gruppe 2). Urinproben wurden präoperativ sowie einmal täglich im postoperativen Verlauf entnommen. Die Fallserie umfasste 15 Patienten mit verschiedenen AKI-Formen und 26 Patienten ohne AKI (Kontrollgruppe), von denen jeweils eine Urinprobe gesammelt wurde. CHAC1 im Urin wurde mittels Western Blot gemessen. Die Ergebnisse wurden mittels *ImageJ* semiquantitativ ausgewertet, wobei für alle Messungen eine Kalibrierung zu bekannten Konzentrationen von rekombinantem CHAC1 durchgeführt wurde. NGAL und Calprotectin im Urin wurden mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) gemessen.

Ergebnisse: Die Patienten in Gruppe 1 wiesen sechs Stunden postoperativ sowie bis zum dritten postoperativen Tag signifikant höhere CHAC1-Konzentrationen auf als präoperativ. In Gruppe 2 war postoperativ kein signifikanter Anstieg der CHAC1-Konzentration zu beobachten. Die höchste CHAC1-Konzentration wurde in Gruppe 1 sechs Stunden nach der Operation erreicht. Es konnte kein signifikanter Unterschied der maximalen postoperativen Konzentrationsänderung von CHAC1 gegenüber dem präoperativen Ausgangswert zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden ($p=0,77$). Im Rahmen der Fallserie konnte CHAC1 bei allen AKI-Patienten im Urin gemessen werden und die Konzentrationen lagen signifikant höher als bei Patienten ohne AKI ($p<0,001$).

Schlussfolgerung: CHAC1 im Urin ist ein vielversprechender neuer Biomarker zur Detektion einer AKI. CHAC1 kann im Urin von Patienten mit verschiedenen AKI-Formen mittels Western Blot nachgewiesen werden. Im Setting der AKI nach unilateraler Ischämie (eher milde Form der AKI) zeigt CHAC1 insgesamt eine niedrige diagnostische Wertigkeit. Aufbauend auf die vielversprechenden Ergebnisse der Fallserie können zukünftig weitere Studien in verschiedenen klinischen Settings durchgeführt werden, um die diagnostische Qualität von CHAC1 weitergehend zu evaluieren.

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1 KDIGO-Stadieneinteilung der akuten Nierenschädigung.	9
Tabelle 2 Risikofaktoren und prädisponierende Faktoren einer akuten Nierenschädigung	10
Tabelle 3 Diagnostische Parameter zur Differenzierung von prä- und intrarenaler AKI	12
Tabelle 4 Charakteristika eines idealen Biomarkers der akuten Nierenschädigung	14
Tabelle 5 Alphabetische Auflistung aller verwendeten Reagenzien	25
Tabelle 6 Alphabetische Auflistung aller relevanten verwendeten Geräte und Materialien	25
Tabelle 7 Tabellarische Auflistung aller verwendeten Antikörper	29
Tabelle 8 Tabellarische Auflistung der verwendeten rekombinanten CHAC1-Proteine.....	30
Tabelle 9 Charakterisierung der Studienpopulation der Teilnephrektomie-Studie.	35
Tabelle 10 Patientencharakteristika der Patienten aus der Fallserie mit AKI.....	43
Abbildung 1 Modellkonzept zu Entwicklung und möglichen Verläufen der akuten Nierenschädigung mit Darstellung der verschiedenen diagnostischen Tools.....	15
Abbildung 2 Schematische Darstellung eines Nephrons mit Zuordnung verschiedener Biomarker der akuten Nierenschädigung zu ihren Ursprungssegmenten innerhalb des Nephrons.....	16
Abbildung 3 Schematische Darstellung der Regulation von CHAC1 innerhalb der <i>Unfolded Protein Response</i>	18
Abbildung 4 Heatmap-Analyse der Microarray-Daten aus dem Mausmodell der Nierenschädigung durch Ischämie-Reperfusion.....	20
Abbildung 5 Charakterisierung der Nierenschädigung durch Ischämie-Reperfusion im zeitlichen Verlauf (Ergebnisse aus dem Mausmodell).....	21
Abbildung 6 Darstellung der CHAC1-Expression in den Nierentubuli nach Ischämie-Reperfusionsschädigung mittels Immunfluoreszenz (Ergebnisse aus dem Mausmodell)	21
Abbildung 7 Auswertung der Nierenfunktionsparameter für beide Gruppen der Teilnephrektomie-Studie	37
Abbildung 8 Auswertung von NGAL und Calprotectin (im Urin) für beide Gruppen der Teilnephrektomie-Studie	39
Abbildung 9 Ergebnis der Western Blot-Analyse eines Patienten aus Gruppe 1 (NSS mit renaler Ischämie) der Teilnephrektomie-Studie	40
Abbildung 10 Auswertung von CHAC1 im Urin für beide Gruppen der Teilnephrektomie-Studie	41
Abbildung 11 Repräsentatives Beispiel einer Western Blot-Analyse von CHAC1 im Urin aus der Fallserie	44
Abbildung 12 Vergleich der Konzentrationen von CHAC1 im Urin und Serumkreatinin zwischen Patienten mit und ohne AKI im Rahmen der Fallserie.....	44
Abbildung 13 Studienübergreifender Vergleich von Serumkreatinin und CHAC1 im Urin zwischen Patienten mit und ohne AKI (Fallserie) und Patienten mit unilateraler AKI nach NSS mit renaler Ischämie (Teilnephrektomie-Studie)	45
Abbildung 14 Modell der funktionellen und strukturellen Nierenschädigung.....	52

Abkürzungsverzeichnis

AKI Akute Nierenschädigung (engl. <i>acute kidney injury</i>)	IQR <i>Interquartile range</i> , Interquartilenbereich
AKIN <i>Acute Kidney Injury Network</i>	IR Ischämie-Reperfusion (engl. <i>ischemia-reperfusion</i>)
ATF3 <i>Activating transcription factor 3</i>	KDIGO <i>Kidney Disease - Improving Global Outcomes</i>
ATF4 <i>Activating transcriptional factor 4</i>	KIM-1 <i>Kidney injury molecule 1</i>
ATN Akute tubulointerstitielle Nephritis, Akute Tubulusnekrose	KPMP <i>Kidney Precision Medicine Project</i>
AUROC <i>Area under the receiver operating characteristic</i>	L-FABP <i>Liver-type fatty acid-binding protein</i>
Botch <i>Blocks notch protein</i>	MANF <i>Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor</i>
CHAC1 <i>Cation transport regulator homolog 1, Glutathione-specific gamma-glutamylcyclotransferase 1</i>	MOPS 3-(N-Morpholino) propansulfonsäure
CHOP <i>C/EBP Homologous Protein</i>	mRNA <i>messenger ribonucleic acid</i>
CKD-EPI <i>Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration</i>	NGAL <i>Neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i>
CNI Chronische Niereninsuffizienz	NIH <i>National Institute of Health</i>
CRELD2 <i>Cysteine-rich with EGF-like domains 2</i>	NMKD <i>Novel Markers in Kidney Disease</i>
CTet <i>Indole-3-carbinol cyclic tetrameric derivate</i>	NSS <i>Nephron sparing surgery</i>
CyC Cystatin C	NTx Nierentransplantation
DDIT3 <i>DNA damage-inducible transcript 3</i>	OP Operation
eGFR geschätzte glomeruläre Filtrationsrate (engl. <i>estimated glomerular filtration rate</i>)	PERK <i>Protein kinase RNA-like endoplasmatic reticulum kinase</i>
eIF2 <i>Eukaryotic initiation factor-2</i>	POD postoperativer Tag (engl. <i>postoperative day</i>)
ELISA <i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>	PVDF Polyvinylidenfluorid
ER Endoplasmatisches Retikulum	RIFLE <i>Risk Injury Failure Loss End stage renal disease</i>
FDA <i>US Food and Drug Administration</i>	RP-HPLC <i>Reversed-phase high performance liquid chromatography</i>
FE _{Na} Fraktionelle Natriumexkretion	SDS-Page Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (engl. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
GCN2 <i>General control nonderepressible-2</i>	TIMP-2 <i>Tissue inhibitor of metalloproteinase-2</i>
GFR Glomeruläre Filtrationsrate	TRIB3 <i>Tribbles homolog 3</i>
GGCT <i>Gamma-glutamylcyclotransferase</i>	UPR <i>Unfolded Protein Response</i>
IGFBP7 <i>Insulin-like growth factor-binding protein 7</i>	
IL Interleukin	

1. Einleitung

Die vorliegende Arbeit untersucht die diagnostische Qualität des Proteins *cation transport regulator homolog 1* (CHAC1) als Biomarker für die Detektion der akuten Nierenschädigung (engl. *acute kidney injury*, AKI).

1. 1. Definition und Klassifikation der akuten Nierenschädigung

Die akute Nierenschädigung ist ein Syndrom, das durch eine plötzlich einsetzende, rasche Abnahme der exkretorischen Nierenfunktion gekennzeichnet ist, die sich über Stunden bis Tage entwickelt und prinzipiell reversibel ist. Folgen der Nierenfunktionseinschränkung sind eine Akkumulation harnpflichtiger Substanzen (z.B. Kreatinin und Harnstoff) und Störungen des Flüssigkeits-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushaltes. (1,2)

Die AKI ist ein häufiges und potenziell lebensbedrohliches Krankheitsbild (1). AKI-Patienten zeigen eine deutlich erhöhte kurzfristige Morbidität und Mortalität mit steigenden Mortalitätsraten je nach Stadium der Erkrankung. Zudem bestehen auch langfristig nach einem AKI eine erhöhte Mortalität sowie ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse und die Entwicklung einer chronischen Nierenerkrankung. (3–6)

Die Klassifikation der AKI erfolgt seit 2012 anhand der Leitlinien der *Kidney Disease – Improving Global Outcomes* - Gruppe (KDIGO). Diese verbinden die RIFLE-Kriterien (Akronym für *Risk, Injury, Failure, Loss, and End stage renal disease*) von 2004 und die *Acute Kidney Injury Network* - Kriterien (AKIN) von 2006 zu einer einheitlichen Definition (7). Tabelle 1 zeigt die KDIGO-Stadieneinteilung: Je nach Serumkreatinin-Wert und Urinausscheidung wird die AKI in drei Stadien einteilt.

Tabelle 1 KDIGO-Stadieneinteilung der akuten Nierenschädigung. AKI Akute Nierenschädigung (engl. *acute kidney injury*), KDIGO *Kidney Disease – Improving Global Outcomes* (modifiziert nach (7))

AKI-Stadium	Serumkreatinin	Urinausscheidung
1	1,5- bis 1,9-facher Anstieg innerhalb von sieben Tagen oder Anstieg $\geq 0,3$ mg/dl innerhalb von 48 Stunden	$< 0,5$ ml/kg/h über mehr als sechs Stunden
2	2,0- bis 3,9-facher Kreatininanstieg	$< 0,5$ ml/kg/h über mehr als zwölf Stunden
3	≥ 3 -facher Kreatininanstieg oder Serumkreatinin ≥ 4 mg/dl mit einem akuten Anstieg $\geq 0,5$ mg/dl	$< 0,3$ ml/kg/h über mehr als 24 Stunden oder fehlende Urinausscheidung (Anurie) für \geq zwölf Stunden

Die AKI ist ein klinisches Syndrom mit sehr heterogener Ätiologie. Anhand verschiedener pathophysiologischer Ursachen kann die AKI in die folgenden drei Gruppen (inklusive Angabe der jeweiligen relativen Häufigkeit) unterteilt werden:

- **Prärenale Nierenschädigung** (60%): Hier führt eine renale Minderperfusion zum Funktionsverlust der Nieren. Ursachen können unter anderem eine Hypovolämie durch Dehydratation oder ein Abfall des arteriellen Blutdruckes bei schwerer Herzinsuffizienz sein. Tubuläre und glomeruläre Strukturen sind zunächst noch intakt. Bei längerem Bestehen der verminderten Perfusion droht jedoch der Übergang in eine intrarenale AKI durch Tubulusnekrosen. Kann die zugrundeliegende Ursache beseitigt werden, ist der renale Funktionsverlust unmittelbar reversibel. (2)
- **Intrarenale Nierenschädigung** (35%): In diesem Fall führt eine direkte Schädigung der Niere zum Funktionsverlust. Makrovaskuläre Erkrankungen (z.B. Vaskulitiden), mikrovaskuläre Erkrankungen (z.B. IgA-Nephritis, Rapid-progressive Glomerulonephritis) oder eine akute tubulointerstitielle Nephritis/Akute Tubulusnekrose (ATN) können zu einer intrarenalen AKI führen. Die Regenerationszeit ist in der Regel deutlich länger als bei einer prärenalen Nierenschädigung, da eine spezifische Therapie der Grunderkrankung (z.B. Immunsuppression) erst wirken muss oder die Wirkung nephrotoxischer Substanzen erst abklingen muss. (2)

- **Postrenale Nierenschädigung (5%):** Hier führt eine Abflussbehinderung des Harns zum Funktionsverlust der Niere. Ursachen können entweder angeborene Fehlbildungen oder erworbene Abflusshindernisse im Bereich der Nierenbecken, der Harnleiter, der Blase oder der Harnröhre sein. Erworbene Hindernisse können beispielsweise maligne Tumoren, Harnsteine oder bei Männern eine benigne Prostatahyperplasie sein. Nach Beseitigung der Ursache ist die postrenale AKI schnell reversibel. (2)

1. 2. Diagnostik und Therapie der akuten Nierenschädigung

Die in 1. 1 beschriebene KDIGO-Klassifikation bildet derzeit die Grundlage für Diagnosestellung und Therapieevaluation der AKI. Zur weiteren Differentialdiagnostik stehen verschiedene diagnostische Tools zur Verfügung.

Im klinischen Alltag können durch Anamnese und körperliche Untersuchung bereits viele Informationen gewonnen werden, beispielsweise durch das Erfassen vorhandener prädisponierender Faktoren des Patienten für die Entwicklung einer AKI sowie extrinsischer Risikofaktoren, denen der Patient ausgesetzt ist. Wichtige Faktoren sind in Tabelle 2 zusammengefasst. (8)

Tabelle 2 Risikofaktoren und prädisponierende Faktoren einer akuten Nierenschädigung (modifiziert nach (8))

Risikofaktoren (extrinsisch)	Prädisponierende Faktoren (intrinsisch)
Sepsis	Dehydratation oder Hypovolämie
Schock	Fortgeschrittenes Alter
Verbrennung	Weibliches Geschlecht
Trauma	Chronische Nierenerkrankung
Herzchirurgischer Eingriff (insbesondere bei Einsatz einer Herz-Lungen-Maschine)	Chronische Erkrankungen von Herz, Lunge und Leber
Großer nicht-herzchirurgischer Eingriff	Diabetes mellitus
Nephrotoxische Medikamente, Kontrastmittel	Tumorerkrankungen
Gifte	Anämie

Zur Abschätzung der Nierenfunktion wird allgemein die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) genutzt, die mithilfe einer Inulin- oder Kreatinin-Clearance gemessen werden kann. Die Bestimmung der GFR mithilfe des Zuckermoleküls Inulin ist zwar exakter, wird jedoch in der Klinik selten verwendet, da Inulin zunächst intravenös verabreicht werden muss. Kreatinin hingegen ist ein körpereigenes Abbauprodukt, das von der Niere filtriert, sekretiert und im Urin ausgeschieden wird. Für beide Verfahren wird neben einer Blutprobe ein 24-Stunden-Sammelurin benötigt. Die Gewinnung des 24-Stunden-Sammelurins ist in der Praxis allerdings relativ aufwändig und fehleranfällig. Als Alternative wurden daher verschiedene Formeln zur Abschätzung der GFR auf Basis des Serumkreatinin-Wertes entwickelt. Die Serumlevel von Kreatinin sind jedoch nicht nur abhängig von der renalen Ausscheidung, sondern können durch eine Vielzahl weiterer Faktoren wie Alter, Geschlecht, Muskelmasse und den Proteingehalt der Ernährung beeinflusst werden. Um diesen Umstand zu berücksichtigen, fließen Alter, Geschlecht und Hautfarbe in die Berechnung der GFR mit ein. (9–11)

Neben dem Serumkreatinin gibt es einige weitere laborchemische Blutuntersuchungen, mit denen die Schwere der metabolischen Störung beurteilt werden kann. Typische Laborbefunde können erhöhte Harnstoffwerte, eine Hyperkaliämie sowie erniedrigte Bikarbonat- und Calciumwerte sein (12).

Zur Charakterisierung der Schwere und Art der Nierenschädigung ist die Urindiagnostik (Urinstreifentest, -mikroskopie und -sediment) hilfreich. Der Streifentest (U-Stix) liefert eine rasche semiquantitative Messung von Erythrozyten, Leukozyten, Protein, Ketonkörpern und pH. Im Urinsediment können bei einer AKI spezifische Elemente wie tubuläre Epithelzellen, Kristalle und verschiedene Zylinderformen sichtbar sein. Außerdem kann die Anzahl der Leukozyten und Erythrozyten im Sediment quantitativ und qualitativ beurteilt werden. (10,13–15)

Für die Therapieplanung ist es entscheidend, die drei Subtypen der AKI (siehe 1. 1) differentialdiagnostisch abzugrenzen. Die postrenale AKI lässt sich mittels bildgebender Verfahren (z.B. Sonographie) meist eindeutig diagnostizieren. Schwieriger gestaltet sich die differentialdiagnostische Unterscheidung zwischen prä- und intrarenaler Genese. Hier können neben anamnestischen Hinweisen auch weitergehende laborchemische Blut- und Urinuntersuchungen zielführend sein. In Tabelle 3 werden relevante diagnostische Indizes zusammengefasst. (2)

Ein häufig angeführter Parameter ist die Fraktionelle Natriumexkretion (FE_{Na}), die sich aus der Natrium-Clearance bezogen auf die Kreatinin-Clearance berechnet (13). Bei prärenal AKI ist die tubuläre Funktion trotz reduzierter GFR erhalten. Es wird daher ein eher konzentrierter Urin mit niedrigem Natriumgehalt ausgeschieden und die FE_{Na} beträgt typischerweise $<1\%$. Im Gegensatz dazu wird bei intrarenaler AKI aufgrund der unzureichenden Wasser- und Natriumrückresorption der geschädigten Tubuluszellen ein eher verdünnter Urin mit niedrigem Natriumgehalt ausgeschieden. Die FE_{Na} liegt hier $>1\%$. Wenn der tubuläre Natriumtransport jedoch durch interne oder externe Faktoren beeinflusst wird, z.B. durch Diuretika, Glukosurie oder chronische Urämie, hat die FE_{Na} eine limitierte Aussagekraft (16). (2,17)

Ein weiterer Test zur Abschätzung der tubulären Funktion ist der sogenannte Furosemid-Stress-Test. Nach Gabe einer gewichtsadaptierten Dosis des Diuretikums Furosemid wird die Urinausscheidung beurteilt. Bleibt eine Steigerung der Diurese aus, kann dies als Hinweis für eine tubuläre Schädigung und somit eine intrarenale Nierenschädigung gewertet werden. (18)

Tabelle 3 Diagnostische Parameter zur Differenzierung von prä- und intrarenaler AKI. AKI Akute Nierenschädigung (*engl. acute kidney injury*) (modifiziert nach (14))

Parameter	Prärenale AKI	Intrarenale AKI
Urin-Natrium (mmol/l)	< 10	30 – 90
Urin-/Plasmaosmolalität (mosmo/kg)	$> 1,1$	0,9 – 1,05
Urin-/Plasmakreatinin	> 15	< 15
Fraktionelle Natriumexkretion (%)	< 1	> 1

Eine rasche Evaluation von Patienten mit AKI ist entscheidend, um potenziell reversible Ursachen zu detektieren und frühzeitig zu therapieren. Liegt keine spezifische Ursache vor oder kann diese nicht gefunden werden, besteht das Management von Patienten mit AKI aus allgemeinen, supportiven Maßnahmen und engmaschiger Überwachung von Serumkreatinin und Urinausscheidung. Potenziell nephrotoxische Medikamente sollten, wenn möglich, vermieden werden. (8,19)

Ab einem AKI-Stadium 2 (nach KDIGO) sollte eine Nierenersatztherapie in Betracht gezogen werden, um das Auftreten urämischer Symptome wie Enzephalopathie und Neuropathie durch das rechtzeitige Einleiten einer Nierenersatztherapie zu vermeiden. (20,21)

Verschiedene Aspekte der AKI stehen in den letzten Jahren vermehrt im Fokus der Forschung. Neben der Überarbeitung der KDIGO-Klassifikation gibt es einige weitere neue Entwicklungen, darunter Verbesserungen der Nierenersatztherapie und die Entdeckung und Evaluation neuer Biomarker zur Diagnostik der AKI (22).

1. 3. Neue Biomarker der akuten Nierenschädigung

Ein Biomarker ist ein Charakteristikum, das objektiv gemessen werden kann und als Indikator für physiologische oder pathophysiologische Prozesse, oder ein pharmakologisches Therapieansprechen evaluiert ist (23). Als Beispiel für einen nahezu idealen Biomarker kann das kardiale Troponin (T und I) angesehen werden. Das Protein Troponin wurde 1965 als Bestandteil des *cardiac myofibrillar apparatus* beschrieben (24). Der erste *Enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) für Troponin wurde 1989 präsentiert (25). Seitdem wurden diverse Assays mit verbesserter Sensitivität und Spezifität entwickelt und das Troponin ist als Biomarker der myokardialen Schädigung in der Definition des Myokardinfarktes verankert (26).

Nicht nur in der Kardiologie sind Biomarker wie das Troponin heute wichtige Bestandteile in der Diagnostik verschiedenster Erkrankungen. Beispiele etablierter Biomarker aus anderen Fachbereichen sind zum Beispiel Tumormarker, das C-reaktive Protein als Entzündungsparameter oder das D-Dimer zum Ausschluss einer Thrombose oder Lungenarterienembolie. (27)

Ein idealer Biomarker der AKI sollte bei einer Nierenschädigung rasch ansteigen sowie spezifische Hinweise auf die genaue Lokalisation und Ursache der Schädigung geben und insgesamt möglichst viele der in Tabelle 4 aufgeführten Charakteristika erfüllen (28).

Tabelle 4 Charakteristika eines idealen Biomarkers der akuten Nierenschädigung. AKI Akute Nierenschädigung (engl. *acute kidney injury*) (modifiziert nach (28,29))

Charakteristika eines idealen Biomarkers

Hohe Sensitivität und Spezifität für eine akute Nierenschädigung

Rascher Anstieg (bevor die AKI klinisch sichtbar wird)

Zeitnaher Abfall bei Regeneration des betroffenen Gewebes

Sichere Differenzierung zwischen akuter und chronischer Nierenschädigung

Korrelation zum Grad der Schädigung

Geeigneter Verlaufparameter zum Monitoring des Therapieansprechens

Keine Beeinflussung durch demographische Faktoren und Begleiterkrankungen

Einfache und nicht-invasive Probengewinnung (Urin, Plasma)

Kostengünstige und schnelle Messung

Prädiktor für Verlauf, Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie und Mortalität

Die aktuelle KDIGO-Klassifikation der AKI, die derzeit die Basis für Diagnosestellung und Therapieevaluation im klinischen Alltag darstellt, berücksichtigt das Serumkreatinin als einzigen Laborparameter. Die Serumkreatinin-Werte steigen jedoch erst über die obere Normgrenze hinweg an, wenn die GFR schon um mehr als die Hälfte vermindert ist, da das Serumkreatinin mit der GFR in Form einer Hyperbel-Funktion korreliert (2). Dieser „Kreatinin-blinde-Bereich“ führt dazu, dass die Diagnose einer Nierenschädigung oft erst verspätet gestellt wird (vergleiche Abbildung 1) (10). Außerdem liefern die KDIGO-Kriterien keine Informationen zu Ätiologie, zugrundeliegenden molekularen Stoffwechselwegen oder Prognose der AKI, denn sowohl das Serumkreatinin als auch die Urinausscheidung sind rein funktionelle Parameter (30).

Abbildung 1 zeigt ein Modellkonzept zu Entwicklung und Verlauf einer AKI basierend auf den Stadien nach KDIGO. Wenn der Grad der Nierenschädigung im Verlauf zunimmt, kommt es zu einem fortschreitenden Funktionsverlust bis hin zum Nierenversagen, was sich wiederum in einem kontinuierlichen Abfall der GFR zeigt. Dieser Abfall der GFR kann durch einen Anstieg des Serumkreatinins oder eine Reduktion der Urinausscheidung diagnostiziert werden. Neue Biomarker bieten die Möglichkeit der Detektion einer Nierenschädigung bevor es zum Funktionsverlust des Organs mit reduzierter GFR kommt und können somit eine frühzeitigere Diagnosestellung der AKI ermöglichen. (8,30,31)

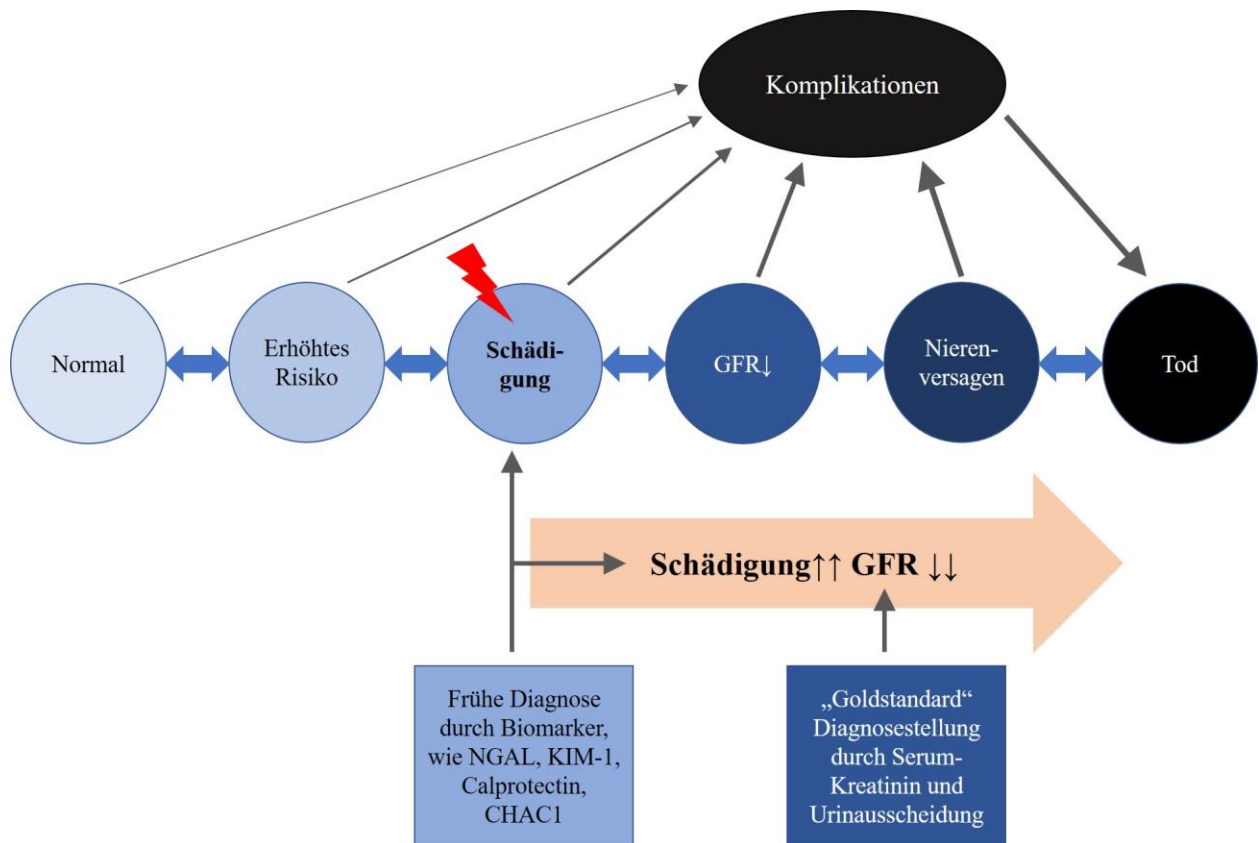


Abbildung 1 Modellkonzept zu Entwicklung und möglichen Verläufen der akuten Nierenschädigung mit Darstellung der verschiedenen diagnostischen Tools. CHAC1 *cation transport regulator homolog 1*, GFR Glomeruläre Filtrationsrate, KIM-1 *kidney injury molecule 1*, NGAL *neutrophil gelatinase-associated lipocalin* (adaptiert nach (1,8,31))

Zahlreiche potenzielle neue Biomarker der AKI wurden bei der Suche nach dem „Troponin der Niere“ in den letzten 10 Jahren in Tiermodellen identifiziert und in verschiedenen klinischen Settings analysiert (32). Die bisher charakterisierten neuen Biomarker können ebenso wie die etablierten traditionellen Marker in verschiedene pathophysiologische Kategorien eingeteilt werden (30):

- Marker der reduzierten glomerulären Funktion: Serumkreatinin, Serum-Cystatin-C (CyC)
- Marker der reduzierten tubulären Funktion: FE_{Na} , Furosemid-Stress-Test
- Marker der tubulären Schädigung: *neutrophil gelatinase-associated lipocalin* (NGAL), *kidney injury molecule 1* (KIM-1), *liver-type fatty acid-binding protein* (L-FABP), *tissue inhibitor of metalloproteinase-2* (TIMP-2), *insulin-like growth factor-binding protein 7* (IGFBP7), Urinsediment, Urin-Mikroalbumin
- Marker der Immunantwort: Interleukin-6, -10 und -18 (IL-6, IL-10, IL-18)

Jeder Biomarker reflektiert unterschiedliche molekulare und zelluläre Prozesse, die während der klinischen Phasen der AKI und/oder bei verschiedenen Formen der AKI relevant sind (29). Außerdem können die Biomarker nach ihren verschiedenen Ursprungsorten innerhalb des Nephrons unterschieden werden (Abbildung 2), wobei einige Marker mehreren Abschnitten zuzuordnen sind (33).

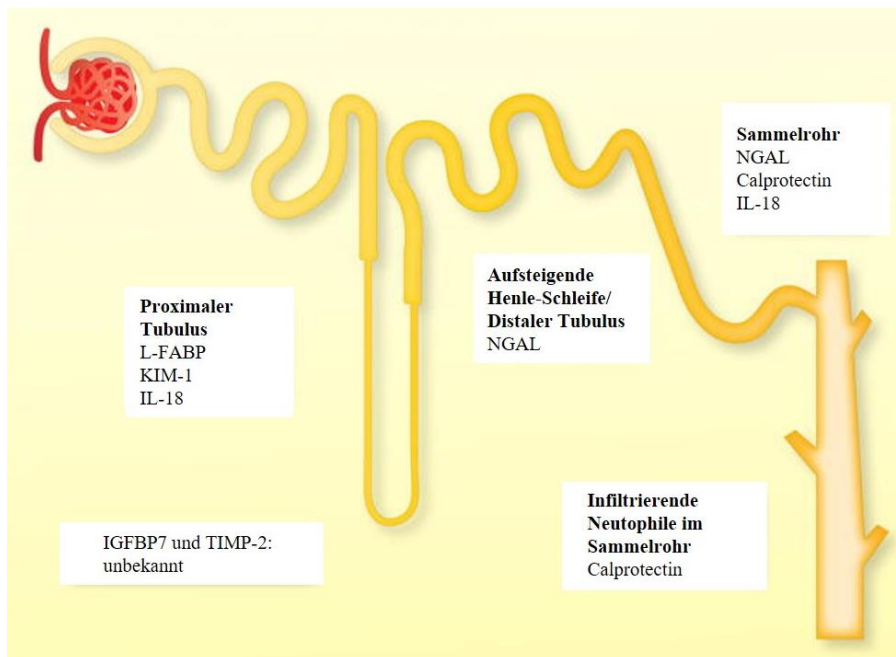


Abbildung 2 Schematische Darstellung eines Nephrons mit Zuordnung verschiedener Biomarker der akuten Nierenschädigung zu ihren Ursprungssegmenten innerhalb des Nephrons. IGFBP7 *insulin-like growth factor-binding protein 7*, IL-18 *Interleukin-18*, KIM-1 *kidney injury molecule 1*, L-FABP *liver-type fatty acid-binding protein*, NGAL *neutrophil gelatinase-associated lipocalin*, TIMP2 *tissue inhibitor of metalloproteinase-2* (modifiziert nach (33))

Alle bisher beschriebenen neuen Biomarker der AKI weisen jedoch neben verschiedenen vorteilhaften Eigenschaften auch deutliche Limitationen auf. Keiner der bisher beschriebenen Biomarker scheint komplett spezifisch für die AKI zu sein (34). Beispielsweise kann NGAL durch verschiedene Störfaktoren beeinflusst werden, darunter Sepsis, chronische Nierenerkrankungen, Pankreatitis, Harnwegsinfekte und maligne Erkrankungen (29,35). Außerdem bleiben alle bisher getesteten Biomarker nach einer Nierenschädigung für einen längeren Zeitraum erhöht, sodass außerhalb von klar definierten Studienprotokollen die Unterscheidung zwischen einer akuten Nierenschädigung und einer chronischen oder länger zurückliegenden Nierenschädigung häufig nicht möglich ist (36).

1. 4. Cation transport regulator like protein 1 (CHAC1)

In meiner Arbeitsgruppe (AG Schmidt-Ott, Max-Delbrück-Centrum, Berlin Buch) wurde das Protein *cation transport regulator-like protein 1* (CHAC1) als potenzieller neuer Biomarker der akuten Nierenschädigung identifiziert. CHAC1, auch *glutathione-specific gamma-glutamylcyclotransferase 1* oder Botch (kurz für *blocks notch protein*) genannt, ist ein Mitglied der Gamma-glutamylcyclotransferase-Familie. Das Protein besteht aus 264 Aminosäuren, ist 28 kDa groß und ist innerhalb der Zelle im Zytosol lokalisiert. Die Bezeichnung „CHAC“ stammt vom zuerst beschriebenen Homolog in *Escherichia coli*, *cation hydrogen antiporter C* (ChaC), welches das dritte Gen im CHA-Operon (Calcium/H⁺ Transporter) ist. Das CHA Operon enthält drei Gene: ChaA (den Transporter), ChaB (den Regulator) und ChaC (ebenfalls ein Regulator des Transporters). (37)

CHAC1 katalysiert spezifisch die Degradation von Glutathion zu 5-Oxoprolin und Cysteinylglycin, nicht aber den Abbau anderer gamma-glutamyl-Peptide. Die Depletion von Glutathion, dem Redoxpuffer aller lebenden Zellen, ist ein wichtiger Faktor des pro-apoptischen Signalings während allen Phasen der Apoptose. (38)

Das CHAC1-Protein hat Homologe in allen Organismen. Das humane CHAC1 hat wiederum zwei Splice-Varianten (Isoform A und B), deren funktionelle Bedeutung allerdings noch nicht untersucht wurde. In höheren Eukaryoten ist auch ein paraloges CHAC2-Enzym beschrieben, das ebenfalls Glutathion degradiert, sich aber in seiner Funktion und Kinetik deutlich von CHAC1 unterscheidet. (39)

CHAC1 ist eine pro-apoptische Komponente der Endoplasmatischen-Retikulum-Stress- (ER-Stress) Antwort und wird innerhalb der *Unfolded Protein Response* (UPR) durch die PERK-eIF2a-ATF4-ATF3-CHOP-Kaskade aktiviert (Abbildung 3) (37). Die Phosphorylierung des *eukaryotic initiation factor-2* (eIF2) startet verschiedene Signalkaskaden, unter anderem wird der *activating transcriptional factor 4* (ATF4) aktiviert, der ein zentraler Transkriptionsfaktor in der zellulären Stress-Antwort ist. (40,41)

Die Expression von CHAC1 wird außerdem bei einem Mangel an Aminosäuren hochreguliert, der beispielsweise durch bakterielle Pathogene induziert werden kann, welche die Zellmembran zerstören. Innerhalb der Signalkaskade wird ATF4 hier über die Proteinkinase *general control nonderepressible-2* (GCN2) und eIF2a aktiviert (42). Die Degradation von Glutathion durch CHAC1 liefert hier drei wichtige Aminosäuren (Cystein, Glutamat und Glycin), die für Reparaturvorgänge und Zellwachstum weiterverwertet werden können (39).

Zytotoxisch wirkende Agenzien wie beispielsweise Arsen können über eine Aktivierung von ATF4 ebenfalls zur Induktion von CHAC1 führen (41). Gleichzeitig wird hier jedoch die Pseudokinase *tribbles homolog 3* (TRIB3) induziert, die die Aktivität von ATF4 im Sinne einer negativen Rückkopplung reguliert. Über die Inhibition von ATF4 kann TRIB3 die Arsen-induzierte Aktivierung von CHAC1 verhindern, wodurch die Zell-Überlebensfähigkeit durch höhere Glutathion-Konzentrationen gesteigert wird (43). Die Regulation von CHAC1 innerhalb der beschriebenen Signalkaskaden ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

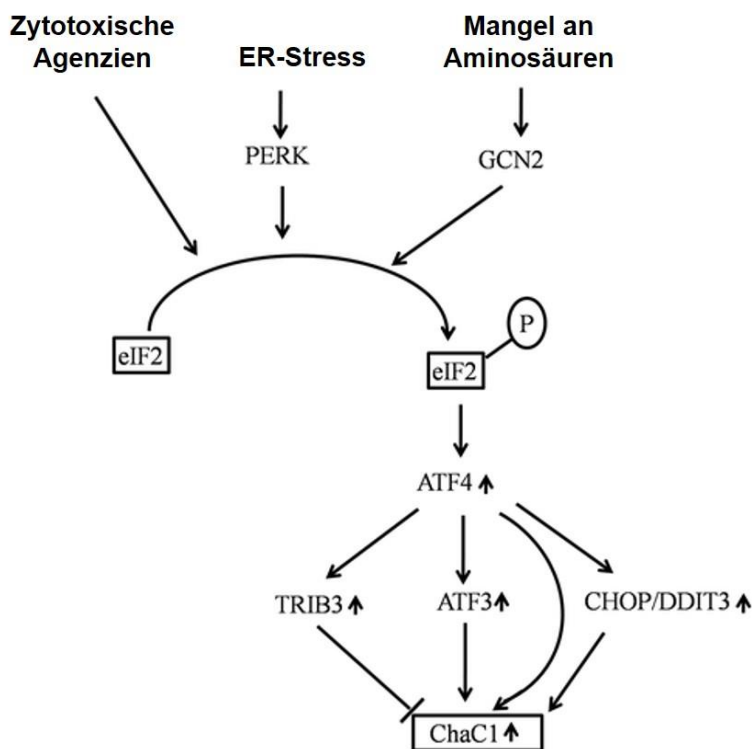


Abbildung 3 Schematische Darstellung der Regulation von CHAC1 innerhalb der *Unfolded Protein Response*. ATF 3/4 *activating transcriptional factor 3/4*, CHAC1 *cation transport regulator-like protein 1*, CHOP *C/EBP homologous protein*, DDIT3 *DNA damage-inducible transcript 3*, IF2 *eukaryotic initiation factor-2*, GCN2 *general control nonderepressible-2*, P Phosphorylierung, PERK *protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*, TRIB3 *tribbles homolog 3* (modifiziert nach (39))

Die Rolle von CHAC1 innerhalb der ER-Stress Antwort wurde bereits in Modellen einiger Krankheitsentitäten untersucht. Eine gesteigerte Expression findet sich unter anderem bei Atherosklerose (44,45), verschiedenen Tumorerkrankungen (46–50), axonaler Schädigung des Nervus opticus (51), Katarakt-Entwicklung (52) und dem Leberzellmetabolismus von Ethanol (53).

ER-Stress-Signalwege scheinen auch in der Entwicklung und Progression von Nierenerkrankungen eine Rolle zu spielen (54). Im Rahmen einer akuten Nierenschädigung, beispielsweise durch Ischämie-Reperfusion oder nephrotoxische Agenzien, kommt es auf zellulärer Ebene zur Akkumulation von nicht- oder fehlgefalteten Proteinen im endoplasmatischen Retikulum. Führt dies zu prolongiertem ER-Stress, kann die Apoptoseeinleitung induziert werden. Die dahinterliegenden molekularen Signalwege sind noch nicht komplett verstanden. ER-Stress assoziierte Faktoren wie CHAC1, die bei einer akuten Nierenschädigung in den Urin gelangen, könnten jedoch potenziell als diagnostische Biomarker genutzt werden. (55,56)

1. 5. CHAC1 im Mausmodell der Nierenschädigung durch Ischämie-Reperfusion

Die Nierenschädigung durch Ischämie-Reperfusion (IR) ist ein in der Literatur vielfach beschriebenes Modell der AKI. Eine renale Ischämie (bzw. Hypoxie) kann durch Schädigung des Tubulusepithels zu einer akuten Tubulusnekrose (ATN) führen. Hierbei kommt es zur Auflösung des epithelialen Zellverbandes mit Apoptose und Nekrose von Tubuluszellen, Tubulusobstruktion und interstitiellem Ödem. Tubuläre Resorptions- und Sekretionsprozesse sind gestört und es kommt zu einer Reduktion der GFR. Am stärksten betroffen sind die Zellen des proximalen Tubulus, insbesondere im letzten Drittel (S3-Segment). In der postischämischen Reperfusionsphase können freie Sauerstoffradikale sowie weitere humorale und mechanische Faktoren (Tubulusobstruktion durch abgelöste Zellen und Zelldetritus) zu einer anhaltenden Gewebeschädigung, auch über die Beendigung der Ischämie hinaus, führen. (12,57,58)

In meiner Arbeitsgruppe wurde ein Mausmodell der Nierenschädigung durch unilaterale IR als Modell der AKI verwendet, um mittels Microarray Gene zu entdecken, die nach der IR hochreguliert werden. In einem ähnlichen Setting wurde auch der bisher bekannteste neue Biomarker NGAL entdeckt (59). Die in Abbildung 4 dargestellte Heatmap-Analyse der Microarray-Daten zeigt postischämisch eine phasenspezifische Genexpression. CHAC1 konnte als eines der Gene identifiziert werden, die in der Frühphase nach der Schädigung hochreguliert werden. Die gewonnenen Microarray-Daten wurden auf mRNA- und Protein-Ebene validiert.

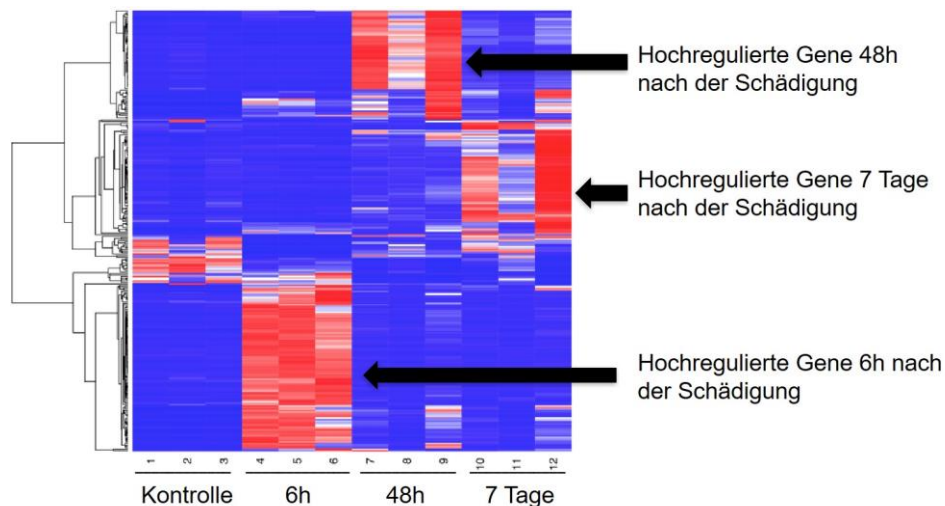


Abbildung 4 Heatmap-Analyse der Microarray-Daten aus dem Mausmodell der Nierenschädigung durch Ischämie-Reperfusion: In den Spalten von links nach rechts ist die Genexpression der Kontrollen (1-3) sowie der zu den Zeitpunkten 6h (4-6), 48h (7-9) und 7 Tage (10-12) nach der Ischämie-Reperfusion untersuchten Nieren dargestellt (jeweils n=3). Rote Farbtöne zeigen hochregulierte Gene, blaue Farbtöne herunterregulierte Gene. (Daten der AG Schmidt-Ott, nicht im Rahmen dieser Arbeit erhoben)

Die Expression von CHAC1 wird in der Frühphase nach der Schädigung (Messung nach 6 Stunden) massiv induziert. Bereits nach 48 Stunden sind die renalen mRNA-Spiegel im Vergleich zur Kontrolle nicht mehr erhöht (Abbildung 5 C). Die gleichzeitig gemessenen Werte für Serumkreatinin und renale NGAL-mRNA-Spiegel steigen zwar ebenfalls bereits 6h nach der Schädigung an, bleiben jedoch bis zum Messzeitpunkt an Tag 7 gegenüber den Kontrollen erhöht (Abbildung 5 A/B). Auf Protein-Ebene bleibt die CHAC1-Expression für eine längere Zeit erhöht als auf mRNA-Ebene (für mindestens 48 Stunden).

Mittels Immunfluoreszenz konnte dargestellt werden, dass die Expression des CHAC1-Proteins speziell in den geschädigten Epithelzellen des S3-Segmentes im proximalen Tubulus stark erhöht ist. Die vermehrte Expression zeigt sich hier (anders als im Western Blot) nur zum Messzeitpunkt sechs Stunden nach IR, nicht jedoch nach 48 Stunden (Abbildung 6).

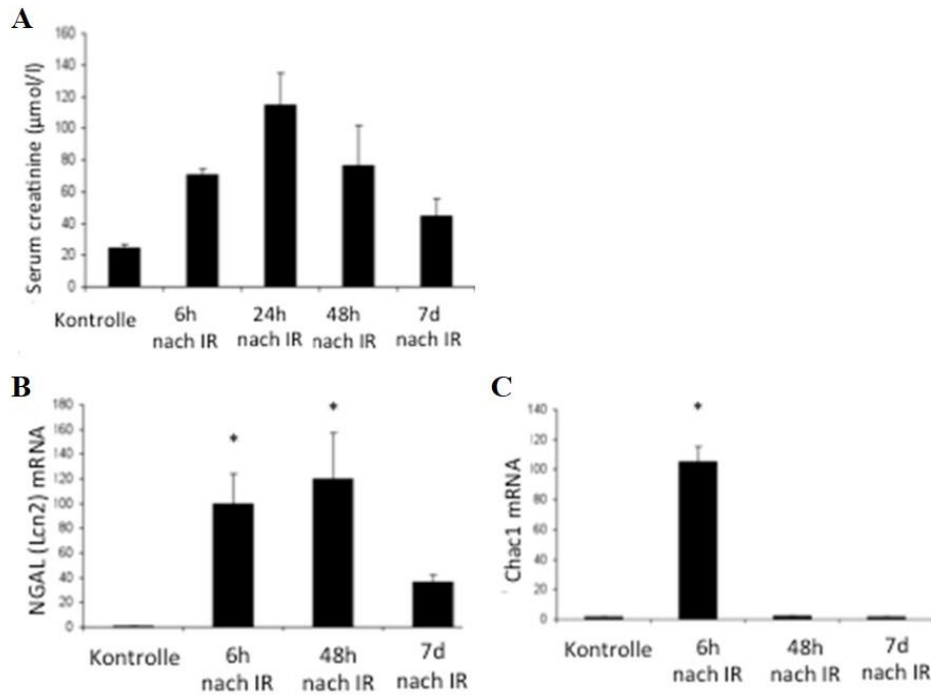


Abbildung 5 Charakterisierung der Nierenschädigung durch Ischämie-Reperfusion im zeitlichen Verlauf (Ergebnisse aus dem Mausmodell): Messungen des Serumkreatinins (A) sowie der renalen mRNA-Expression von NGAL (B) und CHAC1 (C) (jeweils n=3 pro Messzeitpunkt). Die Sterne zeigen signifikante Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle in einer nicht-parametrischen Varianzanalyse (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). * p<0,05. CHAC1 *cation transport regulator homolog 1*, IR Ischämie-Reperfusion, NGAL *neutrophil gelatinase-associated lipocalin* (Daten der AG Schmidt-Ott, nicht im Rahmen dieser Arbeit erhoben)

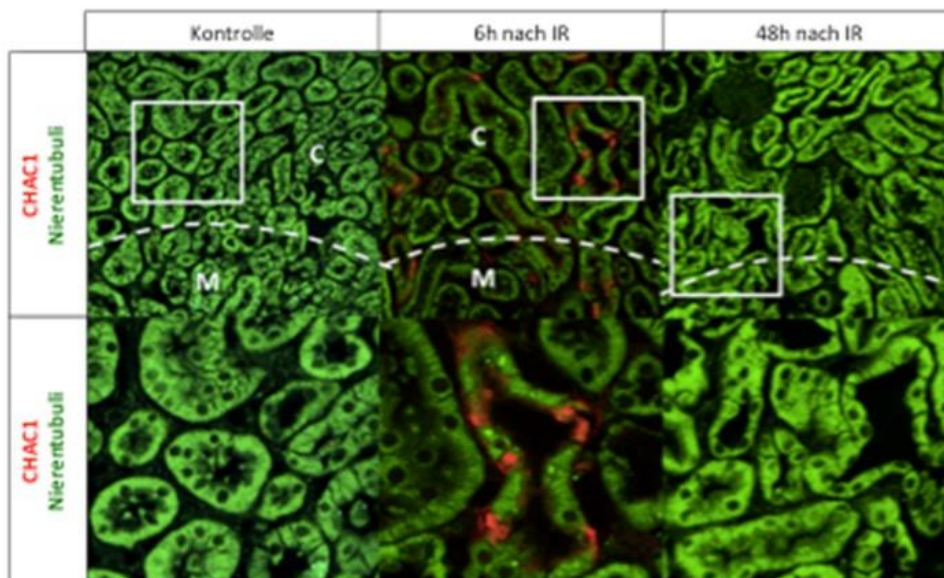


Abbildung 6 Darstellung der CHAC1-Expression in den Nierentubuli nach Ischämie-Reperfusionsschädigung mittels Immunfluoreszenz (Ergebnisse aus dem Mausmodell). Die Nierentubuli sind durch grüne Autofluoreszenz markiert. Eine besonders hohe CHAC1-Expression (rotes Signal) zeigt sich 6 Stunden nach der Schädigung im S3-Segment des proximalen Tubulus an der Grenze (gestrichelte Linie) zwischen Nierenmark (M) und Nierenkortex (C). CHAC1 *cation transport regulator homolog 1* (Daten der AG Schmidt-Ott, nicht im Rahmen dieser Arbeit erhoben)

1. 6. Zielsetzung dieser Arbeit

Im Mausmodell der Nierenschädigung durch IR wurde CHAC1 als potenzieller neuer Biomarker der hyperakuten Nierenschädigung identifiziert. Ziel dieser Arbeit ist die Übertragung der bisher gewonnenen Ergebnisse in ein klinisches Setting.

Zunächst soll ein Western Blot-Protokoll zur Messung von CHAC1 in humanem Urin entwickelt und validiert werden. Anschließend soll dieses Assay in einer klinischen Studie verwendet werden, in der die Patienten während einer Teilnephrektomie durch vorübergehendes Abklemmen der Nierenarterie eine Ischämie-Reperfusionsschädigung der betroffenen Niere erleiden. Dieses Setting ähnelt dem Tiermodell der IR aus den präklinischen Vorarbeiten. Als Kontrollgruppe dienen Patienten, die eine Teilnephrektomie ohne renale Ischämie erhalten. Durch seriell gesammelte Urin-Proben soll die Kinetik des CHAC1-Proteins in beiden Gruppen dargestellt werden. Zur besseren Einordnung der Ergebnisse werden außerdem bei allen Patienten die Serumkreatinin-Werte sowie die Konzentrationen der bereits bekannten Biomarker NGAL und Calprotectin im Urin mitbestimmt.

Im letzten Schritt soll eine Fallserie mit AKI-Patienten mit verschiedenen zugrundeliegenden Pathologien in unterschiedlichen klinischen Settings zusammengestellt werden. CHAC1 soll im Urin dieser Patienten mittels Western Blot detektiert werden. Ziel ist es, potenziell vielversprechende klinische Settings oder AKI-Formen für zukünftige Studien zu identifizieren.

2. Methodik

2. 1. Teilnephrektomie-Studie

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin Berlin und von einer regionalen Ethikkommission der Schweiz (Region Nordwest/Zentral) genehmigt. Nach umfangreicher Aufklärung wurde von allen Patienten eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt. Alle Patienten erhielten im Rahmen der Therapie eines Nierentumors eine operative Teilnephrektomie (engl. *nephron sparing surgery*, NSS), entweder in der urologischen Abteilung der Charité Universitätsmedizin Berlin oder in der urologischen Abteilung des Universitätsklinikums in Basel. Die Studienpopulation umfasst 37 Patienten, die in zwei Gruppen aufgeteilt wurden:

- Gruppe 1: NSS mit renaler Ischämie (n=27)
- Gruppe 2: NSS ohne renale Ischämie (n=10)

Einschlusskriterium für Gruppe 1 war die Notwendigkeit des Abklemmens der Nierenarterie während der Operation zur Verhinderung massiver Blutungen. Gruppe 2 diente als Kontrollgruppe. Ausschlusskriterien waren für beide Gruppen eine vorbestehende Einschränkung der Nierenfunktion mit einer geschätzten glomerulären Filtrationsrate (engl. *estimated glomerular filtration rate*, eGFR) < 50 ml/min, Harnwegsinfektionen und Tumore der Harnblase. Die eGFR wurde mithilfe der Formel der *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration* (CKD-EPI-Formel) berechnet (60).

Die Urinproben der Teilnephrektomie-Studie wurden von Herrn Dr. med. Jan Ebbing und Herrn Prof. Dr. med. Timm H. Westhoff zur Verfügung gestellt. Serielle Urinproben wurden präoperativ (*Baseline*), sechs Stunden postoperativ sowie an den folgenden Tagen einmal täglich entnommen. Die Bestimmung des Serumkreatinins erfolgte im Rahmen routinemäßiger Blutentnahmen ebenfalls einmal täglich (61). Die akute Nierenschädigung wurde anhand der AKIN-Kriterien als ein Anstieg des Serumkreatinins um $\geq 50\%$ oder $\geq 0,3$ mg/dl definiert (62).

2. 2. AKI-Fallserie

Im Rahmen der *Novel Markers in Kidney Disease*-Studie (NMKD-Studie) wurde eine Fallserie mit 15 Patienten erstellt. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin Berlin genehmigt (*Approval-Number* EA1/177/11). Alle eingeschlossenen Patienten wurden umfassend aufgeklärt und unterzeichneten eine schriftliche Einverständniserklärung. Einschlusskriterien waren das Vorliegen einer AKI nach den KDIGO-Kriterien (8) sowie die Möglichkeit zur Gewinnung einer Urinprobe (keine Anurie). Von jedem Patienten wurde eine Urinprobe zur Messung von CHAC1 entnommen. Die Bestimmung des Serumkreatinins erfolgte im Rahmen routinemäßiger Blutentnahmen.

Die Kontrollgruppe (Patienten ohne AKI) wurde aus Patienten der Teilnephrektomie-Studie zusammengestellt, von denen jeweils nur die präoperativ entnommene Urinprobe betrachtet wurde (61).

2. 3. Verwendete Chemikalien sowie Materialien und Geräte

Für die Herstellung sämtlicher Lösungen sowie während aller Experimente wurde gereinigtes Wasser aus einer Milli-Q-Anlage (*Merck-Millipore*, Schwalbach) verwendet. Alle weiteren verwendeten Reagenzien sind in Tabelle 5 aufgeführt. Alle verwendeten Geräte und Labormaterialien sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Die folgenden Pufferlösungen wurden im Western Blot-Protokoll verwendet (Herstellerdetails in Tabelle 5):

- Probenpuffer: NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X); 10% 2-Mercaptoethanol
- MOPS Laufpuffer: 20mM MOPS; 20mM TrisBase; 3,5mM SDS; 1mM EDTA
- Transferpuffer: 1,25mM Biscine; 1,25mM BisTris; 0,2mM EDTA
- TBS: 50 mM Tris, pH 7.6; 150 mM NaCl
- TBS-T: 10% TBS; 0,05% Tween-20

Tabelle 5 Alphabetische Auflistung aller verwendeten Reagenzien

Chemikalie	Hersteller, Ort
2-Mercaptoethanol	<i>Sigma Aldrich</i> , Steinheim
3-(N-Morpholino) propansulfonsäure (MOPS)	<i>Roth</i> , Karlsruhe
Albumin Fraktion V	<i>Roth</i> , Karlsruhe
Bis(2-hydroxyethyl) amino-tris(hydroxymethyl)methan (BisTris)	<i>Roth</i> , Karlsruhe
Biscine	<i>biomol</i> , Hamburg
Coomassie Brilliant Blue R250	<i>Sigma Aldrich</i> , Steinheim
Dimethyl pimelimidate dihydrochloride powder	<i>Sigma Aldrich</i> , Steinheim
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS, 10x)	<i>Thermo Scientific</i> , Darmstadt
Essigsäure	<i>Roth</i> , Karlsruhe
Ethanolamine	<i>Sigma Aldrich</i> , Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	<i>Roth</i> , Karlsruhe
Glycine hydrochloride	<i>Sigma Aldrich</i> , Steinheim
Methanol	<i>Th. Geyer</i> , Renningen
Natriumchlorid	<i>Roth</i> , Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	<i>Roth</i> , Karlsruhe
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X)	<i>Thermo Scientific</i> , Darmstadt
Polyoxyethylensorbitan monolaurate (Tween-20)	<i>VWR</i> , Darmstadt
Ponceau S Solution	<i>Sigma Aldrich</i> , Steinheim
Skim milk powder	<i>Fluka Analytical</i> , Teil von <i>Honeywell Int. Inc.</i> , Offenbach
Triethanolamine	<i>Sigma Aldrich</i> , Steinheim
Tris (Pufferan® ≥ 99%)	<i>Roth</i> , Karlsruhe
Urea	<i>Sigma Aldrich</i> , Steinheim

Tabelle 6 Alphabetische Auflistung aller relevanten verwendeten Geräte und Materialien

Gerät	Hersteller, Ort
Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	<i>GE Healthcare</i> , München
Biosphere® Filter Tips 0,5-20ul	<i>Sarstedt</i> , Nümbrecht
Carestream® Kodak® autoradiography GBX developer/replenisher und fixer	<i>Sigma Aldrich</i> , Steinheim

Gerät	Hersteller, Ort
Carestream® Kodak® BioMax r Light Film, Standard-Chemiluminescent, 13x18 cm	<i>Sigma Aldrich, Steinheim</i>
Centrifuge 5424	<i>eppendorf AG, Hamburg</i>
Classic Saran Wrap, Translucent PVC film	<i>Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg</i>
DynaMag™-2 Magnet	<i>Thermo Scientific, Darmstadt</i>
Feinwaage Modell SKX123, d=0,001g	<i>OHAUS, Greifensee, Schweiz</i>
Heiz-ThermoMixer Modell MHR 23 mit Bedienteil BT 03	<i>HLC BioTech, Bovenden</i>
Hotplate stirrer CB162	<i>Stuart equipment (Bibby Scientific), Stone, UK</i>
Immobilon-P Transfer Membranes, PVDF, pore size 0,45um	<i>Merck Millipore Ltd, Darmstadt</i>
Micro Centrifuge Model IR, 6000rpm	<i>Roth, Karlsruhe</i>
MultiDrive XL	<i>Pharmacia, Uppsala, Sweden (ehemaliges Unternehmen)</i>
Multistix® 10 Visual	<i>Siemens, München</i>
Novex® Mini-Cell, XCell SureLock™ Electrophoresis Cell (1500VDC, 75W)	<i>Thermo Scientific, Darmstadt</i>
NuPage 4-12% Bis-Tris Gel, 1,0mm; 10, 12, 15 well	<i>Thermo Scientific, Darmstadt</i>
PowerPac Adaptor, 4mm	<i>Bio-Rad, München</i>
PowerPac Basic (300V, 400mA, 75W)	<i>Bio-Rad, München</i>
Protein A Mag Sepharose (Magnetische Beads)	<i>GE Healthcare, München</i>
Rotamax 120 (20-300rpm)	<i>Heidolph Instruments, Schwabach</i>
SafeSeal-Tips® professional 200 und 1000ul	<i>Biozym, Hessisch-Oldendorf</i>
Sponge Pad for X Cell II™ Blotting	<i>Thermo Scientific, Darmstadt</i>
SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate	<i>Thermo Scientific, Darmstadt</i>
Tube Rotator EU plug	<i>VWR, Darmstadt</i>
Vortexer	<i>VWR, Darmstadt</i>
X Cell II™ Blot Module (500VDC, 50W)	<i>Thermo Scientific, Darmstadt</i>

2. 4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Coomassie Färbung

Mithilfe der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-Page) werden Proteine in einem elektrischen Feld nach ihrer Molekülmasse aufgetrennt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Novex® Electrophoresesystem von *Thermo Scientific* verwendet (Details zu den verwendeten Pufferlösungen in Kapitel 2. 3). Die zu analysierenden Urinproben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, kurz durchmischt und für 10 Minuten bei 2000g zentrifugiert. Die Gelelektrophorese wurde unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt, daher wurden dem Probenpuffer (NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X)) 10% 2-Mercaptoethanol frisch beigelegt. Die Proben wurden mit Probenpuffer vermischt, für 10 Minuten bei 70°C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Elektrophorese-Kammer wurde nach Anleitung des Herstellers zusammengesetzt und mit MOPS Laufpuffer befüllt. Die Geltaschen wurden mit den vorbereiteten Proben und dem Standard (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, *Thermo Scientific*) beladen. Die Gelelektrophorese lief mit 100V und 50mA für ca. zwei Stunden (bis zur vollständigen Auftrennung des Standards). Anschließend erfolgte entweder die Färbung des Gels mit Coomassie oder eine Western Blot-Analyse.

Zur Detektion von Proteinen in Polyacrylamid-Gel wurde eine Färbung mit Coomassie durchgeführt. Für 100ml Färbelösung wurde 0,25g Coomassie Brilliant Blue R250 mit 10ml Essigsäure und je 90ml Methanol und gereinigtem Wasser gemischt. Die Gele wurden für 30 Minuten in der Färbelösung auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden sie über Nacht entfärbt. Die Entfärbelösung entsprach in ihrer Zusammensetzung der Färbelösung (bis auf das Coomassie Brilliant Blue).

2. 5. Western Blot

Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine vom Gel auf eine PVDF Membran übertragen (63). Die Membran wurde zunächst für 20 Sekunden in Methanol geschwenkt, anschließend mit gereinigtem Wasser abgespült und für mindestens 30 Minuten auf dem Schüttler in Transferpuffer inkubiert. In der Blotkammer wurde ein Sandwich in folgender Reihenfolge aufgestapelt: Drei Schwämme, zwei Whatman-Papiere, das Gel, die PVDF Membran, zwei Whatman-Papiere, zwei Schwämme.

Die Schwämme und Whatman-Papiere wurden vorher in Transferpuffer getränkt. Die Blotkammer wurde fest zusammengepresst, in den Elektrophoresetank eingesetzt und mit Transferpuffer gefüllt. Die äußere Kammer wurde zur Kühlung mit Wasser gefüllt. Der Transfer erfolgte bei Raumtemperatur für eine Stunde bei 25V und 85mA. Zur Überprüfung des Transfers wurde die Membran in Methanol reaktiviert und dann für ca. 10 Minuten mit Ponceau gefärbt. Die Farbe wurde mit gereinigtem Wasser wieder abgewaschen. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4°C in TBS-T gelagert.

Um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membran zu verhindern, wurde die Membran am nächsten Tag zuerst für eine Stunde in 5% Milch in TBS-T inkubiert (*Blocking*). Zur Detektion des Zielproteins wurde die Membran mit dem primären Antikörper, Anti-CHAC1 Antikörper (Tabelle 7, Verdünnung 1:500 in 5% Milch in TBS-T), für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Eine Inkubation über Nacht bei 4°C erbrachte vergleichbare Ergebnisse. Danach wurde die Membran dreimal für jeweils fünf Minuten in TBS-T gewaschen und anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper, Peroxidase-konjugierter Anti-Kaninchen Antikörper (Tabelle 7, Verdünnung 1:1000 in 5% Milch in TBS-T), auf dem Schüttler inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschriff (dreimal fünf Minuten in TBS-T). Zur Detektion der Peroxidase-Aktivität wurde das SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate von *Thermo Scientific* nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Membran wurde für fünf Minuten im Dunkeln mit dem Substrat inkubiert und anschließend in eine Film-Kassette überführt. Die Chemilumineszenz-Reaktion wurde auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht, der in der Dunkelkammer entwickelt wurde. Die Expositionsdauer variierte zwischen 5 und 15 Minuten.

Bei schwachem Signal trotz langer Expositionszeit des Films (bis zu 30 Minuten) wurde die Membran über Nacht in TBS-T gelagert und am nächsten Tag mit dem ECL-Kit der Firma *Amersham-Bioscience* erneut ausgewertet. Auch hier wurde die Membran für fünf Minuten mit dem Substrat im Dunkeln inkubiert und die Reaktion wurde anschließend auf einem Film detektiert. Die Expositionzeiten waren hierbei mit 30s bis 5 Minuten etwas kürzer als mit dem Substrat von *Thermo Scientific*.

2. 6. Verwendete Antikörper und Auswertung der Western Blots

Im Rahmen der Entwicklung eines Western Blot-Assays für die Messung von CHAC1 in humanem Urin wurden zunächst verschiedene Primär- und Sekundärantikörper verglichen. Alle verwendeten Antikörper sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Mit einem *Secondary-only* Experiment wurden alle Sekundärantikörper auf unspezifische Bindungen getestet. Hierzu wurden die Membranen nach dem Western Blot anstatt mit Primärantikörper nur in TBS-T (mit 5% Milch) inkubiert und anschließend mit Sekundärantikörper inkubiert. Beide Anti-Maus Antikörper zeigten unspezifische Bindungen. Daher wurde nachfolgend die Kombination von Anti-CHAC1 (*Abcam*, ab155533) als Primärantikörper und Anti-rabbit IgG (*Sigma Aldrich*) als Sekundärantikörper verwendet.

Tabelle 7 Tabellarische Auflistung aller verwendeten Antikörper. CHAC1 *cation transport regulator homolog 1*, HRP *horseradish peroxidase*, IgG Immunglobulin G

Antikörper	Hersteller, Katalognummer	Details
Anti-Chac1	<i>OriGene</i> , TA507052	Maus, monoklonal, Klon OT11E2, 1mg/ml
Anti-Chac1	<i>Abcam</i> , ab155533	Kaninchen, polyklonal, 1ug/ul
Anti-Chac1	<i>Abcam</i> , ab184982	Kaninchen, polyklonal, 1ug/ul
Anti-Chac1	<i>NeuroMab</i> , 75-181	Maus, monoklonal, Klon N116/14, 1mg/ml
Anti-mouse IgG Fab	<i>Sigma Aldrich</i> , A9917	HRP Konjugat, Ziege, polyklonal, 0,8mg/ml
Anti-mouse IgG Fc	<i>Thermo Scientific</i> , 31437	HRP Konjugat, Ziege, polyklonal, 0,8mg/ml
Anti-rabbit IgG (ganzes Molekül)	<i>Sigma Aldrich</i> , A0545	Peroxidase Konjugat, Ziege, polyklonal, 4,0-11mg/ml

Für die Auswertung der CHAC1 Western Blot-Analysen wurde mithilfe einer Verdünnungsreihe mit rekombinantem humanen CHAC1 eine Kalibrationskurve erstellt. Diese Verdünnungsreihe wurde in jedem einzelnen Experiment neu gemessen. Tabelle 8 zeigt die verwendeten rekombinanten Proteine, wobei für die Standardkurve letztlich das Protein von *OriGene* ausgewählt wurde.

Tabelle 8 Tabellarische Auflistung der verwendeten rekombinanten CHAC1-Proteine. CHAC1 *cation transport regulator homolog 1*

Rekombinante Proteine	Hersteller, Katalognummer	Details
CHAC1	<i>OriGene</i> , TP300912	Transkriptvariante 1, produziert in E.coli, gereinigt, 0,180ug/ul
CHAC1	<i>Abnova</i> , H00079094-P01	full-length ORF, produziert in Weizenkeimen, gereinigt, 0,180ug/ul
CHAC1	<i>Creative BioMart</i> , CHAC1-181HCL	Transkriptvariante 1, überexprimierendes Zellysat (HEK 293T Zelllinie) in RIPA-Puffer

Die entwickelten Filme der Western Blots wurden eingescannt und mithilfe des Programmes *ImageJ* (64) semiquantitativ ausgewertet. Aus den Ergebnissen der Verdünnungsreihe des rekombinanten CHAC1 wurde für jeden Western Blot eine Standardkurve erstellt. Mithilfe dieser Standardkurven wurden anschließend die CHAC1-Konzentrationen der gemessenen Urinproben berechnet. Für die Auswertung wurden Monomer- und Dimer-Banden addiert.

2. 7. Immunopräzipitation und Massenspektrometrie

Zur Validierung der Spezifität des ausgewählten Primärantikörpers wurde eine Immunopräzipitation mit anschließender massenspektrometrischer Analyse durchgeführt.

Zur Anreicherung des Zielproteins CHAC1 wurde mithilfe des in den Western Blots verwendeten Anti-CHAC1-Antikörpers (*Abcam*, ab155533) und magnetischen Sepharose-Perlen (Protein A Mag Sepharose, *GE Healthcare*) eine Immunopräzipitation durchgeführt. Es wurde das vom Hersteller vorgeschlagene *Crosslinking*-Protokoll ausgewählt, da CHAC1 ein ähnliches Molekulargewicht wie die Leichtkette des Antikörpers hat, was die Co-Migration während der Gelelektrophorese stören kann. Zunächst wurde der Antikörper an die magnetischen Perlen gebunden und quervernetzt (*Crosslinking*). Das CHAC1 aus den Proben wurde im nächsten Schritt vom Antikörper gebunden und anschließend eluiert, während der Antikörper an den Perlen gebunden blieb. Folgende Inkubationszeiten wurden durchgeführt: Antikörper und *Crosslinking* jeweils 30 Minuten, Proben 60 Minuten.

Der Antikörper wurde zunächst 1:10 und in folgenden Experimenten 1:50 in TBS verdünnt. Das rekombinante CHAC1 (*OriGene* und *Creative BioMart*, Tabelle 8) wurde 1:50 (bzw. 1:10 in folgenden Experimenten) in TBS verdünnt. Die Urinproben wurden aufgetaut und für 10 Minuten bei 2000g zentrifugiert. Für die Analysen wurden jeweils 200 µl Urin verwendet.

Die folgenden Pufferlösungen wurden verwendet:

- Bindungspuffer: TBS
- Waschpuffer: TBS mit 2M Urea; pH 7,5
- Elutionspuffer: 0,1M Glycine-HCL; 2M Urea; pH 2,9
- Crosslink Lösung A: 200mM Triethanolamine; pH 8,9 (+ 50mM DMP)
- Crosslink Lösung B: 100mM Ethanolamine; pH 8,9

Bei der letzten Wiederholung der Analysen wurden Pufferlösungen ohne Urea verwendet und die Waschschrte wurden reduziert, um einen vermuteten Proteinverlust zu verhindern.

Mit dem Eluat aus der Immunopräzipitation wurde direkt im Anschluss eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt (Details in Kapitel 2. 4). Anschließend wurde das Gel mit Coomassie gefärbt (Details in Kapitel 2. 4), wobei der Entfärbungsschritt nicht über Nacht, sondern nur für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur erfolgte. Aus dem Gel wurden die zu untersuchenden Banden bei 25-30 kDa und ca. 50 kDa herausgeschnitten und bis zur weiteren Analyse in *ependorf tubes* bei Raumtemperatur gelagert.

Die anschließende massenspektrometrische Analyse wurde von der *Mass Spectrometry and Proteomics Core Unit* des Max-Delbrück-Centrums (Berlin-Buch) durchgeführt. Die Proben wurden mittels Hochleistungsflüssigkeitchromatographie (engl. *reversed-phase high performance liquid chromatography*, RP-HPLC) analysiert.

Um auch Urinproben ohne vorherige Immunopräzipitation massenspektrometrisch analysieren zu können, wurde eine Wessel-Flügge Präzipitation durchgeführt. Hierzu wurden jeweils 100 µl Urin mit 100 µl destilliertem Wasser sowie 800 µl Methanol gemischt und kurz zentrifugiert (10 Sekunden bei 10.000 upm). Dieses Prozedere wurde nach Zugabe von 200 µl Chloroform wiederholt. Anschließend wurde 600 µl destilliertes Wasser hinzugegeben und die Proben wurden gemischt und für eine Minute bei 10.000 upm zentrifugiert. Die dabei entstandene obere Phase wurde entfernt und der Rest mit 600 µl Methanol gemischt und für 5 Minuten bei 13.000 upm zentrifugiert.

Der Überstand wurde abpipettiert und das (nicht sichtbare) Pellet kurz an der Luft getrocknet und danach in 50 µl Denaturierungspuffer (6M Urea; 2M Thiourea; 10mM Hepes; pH 8) suspendiert. Bis zur massenspektrometrischen Analyse wurden die Proben bei -20°C gelagert.

2. 8. *Enzyme-linked immunosorbent assay*

Im Rahmen der Teilnephrektomie-Studie wurden Calprotectin und NGAL im Urin mittels ELISA gemessen (61). Für die Calprotectin-Messung wurde das IDK® Calprotectin ELISA Kit (*Immundiagnostik AG*, Bensheim, Deutschland) nach der Anleitung des Herstellers verwendet. Die NGAL-Konzentrationen wurden mit dem NGAL Rapid ELISA Kit (*Bioporto*, Gentofte, Dänemark) nach der Anleitung des Herstellers gemessen.

Für die Urinproben aus der Fallserie wurden die Calprotectin-Konzentrationen ebenfalls mit dem oben genannten ELISA Kit gemessen. Für die NGAL-Messungen wurde das Human NGAL ELISA Kit (*Bioporto*, Gentofte, Dänemark) nach der Anleitung des Herstellers verwendet.

2. 9. *Statistische Auswertung*

Alle statistischen Auswertungen wurden mit IBM SPSS Statistics 24.0 (*SPSS Inc.*, Chicago, Illinois, USA) durchgeführt. Metrische Daten wurden mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests und des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung untersucht. Zum Vergleich zweier unverbundener Stichproben wurde für nominale Daten der exakte Fisher-Test und für ordinale oder metrische Daten der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test verwendet. Für die Analyse von verbundenen Stichproben kam der nicht-parametrische Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test zur Anwendung. Metrische Daten wurden als Median und Interquartilenbereich (engl. *interquartile range*, IQR) dargestellt. Zur Analyse der Assoziation zwischen den gemessenen CHAC1-Konzentrationen und möglichen Einflussfaktoren (z.B. der Ischämiezeit) wurden nicht-parametrische Spearman-Korrelationen durchgeführt. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse der Entwicklung des Western Blot-Protokolls

Im ersten Schritt wurde ein Western Blot-Protokoll zur Messung von CHAC1 in humanem Urin entwickelt und validiert. Zunächst wurden verschiedene kommerziell erhältliche Primär- und Sekundärantikörper verglichen (für Details zu den verwendeten Antikörpern siehe Tabelle 7). Rekombinantes CHAC1 sowie CHAC1 im Urin von Patienten mit AKI konnte mit allen getesteten Primärantikörpern in ähnlicher Intensität detektiert werden.

Von den verwendeten Sekundärantikörpern zeigten allerdings beide verwendeten Anti-Maus Antikörper unspezifische Bindungen im Western Blot mit Banden ähnlichen Molekulargewichts wie CHAC1 (vergleiche 2. 6). Daher wurde für das in der Folge verwendete Western Blot-Protokoll die Kombination von Anti-CHAC1 (*Abcam*, ab155533) als Primärantikörper und Anti-rabbit IgG (*Sigma Aldrich*, A0545) als Sekundärantikörper ausgewählt.

Alle getesteten Primärantikörper detektierten neben der erwarteten CHAC1-Bande zwischen 25 und 30 kDa eine zweite Bande bei ca. 50 kDa. Dies zeigte sich sowohl in den Urinproben, als auch in den Verdünnungen des rekombinanten CHAC1-Proteins (siehe Abbildung 9). Die daraus abgeleitete Hypothese, dass es sich um eine Dimer-Bande des CHAC1-Proteins handeln könnte, wurde für den ausgewählten Primärantikörper mittels Immunopräzipitation und Massenspektrometrie untersucht und konnte bestätigt werden (Details unter 2. 7). Daher wurden nachfolgend in der semiquantitativen Auswertung der Western Blots Monomer- und Dimer-Banden addiert.

Mithilfe der massenspektrometrischen Analyse sollte außerdem die Spezifität des ausgewählten Primärantikörpers abschließend validiert werden. Hierzu wurde die RP-HPLC sowohl mit dem rekombinanten CHAC1 (Varianten von *OriGene* und *Creative BioMart*), als auch mit verschiedenen Urinproben von Patienten mit und ohne AKI durchgeführt. Die verwendeten rekombinanten CHAC1-Proteine konnten in der RP-HPLC mit und ohne vorhergehende Immunopräzipitation mit dem Anti-CHAC1 Antikörper zuverlässig gemessen werden. In den gemessenen Urinproben von Patienten mit AKI konnte CHAC1 in der RP-HPLC allerdings weder nativ, noch nach vorhergehender Immunopräzipitation mit dem Anti-CHAC1 Antikörper detektiert werden. Trotz umfangreicher Fehlersuche und mehrfacher Wiederholung der Analysen konnte die Ursache dafür im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Die Validation des ausgewählten Anti-CHAC1 Antikörpers konnte somit leider nicht gänzlich abgeschlossen werden. Aufgrund der zuverlässigen Erkennung verschiedener rekombinanter CHAC1-Proteine in Western Blot und Massenspektrometrie sowie der vergleichbaren Ergebnisse mit mehreren Primäantikörpern im Western Blot, konnte dennoch mit dem gewählten Primäantikörper ein valides Protokoll zur Messung von CHAC1 in humanem Urin entwickelt werden (Details in Kapitel 2). Dieses Protokoll wurde nachfolgend für die CHAC1-Messungen im Rahmen der Teilnephrektomie-Studie und der Fallserie verwendet.

4. Ergebnisse der Teilnephrektomie-Studie

4. 1. Charakterisierung der Studienpopulation

Insgesamt wurden 37 Patienten in die Studie eingeschlossen, die zur Behandlung eines Nierenkarzinoms eine Teilnephrektomie (NSS) erhielten. Die Patienten wurden in zwei Gruppen eingeteilt: Bei den Patienten in Gruppe 1 wurde während der Operation die Nierenarterie abgeklemmt, bei den Patienten in Gruppe 2 war dies nicht notwendig. Die mediane Ischämiezeit in Gruppe 1 betrug 18 Minuten (IQR 11,5 - 21 min). In Tabelle 9 sind die epidemiologischen Daten, Begleiterkrankungen, Details zu Tumorart und Operationsverfahren sowie Nierenfunktionsparameter dargestellt. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden.

Tabelle 9 Charakterisierung der Studienpopulation der Teilnephrektomie-Studie: Epidemiologische Daten, Begleiterkrankungen und Medikation bei Aufnahme, Tumorcharakteristika, Operationsverfahren und Nierenfunktionsparameter. Darstellung metrischer Daten als Median (*interquartile range*). ACE Angiotensin-konvertierendes Enzym, AT1 Angiotensin 1, eGFR geschätzte Glomeruläre Filtrationsrate, NGAL *neutrophil gelatinase-associated lipocalin*, NSS *nephron sparing surgery*, RCC *renal cell carcinoma* (Nierenzellkarzinom)

	Gruppe 1: NSS mit Ischämie (n=27)	Gruppe 2: NSS ohne Ischämie (n=10)	p-Wert
Epidemiologie			
Männer/Frauen	20 (74,1%) / 7 (25,9%)	8 (80%) / 2 (20%)	1
Alter (in Jahren)	65 (53-77)	63 (58-66,5)	0,39
Body mass index (kg/m ²)	26,6 (23,9-32,5)	25,1 (23,8-27,3)	0,32
Vorerkrankungen			
Diabetes mellitus	7 (25,9%)	2 (20%)	1
Arterielle Hypertonie	18 (66,7%)	5 (50%)	0,45
Vorbestehende chronische Nierenerkrankung	5 (18,5%)	0 (0%)	0,295
Koronare Herzerkrankung	3 (11,1%)	2 (20%)	0,597
Zustand nach Nephrektomie	2 (7,4%)	3 (30%)	0,11
Zustand nach NSS	2 (7,4%)	2 (20%)	0,56
Medikation bei Aufnahme			
ACE-Hemmer/AT1-Rezeptorblocker	14 (51,9%)	5 (50%)	1
Diuretika	6 (22,2%)	0 (0%)	0,16
Betroffene Niere			
Rechte/linke Niere	10 (37%) / 17 (63%)	6 (60%) / 4 (40%)	0,27

	Gruppe 1: NSS mit Ischämie (n=27)	Gruppe 2: NSS ohne Ischämie (n=10)	p-Wert
Tumorcharakteristika			
<i>Tumorart</i>			
Nierenzellkarzinom (RCC)	26 (96,3%)	7 (70%)	
Onkozytom	1 (3,7%)	1 (10%)	
Angiomyolipom	-	1 (10%)	
Andere	-	1 (10%)	
<i>Histologie (bei RCC)</i>			
klarzellig	20 (74,1%)	4 (40%)	
papillär	2 (7,4%)	2 (20%)	
chromophob	4 (14,8%)	1 (10%)	
<i>Staging (bei RCC)</i>			
pT1a	19 (70,4%)	6 (60%)	
pT1b	6 (22,2%)	-	
pT2a	-	1 (10%)	
pT2b	1 (3,7%)	-	
Tumordurchmesser (mm)	35 (25-45)	25 (14,5-49,8)	0,28
Operationsdaten			
Dauer der Operation (min)	247 (185-275)	184,5 (160-264,8)	0,19
Ausklemmen der Nierenarterie (Ischämie)	27 (100%)	0 (0%)	
Ischämiezeit (min)	18 (11,5-21)	-	
<i>Operationsverfahren</i>			
Offene Operation	19 (70,4%)	5 (50%)	
Laparoskopische Operation	5 (18,5%)	5 (50%)	
Roboter-assistierte Operation	2 (7,4%)	-	
Retroperitonealer Zugang	1 (3,7%)	-	
Nierenfunktion			
Serumkreatinin bei Aufnahme (mg/dl)	0,91 (0,81-1,07)	0,94 (0,86-1,21)	0,45
eGFR bei Aufnahme (ml/min/1,73m ²)	82,6 (63,7-97,5)	76,53 (61,26-87,2)	0,37
Calprotectin im Urin bei Aufnahme (ng/ml)	60,34 (16,89-151,3)	143,12 (73,15-631,82)	0,15
NGAL im Urin bei Aufnahme (ng/ml)	9,69 (5,82-22,43)	11,55 (0,99-53,82)	0,92

4. 2. Auswertung der Nierenfunktionsparameter und der Biomarker NGAL und Calprotectin im Urin

Vor der Operation hatten alle Patienten eine normale oder geringgradig eingeschränkte Nierenfunktion (Tabelle 9). In Gruppe 1 entwickelten 12 von 27 Patienten (44,4%) postoperativ eine AKI (nach den AKIN-Kriterien). In Gruppe 2 waren es 2 von 10 Patienten (20%). Die Serumkreatinin-Werte in Gruppe 1 waren bereits sechs Stunden nach der Operation signifikant höher als bei Aufnahme ($p < 0,001$) und blieben in den täglichen Messungen bis zum fünften postoperativen Tag signifikant erhöht (Abbildung 7). In Gruppe 2 waren die Serumkreatinin-Werte zu keinem Zeitpunkt signifikant höher als die Ausgangswerte.

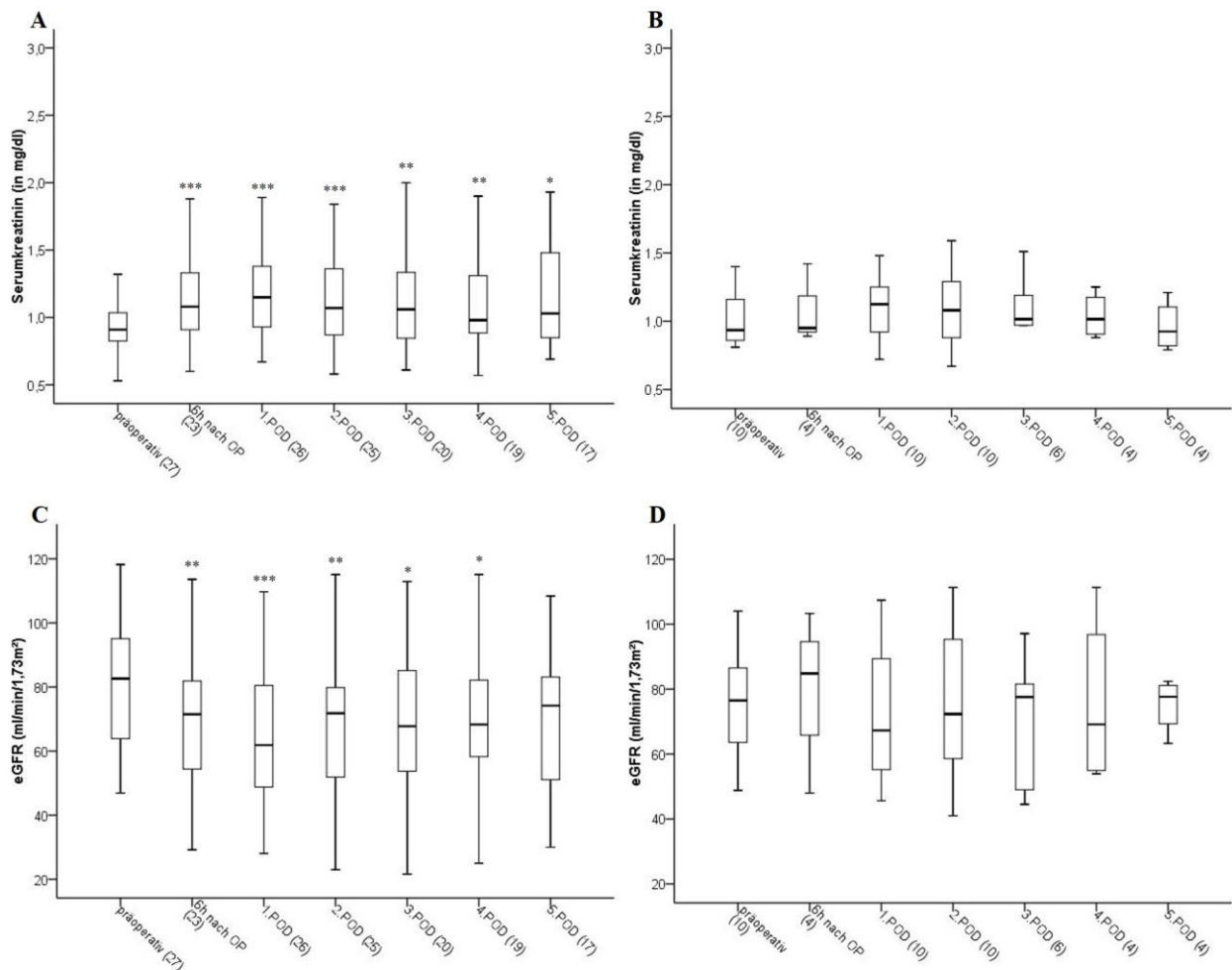


Abbildung 7 Auswertung der Nierenfunktionsparameter für beide Gruppen der Teilnephrektomie-Studie: Die präoperativen Ausgangswerte und der postoperative Verlauf von Serumkreatinin (A, B) und geschätzter glomerulärer Filtrationsrate (C, D) sind jeweils getrennt für Gruppe 1 (A, C) und Gruppe 2 (B, D) dargestellt. Die Anzahl der ausgewerteten Patientenproben ist für jeden Messzeitpunkt in runden Klammern angegeben. Die Sterne zeigen signifikante Veränderungen im Vergleich zum präoperativen Wert in einer nicht-parametrischen Varianzanalyse (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. eGFR geschätzte glomeruläre Filtrationsrate, OP Operation, POD postoperativer Tag

Die eGFR verschlechterte sich in Gruppe 1 von 82,6 ml/min (IQR 63,7 - 97,5 ml/min) auf 61,9 ml/min (48,8 - 80,7 ml/min; Δ 20,7 ml/min; $p < 0,001$) innerhalb der ersten 24 Stunden nach der OP. Am fünften postoperativen Tag war die eGFR mit 74,2 ml/min (IQR 48,7 - 85,9 ml/min) zwar wieder deutlich verbessert, lag jedoch weiterhin unter dem Ausgangswert (Δ 8,4 ml/min; $p = 0,078$). In Gruppe 2 war keine signifikante postoperative Verschlechterung der eGFR festzustellen (Details in Abbildung 7).

Zusätzlich zum Serumkreatinin wurden bei allen Patienten auch die bereits bekannten neuen Biomarker NGAL und Calprotectin im Urin gemessen. Die präoperativen Konzentrationen der beiden Biomarker sind in Tabelle 9 aufgeführt. Die postoperativen Verlaufsmessungen sind nach Gruppen getrennt in Abbildung 8 dargestellt. Die NGAL-Konzentration stieg in Gruppe 1 bereits sechs Stunden postoperativ signifikant an (Δ 23,65 ng/ml; $p = 0,001$). Auch in Gruppe 2 war zu diesem Zeitpunkt ein signifikanter Konzentrationsanstieg nachweisbar (Δ 5,25 ng/ml; $p = 0,031$). In Gruppe 1 lag die gemessene NGAL-Konzentration auch am fünften postoperativen Tag noch signifikant höher als präoperativ (Δ 28,24 ng/ml; $p < 0,001$).

Die maximal postoperativ gemessenen NGAL-Werte lagen in Gruppe 1 bei 94,46 ng/ml (IQR 48,47 – 211,06 ng/ml) und in Gruppe 2 bei 56,35 ng/ml (IQR 19,07 – 115,48 ng/ml). Die maximale Konzentrationsänderung im Vergleich zum präoperativen Ausgangswert lag in Gruppe 1 bei 81,44 ng/ml (IQR 48,47 – 196,39) und in Gruppe 2 bei 51,93 ng/ml (IQR 4,50 – 92,34 ng/ml). Sowohl die maximale postoperative NGAL-Konzentration, als auch der maximale Konzentrationsunterschied waren zwischen den beiden Gruppen statistisch nicht signifikant unterschiedlich ($p = 0,092$ und $p = 0,068$).

Calprotectin zeigte nur in Gruppe 1 einen signifikanten Anstieg nach der Operation. Die höchste Konzentration wurde am zweiten postoperativen Tag mit 3353,76 ng/ml (IQR 929,5 – 6858,51 ng/ml) erreicht. Am fünften postoperativen Tag lag die Konzentration mit 507,42 ng/ml (IQR 181,53 – 2357,64 ng/ml) wieder deutlich niedriger, jedoch noch immer höher als präoperativ (Δ 447,08 ng/ml; $p < 0,001$). Die postoperativ maximal gemessene Calprotectin-Konzentration lag in Gruppe 1 mit 4708,27 ng/ml (IQR 2700,30 – 7069,85 ng/ml) signifikant höher als in Gruppe 2 mit 2030,40 ng/ml (IQR 76,04 – 3377,19 ng/ml; $p = 0,003$). Die maximale Konzentrationsänderung lag in Gruppe 1 mit 4101,96 ng/ml (IQR 1751,62 – 7064,84 ng/ml) ebenfalls signifikant höher als in Gruppe 2 mit 2026,71 ng/ml (IQR -32,14 – 2977,55 ng/ml; $p = 0,002$).

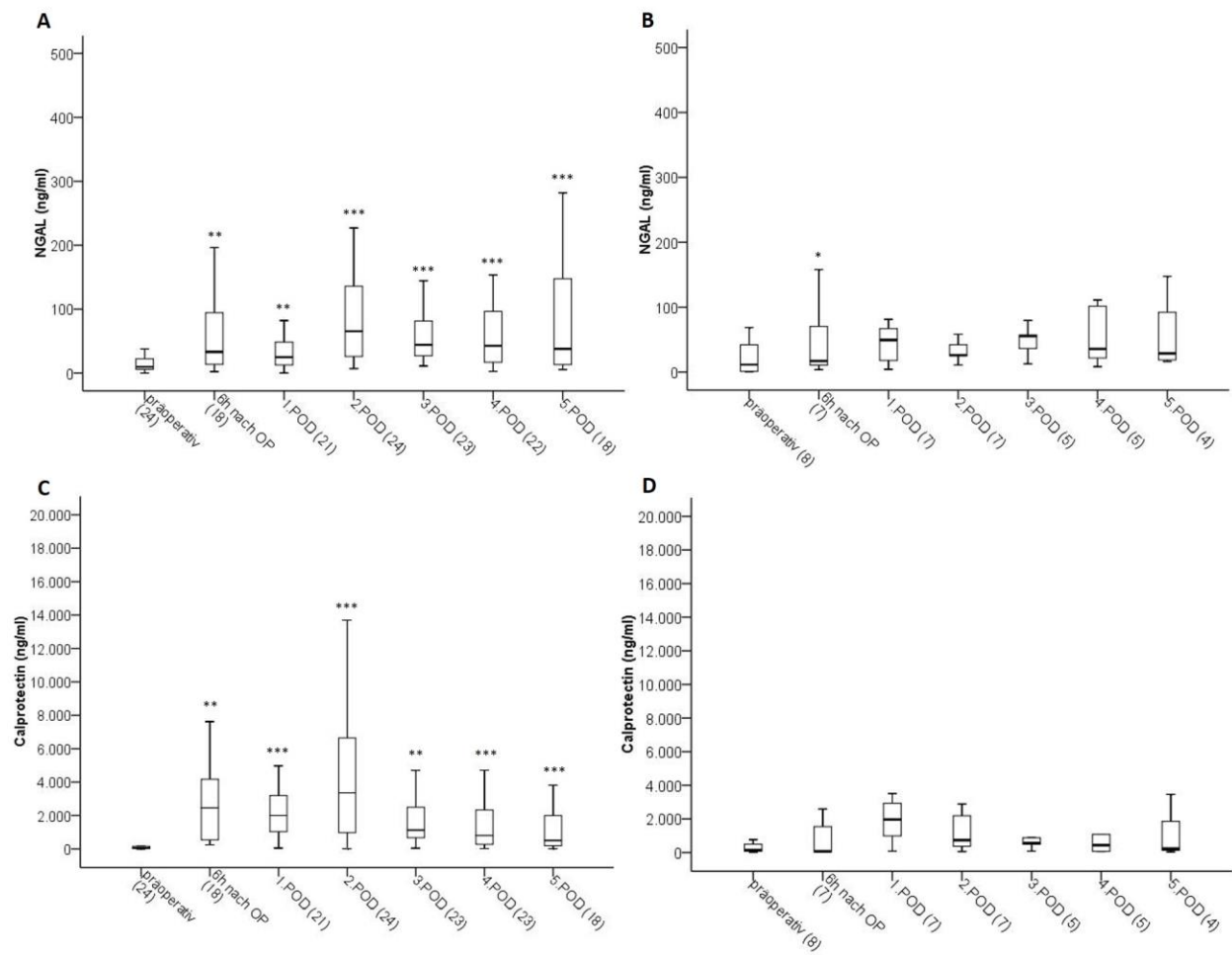


Abbildung 8 Auswertung von NGAL und Calprotectin (im Urin) für beide Gruppen der Teilnephrektomie-Studie: präoperative Ausgangswerte und postoperative Verlaufsmessungen von NGAL (A, B) und Calprotectin (C, D) sind jeweils getrennt für Gruppe 1 (A, C) und Gruppe 2 (B, D) dargestellt. Die Anzahl der ausgewerteten Patientenproben ist für jeden Messzeitpunkt in runden Klammern angegeben. Die Sterne zeigen signifikante Veränderungen im Vergleich zum präoperativen Wert in einer nicht-parametrischen Varianzanalyse (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. NGAL *neutrophil gelatinase-associated lipocalin*, OP Operation, POD postoperativer Tag

4. 3. CHAC1 im Urin

Im Rahmen der Teilnephrektomie-Studie konnte bei Patienten aus beiden Gruppen CHAC1 mittels Western Blot im Urin nachgewiesen werden. Abbildung 9 zeigt beispielhaft das Ergebnis der Western Blot-Analyse der Urinproben eines Patienten aus Gruppe 1.

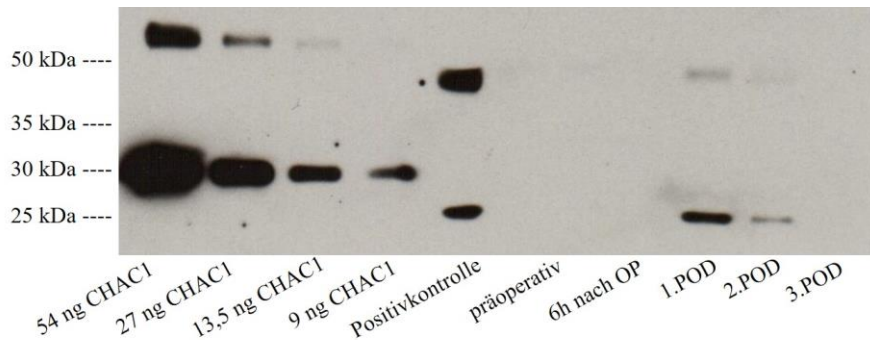


Abbildung 9 Ergebnis der Western Blot-Analyse eines Patienten aus Gruppe 1 (NSS mit renaler Ischämie) der Teilnephrektomie-Studie: Als Standard wurde rekombinantes CHAC1 in vier Verdünnungen aufgetragen, als Positivkontrolle dient der Urin von einem Patienten mit akuter Nierenschädigung (nach den KDIGO-Kriterien). CHAC1 *cation transport regulator homolog 1*, OP Operation, POD postoperativer Tag

In Gruppe 1 hatten 22 von 27 Patienten (81,5%) zu mindestens einem der Messzeitpunkte einen CHAC1 Wert > 0 ng/ml, davon neun Patienten bereits präoperativ. In Gruppe 2 hatten sechs von zehn Patienten (60%) mindestens in einer Messung einen CHAC1 Wert > 0 ng/ml, drei davon bereits präoperativ. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war hier statistisch nicht signifikant ($p = 0,215$).

Bereits innerhalb der ersten sechs Stunden nach der renalen Ischämie während der Operation stieg die CHAC1-Konzentration in Gruppe 1 von 0 ng/ml (IQR 0 – 5,73 ng/ml) auf 8,1 ng/ml (IQR 0 – 19,73 ng/ml; $p < 0,001$) an. Am ersten postoperativen Tag fiel die Konzentration auf 4,4 ng/ml (IQR 0 – 12,6 ng/ml), blieb aber gegenüber dem präoperativen Ausgangswert noch bis zum dritten postoperativen Tag signifikant erhöht. In Gruppe 2 war die CHAC1-Konzentration zu keinem Zeitpunkt signifikant höher als die gemessenen Ausgangswerte. In Abbildung 10 sind die CHAC1-Werte beider Gruppen für alle gemessenen Zeitpunkte dargestellt.

Die maximal erreichte postoperative CHAC1-Konzentration lag in Gruppe 1 bei 13,5 ng/ml (IQR 4,9 – 24,3 ng/ml) und zeigte eine Korrelation mit der Ischämiezeit in Minuten ($r = 0,41$ [0,077; 0,675]; $p = 0,04$). In Gruppe 2 lag die maximale postoperative CHAC1-Konzentration bei 5,45 ng/ml (IQR 0 – 12,28 ng/ml). Die maximale Konzentrationsänderung im Vergleich zum präoperativen Ausgangswert lag in Gruppe 1 bei 10,2 ng/ml (IQR 0,5 – 18,3 ng/ml) und korrelierte ebenfalls signifikant mit der Ischämiezeit ($r = 0,487$ [0,130; 0,735]; $p = 0,014$). In Gruppe 2 betrug die maximale Konzentrationsänderung 1,05 ng/ml (IQR 0 – 8,23 ng/ml). Für beide Analysen zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Gruppe 1 und Gruppe 2 ($p = 0,053$ für die maximale postoperative Konzentration und $p = 0,077$ für die maximale Konzentrationsänderung).

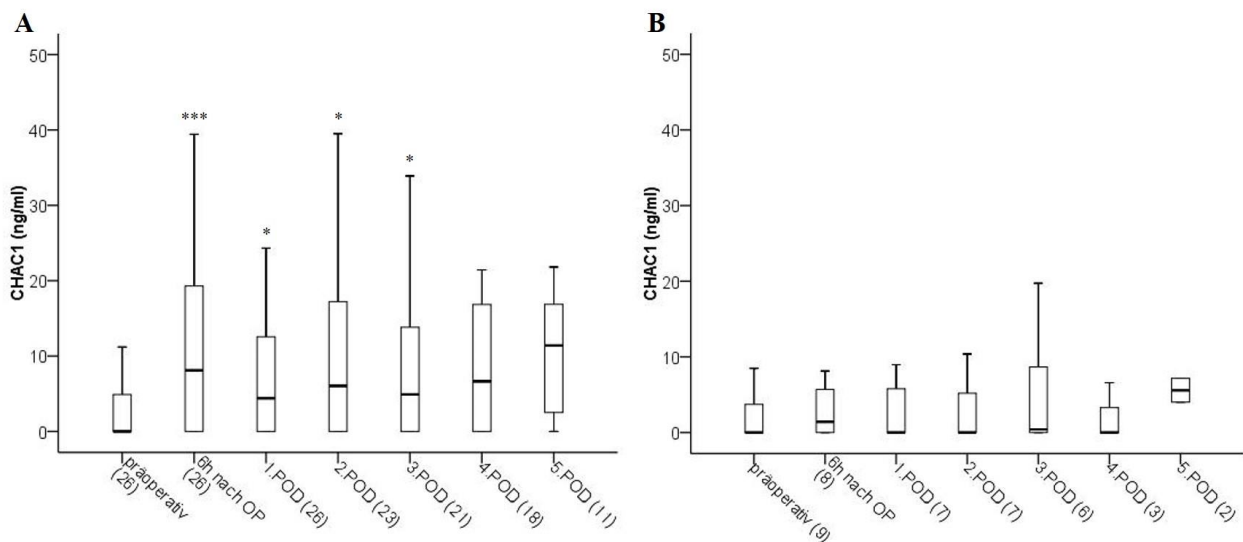


Abbildung 10 Auswertung von CHAC1 im Urin für beide Gruppen der Teilnephrektomie-Studie: präoperativer Ausgangswert und postoperativer Verlauf für Gruppe 1 (A) und Gruppe 2 (B). Die Anzahl der ausgewerteten Patientensproben ist für jeden Messzeitpunkt in runden Klammern angegeben. Die Sterne zeigen signifikante Veränderungen im Vergleich zum präoperativen Wert in einer nicht-parametrischen Varianzanalyse (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. CHAC1 *cation transport regulator homolog 1*, OP Operation, POD postoperativer Tag

5. Ergebnisse der Fallserie (NMKD-Studie)

5. 1. Patientencharakteristika

Im Rahmen der NMKD-Studie wurde eine Fallserie mit 15 Patienten mit aktuell bestehender AKI (nach den KDIGO-Kriterien) zusammengestellt. Unter den 15 Patienten waren 8 Männer (53,3%) und 7 Frauen (46,7%). Das mediane Alter lag bei 65 Jahren (IQR 56,5-76 Jahre). In Tabelle 10 sind die epidemiologischen Daten, relevante Begleiterkrankungen sowie die Serumkreatinin-Werte und die Konzentration von CHAC1 im Urin für jeden Patienten der Studiengruppe dargestellt. Die Kontrollgruppe für weitere Analysen bestand aus 26 Patienten ohne AKI, darunter 19 Männer (73,1%) und 7 Frauen (26,9%). Das mediane Alter lag wie in der Studiengruppe bei 65 Jahren (IQR 56-75 Jahre). In der Kontrollgruppe hatten 3 Patienten (11,5%) eine vorbestehende chronische Nierenerkrankung. Als weitere Vorerkrankungen waren bei 16 Patienten (61,5%) eine arterielle Hypertonie und 7 Patienten (26,9%) ein Diabetes mellitus bekannt.

Tabelle 10 Patientencharakteristika der Patienten aus der Fallserie mit AKI (N=15). Weiblich (w), männlich (m). AKI akute Nierenschädigung (engl. *acute kidney injury*), CNI Chronische Niereninsuffizienz, KDIGO *Kidney Disease: Improving Global Outcomes*, NTx Nierentransplantation, OP Operation

	Alter	Geschlecht	Ursache der AKI	CHAC1 im Urin (ng/ml)	KDIGO-Stadium	Kreatinin (mg/dl) Vorwert	Kreatinin (mg/dl) Aufnahme	Kreatinin (mg/dl) Follow-up	CNI	Dialyse während AKI	Arterielle Hypertonie	Diabetes mellitus	Bekannte onkologische Erkrankung
1	78	w	postoperativ	58,6	1	1,2	1,85	1,13 (Tag 7)	Nein	Ja	Ja	Nein	Nein
2	51	m	postoperativ	11,1	3	4,5	5,02	2,46 (Tag 7)	Ja	ja	Ja	Nein	Nein
3	80	w	postoperativ	7,2	1	1,4	1,72	1,27 (Tag 6)	Ja	Nein	Ja	Nein	ja
4	53	m	Sepsis-assoziiert	58,0	3	0,99	9,96	0,99 (Tag 12)	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja
5	65	m	Sepsis-assoziiert	12,4	3	1,49	3,71	1,83 (Tag 6)	Nein	Nein	Ja	Ja	Nein
6	77	w	Sepsis-assoziiert	25,2	n/a	n/a	4,13	1,96 (Tag 14)	n/a	Ja	Ja	Ja	nein
7	78	w	prärenal	14,2	2	0,97	2,8	1,01 (Tag 2)	Nein	Nein	Nein	Ja	ja
8	55	m	Sepsis-assoziiert	26,0	3	0,8	4,46	3,08 (Tag 5)	Nein	Ja	Nein	Nein	Nein
9	74	m	prärenal	73,7	n/a	n/a	3,96	1,77 (Tag 7)	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein
10	75	w	Sepsis-assoziiert	15,5	1	0,68	1,32	0,95 (Tag 7)	Nein	Nein	Ja	Nein	Ja
11	61	w	Sepsis-assoziiert	55,8	2	0,63	1,99	n/a	Nein	Nein	Ja	Nein	Nein
12	57	m	intrarenal	21,0	2	1,1	2,78	1,46 (Tag 7)	Ja	Nein	Ja	Ja	Nein
13	68	m	postrenal	40,2	n/a	n/a	2,6	1,79 (Woche 4)	Nein	Nein	Ja	Ja	Nein
14	56	w	NTx	92,4	n/a	9,28	5,55 (OP-Tag)	2,81 (Tag 7)	Ja	Nein	Ja	Nein	Nein
15	57	m	NTx	54,6	n/a	5,08	4,34 (OP-Tag)	1,92 (Tag 7)	Ja	Nein	Ja	Nein	Nein

5. 2. CHAC1 im Urin und Serumkreatinin

Bei allen AKI-Patienten der Fallserie konnte CHAC1 im Urin mittels Western Blot nachgewiesen werden. Abbildung 11 zeigt beispielhaft einen Western Blot von Patienten mit und ohne AKI. In der AKI-Gruppe lag die mediane CHAC1-Konzentration bei 25,97 ng/ml (IQR 14,23 – 57,96 ng/ml). In der Kontrollgruppe war die CHAC1-Konzentration mit 0 ng/ml (IQR 0 – 4,02 ng/ml) signifikant niedriger als in der AKI-Gruppe ($p < 0,001$; Abbildung 12A). Das Serumkreatinin lag in der AKI-Gruppe mit 3,71 mg/dl (IQR 1,99 – 4,46 mg/dl) ebenfalls signifikant höher als in der Kontrollgruppe mit 0,91 mg/dl (IQR 0,84 – 1,02 mg/dl; $p < 0,001$; Abbildung 12B).

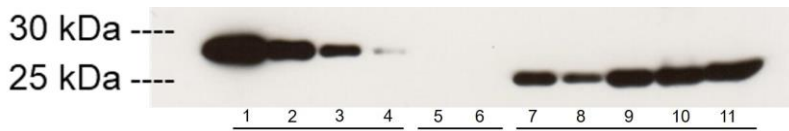


Abbildung 11 Repräsentatives Beispiel einer Western Blot-Analyse von CHAC1 im Urin aus der Fallserie. Vergleich von Patienten mit AKI (Spalten 7-11) und ohne AKI (Spalten 5-6). Die Spalten 1-4 zeigen eine Verdünnungsreihe mit rekombinantem CHAC1 (54ng, 27ng, 13,5ng, 9ng). AKI Akute Nierenschädigung (engl. *acute kidney injury*), CHAC1 *cation transport regulator homolog 1*

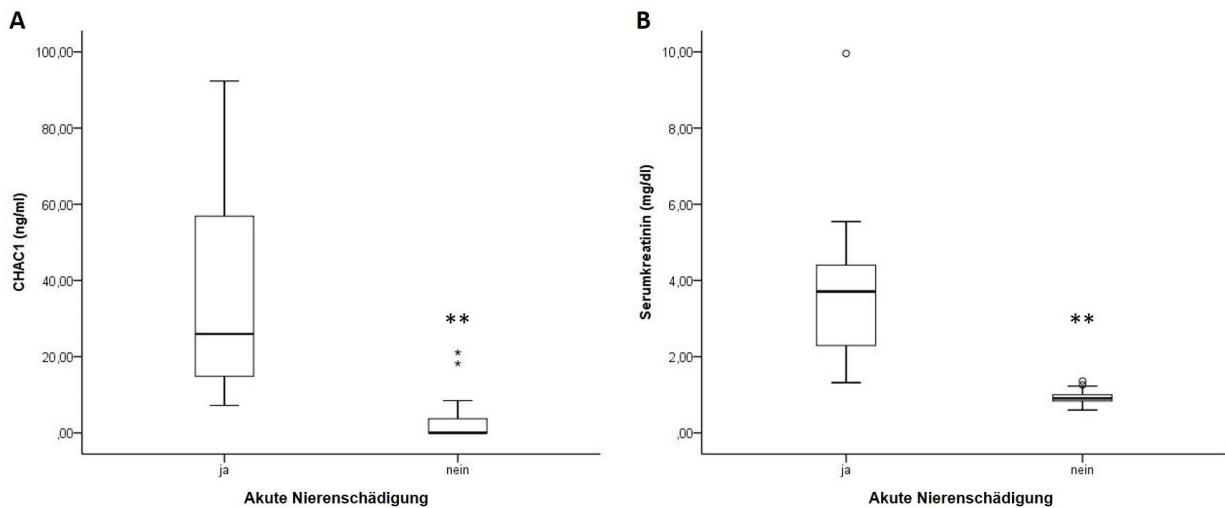


Abbildung 12 Vergleich der Konzentrationen von CHAC1 im Urin (A) und Serumkreatinin (B) zwischen Patienten mit und ohne AKI im Rahmen der Fallserie: Vergleich zwischen Patienten mit AKI nach den KDIGO-Kriterien (N=15) und Patienten ohne AKI (Kontrollgruppe, N=26). Die Daten sind als Median und Interquartilenbereich (IQR) dargestellt. Die Sterne zeigen signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen in einer nicht-parametrischen Varianzanalyse (Mann-Whitney-U-Test) ** $p < 0,01$. CHAC1 *cation transport regulator homolog 1*

Von den Patienten mit AKI waren 6 von 15 (40%) im akuten Verlauf dialysepflichtig. Zwei dieser Patienten hatten eine vorbestehende chronische Niereninsuffizienz. Die häufigste Ursache für die Entwicklung einer AKI war in dieser Studiengruppe die Sepsis-assoziierte AKI (N=6; vergleiche Tabelle 10). Die CHAC1-Konzentration im Urin von Patienten mit Sepsis-assoziiierter AKI zeigte mit 25,57 ng/ml (IQR 14,69 – 56,34 ng/ml) jedoch keinen signifikanten Unterschied zu der gemessenen Konzentration im Urin von Patienten mit einem AKI anderer Genese, die bei 40,19 ng/ml (IQR 12,66 – 66,15 ng/ml) lag ($p = 0,864$).

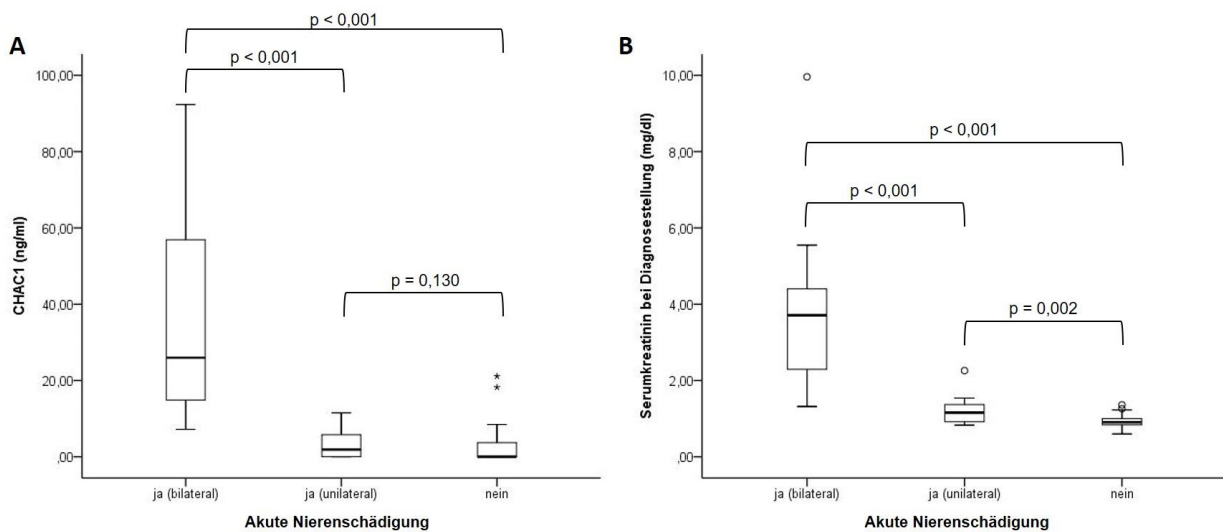


Abbildung 13 Studienübergreifender Vergleich von Serumkreatinin und CHAC1 im Urin zwischen Patienten mit und ohne AKI (Fallserie) und Patienten mit unilateraler AKI nach NSS mit renaler Ischämie (Teilnephrektomie-Studie): Vergleich der Konzentrationen von CHAC1 im Urin (A) und Serumkreatinin (B) zwischen Patienten mit (bilateraler) AKI (N=15), Patienten mit unilateraler AKI durch Abklemmen einer Nierenarterie im Rahmen einer Teilnephrektomie (N=18) und Patienten ohne AKI (N=26). Die Daten sind als Median und Interquartilenbereich dargestellt. CHAC1 *cation transport regulator homolog 1*

In einer abschließenden Analyse wurden die AKI-Patienten der Fallserie und die Kontrollgruppe mit Patienten aus der Gruppe 1 der Teilnephrektomie-Studie verglichen, bei denen eine unilaterale Nierenschädigung durch einseitiges Abklemmen der Nierenarterie während der Operation induziert wurde (Abbildung 13). Die Patienten mit (bilateraler) AKI wiesen sowohl höhere Serumkreatinin-Werte, als auch höhere CHAC1-Konzentrationen auf als die Patienten mit unilateraler Nierenschädigung und die Patienten der Kontrollgruppe.

In der Gruppe mit unilateraler Nierenschädigung lag das Serumkreatinin (24 Stunden postoperativ) mit 1,16 mg/dl (IQR 0,92 – 1,38 mg/dl) signifikant höher als in der Kontrollgruppe ($\Delta 0,25$ ng/ml; $p = 0,002$). Die CHAC1 Konzentration im Urin (6 Stunden postoperativ) unterschied sich dagegen mit 1,91 ng/ml (IQR 0 – 6,67 ng/ml) nicht signifikant von den Werten der Kontrollgruppe ($\Delta 1,91$ ng/ml; $p = 0,130$).

6. Diskussion

6. 1. Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Protein CHAC1 erstmals als potenzieller neuer Biomarker der akuten Nierenschädigung im Menschen untersucht.

Vergleichbar mit dem in der präklinischen Entwicklung verwendeten Tiermodell der renalen Ischämie-Reperfusionsschädigung bei Mäusen, wurde im Rahmen der Teilnephrektomie-Studie eine kleine Patientenkohorte mit 37 Patienten untersucht, die eine einseitige NSS zur Entfernung eines Nierentumors erhielten. Die Teilnephrektomie zur Behandlung von Nierentumoren ist neben kardiochirurgischen Eingriffen und diagnostischer Kontrastmittelgabe ein häufig genutztes klinisches Setting für die Evaluation möglicher Biomarker der AKI. Sie bietet die Möglichkeit, die Dynamik renaler Biomarker in einem in-vivo Modell der Ischämie-Reperfusion zu untersuchen. Das Abklemmen der Nierenarterie während der Operation ermöglicht eine präzise zeitliche Zuordnung der Schädigung und standardisierte Messzeitpunkte prä- und postoperativ. Gleichzeitig können Patienten, die den gleichen Eingriff ohne Abklemmen der Niere erhalten, als Kontrollen fungieren, sodass der Einfluss möglicher weiterer Schädigungsfaktoren neben der Ischämie nahezu ausgeschlossen werden kann (z.B. ein nicht-ischämisches Nierentrauma, die Anästhesie oder die Anlage eines Harnblasenkatheters). (65)

Die Ergebnisse der Teilnephrektomie-Studie zeigen, dass CHAC1 in der Gruppe mit unilateraler Ischämie während der Teilnephrektomie (Gruppe 1) bereits sechs Stunden nach der Operation gegenüber dem präoperativen Ausgangswert signifikant ansteigt, bis zum 3. postoperativen Tag signifikant erhöht bleibt und anschließend wieder abfällt. In der Kontrollgruppe (Gruppe 2) zeigt sich diese Dynamik nicht. Hier liegt CHAC1 zu keinem Zeitpunkt signifikant höher als der präoperative Ausgangswert und insgesamt niedriger als in Gruppe 1. Allerdings unterscheiden sich die maximale postoperative CHAC1-Konzentration sowie die maximale Konzentrationsänderung gegenüber dem präoperativen Ausgangswert nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen, was die diagnostische Wertigkeit von CHAC1 in diesem Setting deutlich einschränkt.

Zur besseren Einordnung der Ergebnisse wurden neben CHAC1 auch NGAL und Calprotectin, als bereits in vielen klinischen Studien untersuchte Biomarker der tubulären Schädigung, im Urin gemessen. NGAL und Calprotectin zeigen in Gruppe 1 ebenfalls bereits sechs Stunden nach der Operation einen signifikanten Anstieg gegenüber dem präoperativen Ausgangswert, wobei NGAL auch in Gruppe 2 zu diesem Zeitpunkt signifikant höher liegt als präoperativ. Im Unterschied zu CHAC1 bleiben die beiden Biomarker allerdings bis zum 5. postoperativen Tag, dem letzten Messzeitpunkt des Follow-Up, erhöht.

Eine vergleichbare prospektive klinische Studie mit 27 Patienten, die ebenfalls eine Teilnephrektomie mit Abklemmen der Nierenarterie zur Behandlung von Nierentumoren erhielten, zeigt ähnliche Ergebnisse für NGAL im postoperativen Verlauf. In der Kohorte entwickelten 10 von 27 Patienten (37 %) eine AKI, was mit den Ergebnissen der Studiengruppe in dieser Arbeit vergleichbar ist (44,4% in Gruppe 1). Patienten, die eine postoperative AKI entwickelten, weisen höhere postoperative NGAL-Werte auf. (66)

In der Literatur finden sich insgesamt sehr unterschiedliche Angaben zur AKI-Inzidenz nach Teilnephrektomie. Hierbei zeigt sich die höchste postoperative AKI-Rate mit 54 % bei Patienten mit Einzelniere (67), während Patienten nach Roboter-assistierter Teilnephrektomie die niedrigste Inzidenz (0,8 %) aufweisen (68). Die Ergebnisse variieren je nach betrachteter Studienpopulation (Alter, Begleiterkrankungen, präoperative Nierenfunktion, etc.) sowie verwendeter Operationstechnik (offen, laparoskopisch, Roboter-assistiert) und werden außerdem von der Qualität und Quantität des verbliebenen Nierengewebes und möglicherweise von der Dauer der intraoperativen Ischämie beeinflusst (65). Mit 44,4 % liegt die AKI-Rate der in dieser Arbeit untersuchten Studienpopulation relativ hoch.

Während die Autoren der oben erwähnten Studie (66) NGAL speziell als Marker für den Schweregrad der renalen Schädigung nach Ischämie-Reperfusion empfehlen, kommen Parekh et al. in einer anderen prospektiven klinischen Studie zu einem anderen Ergebnis: Ihre Studienpopulation besteht aus 40 Patienten, die eine offene Teilnephrektomie erhalten. Verschiedene Biomarker (NGAL in Plasma und Urin, KIM-1, LFABP, NAG, IL-18 und Albumin im Urin) wurden vor dem Abklemmen der Nierenarterie sowie nach zwei und 24 Stunden gemessen. Alle Biomarker im Urin zeigen postoperativ einen signifikanten Anstieg, wobei die Konzentrationsanstiege, im Vergleich zu in anderen AKI-Settings gemessenen Werten, insgesamt eher moderat ausfallen. (69)

In der gleichen Studie von Parekh et al. wurden während der Operation außerdem Biopsie-Proben (vor dem Abklemmen, am Ende des Abklemmens und nach 5 Minuten Reperfusion) entnommen, um die Ischämietoleranz des Nierengewebes zu untersuchen. Hierbei zeigt sich, dass die strukturellen Veränderungen nicht so stark ausgeprägt sind wie in Tiermodellen mit ähnlicher Ischämiezeit, obwohl die Ischämiedauer bei >80% der Patienten länger als 30 Minuten war. Die Autoren schlussfolgern daraus, dass die getesteten Biomarker im Setting der NSS, aufgrund der nur leicht ausgeprägten strukturellen Schädigung der Niere, eventuell ungeeignet sind. (69)

Die Ergebnisse von Parekh et al. passen zu Resultaten der Teilnephrektomie-Studie, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde. Für NGAL und CHAC1 konnten für die maximalen postoperativen Konzentrationen sowie für die maximalen Konzentrationsänderungen gegenüber den präoperativen Ausgangswerten keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne renaler Ischämie während der Operation gefunden werden. Dies könnte zumindest partiell dadurch erklärt werden, dass die Nierenschädigung durch unilaterale Ischämie-Reperfusion vergleichsweise gering ausfällt und somit nicht zu deutlichen Anstiegen der Biomarker-Konzentrationen führt (69).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher nach Abschluss der Teilnephrektomie-Studie eine Fallserie mit Patienten mit schwereren AKI-Formen durchgeführt. Hierzu wurde der Urin von 15 Patienten mit einer AKI (nach den KDIGO-Kriterien) verschiedener Ätiologie analysiert, darunter postoperative AKI, medikamentös-toxische AKI und Transplantatversagen. In allen Proben konnte CHAC1 mittels Western Blot nachgewiesen werden. Außerdem lagen die errechneten CHAC1-Konzentrationen signifikant höher als die Messwerte der Kontrollgruppe (Patienten ohne Hinweis auf eine AKI).

Im abschließenden Vergleich zwischen Patienten mit schwerer (bilateraler) AKI und Patienten der Gruppe 1 der Teilnephrektomie-Studie mit unilateraler AKI konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit bilateraler AKI signifikant höhere CHAC1-Konzentrationen gemessen werden können als bei Patienten mit unilateraler AKI. Patienten mit unilateraler AKI zeigten außerdem keine signifikant höheren CHAC1-Konzentrationen als Patienten der Kontrollgruppe.

Zusammenfassend stellt sich CHAC1 im Rahmen dieser Arbeit als vielversprechender neuer Biomarker der akuten Nierenschädigung bei schweren Formen der AKI dar. Bei der milderen Form der AKI durch unilaterale Ischämie-Reperfusion weist es dagegen eine eher niedrige diagnostische Wertigkeit auf.

6. 2. NGAL, CHAC1 und Co. – Klinische Relevanz neuer Biomarker der akuten Nierenschädigung

Alle bisher evaluierten neuen Biomarker der AKI weisen in verschiedenen klinischen Settings und bei der Prognose verschiedener relevanter Endpunkte unterschiedliche Vor- und Nachteile auf. Das „Troponin der Niere“ wurde bisher – auch im Rahmen dieser Arbeit - nicht gefunden (33). Aufgrund des umfassenden Anforderungsprofils an einen perfekten Biomarker und der heterogenen Ätiologie der AKI scheint es allerdings unwahrscheinlich, dass ein einzelner Biomarker die Testcharakteristika des Troponins beim Myokardinfarkt erreichen kann. Im Gegensatz zum Myokardinfarkt, dem ein eindeutiger Schädigungsmechanismus zugrunde liegt, ist die AKI keine einzelne Krankheitsentität, sondern ein klinisches Syndrom, das häufig multifaktoriell bedingt ist (70). Dies spiegelt sich in den insgesamt eher mittelmäßigen Testcharakteristika der verschiedenen Biomarker wieder, wobei die höchsten AUROC-Werte (engl. *Area under the receiver operating characteristic*) zwischen 0,75 und 0,85 liegen (33).

Derzeit wird noch keiner der neuen Biomarker routinemäßig in der Klinik eingesetzt (33). Von der *US Food and Drug Administration* (FDA) wurden bisher NGAL und die Biomarkerkombination IGFBP7/TIMP-2 (*NephroCheck*, *Astute Medical*) für den klinischen Einsatz zugelassen. Aufgrund der noch mangelnden technischen Verfügbarkeit und der im Vergleich zu etablierten Parametern hohen Kosten, werden aber auch diese diagnostischen Tools noch nicht regelmäßig im Klinikalltag eingesetzt (32).

Aktuell wird die klinische Relevanz der neuen Biomarker in der Fachwelt insgesamt kontrovers diskutiert. Einen Überblick zu den verschiedenen Positionen hierzu gibt ein Editorial in der Zeitschrift *Intensive Care Medicine*, in dem verschiedene Expertenmeinungen gegenübergestellt werden (34,71,72). Nach 10 Jahren intensiver Forschung im Bereich der Entwicklung neuer Biomarker der AKI ziehen die Autoren Resümee. Während J. Vanmassenhove et al. zu dem Ergebnis kommen, dass die neuen Biomarker bisher hinter den Erwartungen zurückbleiben, betonen B. McMahon und J. Koyner die bisher erreichten Erfolge und ziehen eine positive Bilanz (34,71). J. Prowle und M. Rosner bewegen sich zwischen diesen beiden Positionen und kommen zu dem Schluss, dass bei der Suche nach dem universellen diagnostischen Tool für alle Formen der AKI zu viel von Biomarkern erwartet wird.

Zudem werde nach Meinung der beiden Autoren zu wenig beachtet, dass Biomarker auf der anderen Seite wichtige Einblicke in zugrundeliegende pathophysiologische Mechanismen liefern können und Ansatzpunkte für gezielte Therapien sein können (72). Alle Autoren sind sich indessen einig, dass weitere Forschung, die auf das bisher generierte Wissen aufbaut, notwendig ist, um neue Biomarker sinnvoll in den klinischen Alltag zu integrieren. Um dieses Ziel zu erreichen, gibt es derzeit verschiedene Strategien, unter anderem die gezielte Entwicklung neuer Biomarker sowie die Integration bereits bekannter Biomarker in bestehende diagnostische Konzepte (71).

Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Protein CHAC1 ist eine Komponente der zellulären ER-Stress Antwort (siehe 1. 4), die derzeit ein vielversprechender Ansatzpunkt bei der Suche nach neuen Biomarkern der AKI darstellt. Nach aktuellem Kenntnisstand sind die zellulären ER-Stress Signalwege an der Pathogenese verschiedener Nierenerkrankungen beteiligt (54). Diese ER-Stress-Signalwege können unter anderem durch renale Ischämie oder Hyperglykämie induziert werden (73–75). Die Nutzung von ER-Stress assoziierten Faktoren, die während einer AKI in den Urin abgegeben werden, so genannter ER-Stress Biomarker, erscheint daher vielversprechend.

Zwei potenzielle neue Biomarker aus diesem Bereich wurden bereits publiziert: *Cysteine-rich with EGF-like domains 2* (CRELD2) (76) und *mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor* (MANF) (77). CRELD2 wurde in einer Kohorte der *Translational Research Investigating Biomarker Endpoints in AKI*-Studie (TRIBE-AKI-Studie; 23 kardiochirurgische pädiatrische Patienten) untersucht. Höhere postoperative CRELD2 Konzentrationen im Urin waren mit schwerer postoperativer AKI assoziiert. Für MANF liegen bisher keine Daten aus klinischen Studien vor. Das Protein CHAC1 ist ein weiterer potenzieller neuer Biomarker für die Diagnostik der akuten Nierenschädigung und könnte potenziell auch in der Diagnostik und Therapieevaluation anderer Nierenerkrankungen, die mit ER-Stress assoziiert sind, Anwendung finden.

Die Erforschung neuer Biomarker, beispielsweise im Bereich der ER-Stress Biomarker, kann nicht nur zur Verbesserung der Diagnostik der AKI, sondern auch zu einem besseren grundlegenden Verständnis der Pathogenese verschiedener Formen der AKI beitragen, was wiederum die gezielte Entwicklung neuer Biomarker erleichtern könnte (70). In diesem Zusammenhang steht auch das vor Kurzem im Rahmen der „Precision Medicine Initiative“ des *National Institute of Health* (NIH) gestartete *Kidney Precision Medicine Project* (KPMP) (11,78,79). Ziel dieses Projektes ist es, durch groß angelegte Sammlung und Kategorisierung von Nierenbiopsien einen umfangreichen *kidney tissue atlas* für verschiedene Nierenerkrankungen zu erstellen, um so zunächst zu einem besseren Verständnis der zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen zu gelangen. In Zukunft könnten mithilfe dieser Datensammlung zum Beispiel auch neue Biomarker für die gezielte Diagnostik verschiedener Formen der AKI entwickelt sowie Ansatzpunkte für neue, gezielte Therapien gefunden werden. (79,80)

Ein Ansatz zur Steigerung der diagnostischen Qualität der bereits bekannten neuen Biomarker ist die Nutzung von so genannten Biomarker-Panels, also Kombinationen mehrerer Biomarker. Beispielsweise erreicht die Kombination von TIMP-2 und IGFBP-7 im Urin (*NephroCheck*, Astute Medical) einen höheren AUROC-Wert, als die jeweiligen Marker einzeln betrachtet (22,81). Im Setting der pädiatrischen Herzchirurgie mit kardiopulmonalem Bypass konnte mittels verschiedener Kombinationen der vier Biomarker NGAL, IL-18, L-FABP und KIM-1 (im Urin) ebenfalls eine Verbesserung der postoperativen AKI-Detektion erreicht werden (82).

Eine Strategie zur Integration neuer Biomarker in bestehende diagnostische Konzepte der AKI bietet das Modell der funktionellen und strukturellen Nierenschädigung (Abbildung 14). Dieses Modell bietet die Möglichkeit, neue Biomarker mit dem etablierten Parameter Serumkreatinin zu kombinieren und so die Differentialdiagnostik von Patienten mit AKI im klinischen Alltag zu verbessern. Die meisten neuen Biomarker zeigen im Gegensatz zu Serumkreatinin eine strukturelle Nierenschädigung an. Das Serumkreatinin, wie auch die Diuresemenge, dagegen sind rein funktionelle Marker (vergleiche Kapitel 1. 3).

Durch eine Kombination von bekannten funktionellen Markern und neuen strukturellen Markern kann eine weitergehende Kategorisierung von AKI-Patienten in verschiedene Untergruppen erfolgen. Patienten mit einer reduzierten Nierenfunktion können mithilfe neuer Biomarker auf das Vorliegen einer strukturellen Nierenschädigung untersucht werden. Abbildung 14 zeigt, dass je nach Biomarker-Status eine prärenale oder intrarenale AKI vorliegen kann. (32,86,87)

		Funktion	
		Kreatinin -	Kreatinin +
Struktur	Biomarker -	Normal Funktion intakt Struktur intakt	Prärenale AKI Funktion reduziert Struktur intakt
	Biomarker +	Subklinische AKI Funktion intakt Struktur geschädigt	Intrarenale AKI Funktion reduziert Struktur geschädigt

Abbildung 14 Modell der funktionellen und strukturellen Nierenschädigung. Die Kategorisierung von Subgruppen der AKI erfolgt durch Kombination von Serumkreatinin als Funktionsparameter und neuen Biomarkern der strukturellen Nierenschädigung. AKI Akute Nierenschädigung (engl. *acute kidney injury*) (adaptiert nach (32,86))

Patienten, bei denen eine strukturelle Schädigung ohne reduzierte Nierenfunktion vorliegt, werden nach dem in Abbildung 14 dargestellten Modell als subklinische AKI klassifiziert. Das Konzept der subklinischen AKI wurde in den letzten Jahren im Rahmen der Erforschung neuer Biomarker der AKI entwickelt. Patienten mit einer sogenannten subklinischen AKI entsprechen nicht den KDIGO-Kriterien, sind aber Biomarker-positiv und zeigen ein erhöhtes Risiko eine Nierenersatztherapie zu benötigen sowie längere Aufenthaltszeiten auf der Intensivstation und im Krankenhaus allgemein. In einer Meta-Analyse von 2011 wurden die Daten von 2322 kritisch-kranken Patienten (v.a. mit kardiorenalem Syndrom) aus 10 prospektiven Beobachtungsstudien zu NGAL analysiert (88): Patienten mit erhöhten NGAL-Werten, die kein erhöhtes Serumkreatinin aufwiesen (NGAL + / sKREA -), zeigten eine höhere kurzfristige Morbidität und Mortalität als Patienten ohne erhöhte NGAL- und Serumkreatinin-Werte (NGAL - / sKREA -). Erste Daten aus dem Follow-Up der TRIBE-AKI-Studie zeigen, dass erhöhte Biomarker in der postoperativen Akutphase, speziell IL-18 und KIM-1, bei Patienten mit und ohne nach derzeitigem klinischen Standard diagnostizierter AKI ebenfalls mit einer erhöhten langfristigen Mortalität assoziiert sind (89). (87,88)

Eine weitere Möglichkeit bietet die Kombination neuer Biomarker mit bekannten diagnostischen Tests wie dem Furosemid-Stress-Test (siehe Kapitel 1. 2) oder Risiko-Scores wie dem *Renal angina index* (71). In einer Studie mit 77 Patienten mit früher AKI konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit erhöhten Biomarker-Werten (NGAL und/oder TIMP-2 und IGFBP-7 im Urin) durch anschließende Durchführung eines Furosemid-Stress-Tests die Prognoseabschätzung in Bezug auf Progression der AKI und Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie verbessert werden kann (83).

Der *Renal angina index* kombiniert bekannte Risikofaktoren für die Entwicklung einer AKI (siehe Kapitel 1. 1) mit den Parametern der KDIGO-Kriterien zur Abschätzung des individuellen Risikos eines Patienten eine AKI zu entwickeln (84). Durch eine standardisierte Risikostratifizierung anhand der Klinik und etablierter Nierenfunktionsparameter mit anschließender gezielter Messung von Biomarkern könnte die diagnostische Aussagekraft der Biomarker verbessert werden (71). Dieses Konzept konnte in einer ersten Studie mit pädiatrischen Intensivpatienten erfolgreich getestet werden. Durch die Addition von Biomarkern (u.a. NGAL) zum *renal angina index* konnte in der Studienpopulation eine Verbesserung der Vorhersage einer schweren AKI erreicht werden (85).

In Zukunft könnte auch für den potenziellen Biomarker CHAC1 die diagnostische Wertigkeit durch eine Kombination mit bekannten diagnostischen Tools oder die Integration in ein Biomarker-Panel erhöht werden. Zunächst gilt es jedoch weiterführende Studien durchzuführen, um geeignete Patientenpopulationen zu definieren und relevante klinische Anwendungsbereiche für CHAC1 zu finden.

6. 3. Limitationen dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden alle Messungen von CHAC1 mittels Western Blot durchgeführt, da es für CHAC1 bisher noch keinen kommerziell verfügbaren ELISA gibt. Die ermittelten CHAC1-Konzentrationen sind daher nur Schätzwerte, da der Western Blot nur semiquantitativ ausgewertet werden kann. Die zeitaufwändige Analyse mit vielen Teilschritten ist außerdem fehler- und störanfällig, was zu einer gewissen Variation in den Ergebnissen führen kann.

Bei der Interpretation der Ergebnisse der Teilnephrektomie-Studie ist zu beachten, dass die Studienpopulation insgesamt nur 37 Patienten umfasst. Die Ergebnisse sollten daher in einer größeren Studie validiert werden. Die postoperativ täglich gewonnenen Urinproben ermöglichen Aussagen zum zeitlichen Verlaufsprofil der CHAC1-Konzentration im Urin nach der intraoperativen Nierenschädigung. Die erste postoperative Urinprobe wurde allerdings erst sechs Stunden nach der Operation entnommen. Für präzisere Ergebnisse zur Frühphase nach der Ischämie hätten Urinproben bereits zwei bis drei Stunden postoperativ gesammelt werden müssen, was in dieser Studie jedoch nicht realisiert werden konnte. Außerdem konnten nicht alle geplanten Messzeitpunkte bei jedem Patienten eingehalten werden, sodass die statistische Auswertung einiger Messzeitpunkte sich nicht auf die komplette Studienpopulation bezieht.

Ähnliches gilt für die Fallserie: Die Ergebnisse der Analysen der 15 Patienten sollten für die einzelnen Entitäten der AKI in größeren Kohorten überprüft werden, um genauere Aussagen zur diagnostischen Wertigkeit von CHAC1 in Bezug auf die verschiedenen AKI-Formen ableiten zu können. Aufgrund der Unmöglichkeit der Ermittlung des genauen Zeitpunktes der Nierenschädigung bei den meisten Patienten und der somit uneinheitlichen Entnahmezeitpunkte der Urinproben, ist die zeitliche Einordnung der gemessenen CHAC1-Konzentrationen im Verlauf der AKI kaum möglich.

6. 4. Schlussfolgerung und Ausblick

Nach seiner Entdeckung als potenzieller neuer Biomarker der hyperakuten Nierenschädigung im Tiermodell, wurde das Protein CHAC1 im Rahmen dieser Arbeit erstmals in einem klinischen Setting evaluiert. Es konnte ein Western Blot-Protokoll entwickelt werden, mit dem CHAC1 im Urin von Patienten mit AKI zuverlässig gemessen werden kann.

Die Ergebnisse der Teilnephrektomie-Studie zeigen, dass CHAC1 im Urin von Patienten vor und nach Teilnephrektomie mit der neu entwickelten Western Blot-Methode detektiert werden kann, jedoch in diesem Setting eine niedrige diagnostische Wertigkeit aufweist. CHAC1 im Urin steigt zwar bereits kurz nach der Ischämie an, allerdings unterscheiden sich die gemessenen Konzentrationsanstiege nicht signifikant von den gemessenen Werten in der Kontrollgruppe mit Patienten, die die gleiche Operation ohne Abklemmen der Nierenarterie erhielten. Außerdem weisen die Konzentrationsanstiege eine erhebliche Variabilität auf, sodass eine diagnostische Verwendung von CHAC1 in dieser Patientenpopulation eher nicht erfolgversprechend erscheint.

In der Auswertung der Fallserie im Rahmen der NMKD-Studie konnte gezeigt werden, dass CHAC1 mittels Western Blot auch im Urin von Patienten mit anderen AKI-Ursachen nachweisbar ist. Die Patienten mit schwerem AKI wiesen zudem deutlich höhere CHAC1-Konzentrationen auf als Patienten ohne AKI oder Patienten nach renaler Ischämie bei Teilnephrektomie. Aufbauend auf diese Ergebnisse könnten weitere Studien zur Evaluation von CHAC1 in verschiedenen klinischen Settings, beispielweise bei Patienten mit Sepsis-assoziiertes AKI, durchgeführt werden.

Zurzeit wird ein standardisierter ELISA-Assay für CHAC1 entwickelt, der zukünftig exaktere Messungen von CHAC1 im Urin und eventuell auch im Plasma ermöglichen wird. Durch die kürzere Testzeit beim ELISA wird auch die Untersuchung größerer Patientenkohorten erleichtert, die für die umfassende Evaluation von CHAC1 in jedem Fall benötigt wird.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass das Protein CHAC1 im Setting der Nierenschädigung durch Ischämie-Reperfusion (unilaterale AKI) eine eher niedrige diagnostische Wertigkeit aufweist. Bei schwereren Formen der AKI zeigen sich jedoch vielversprechende Ergebnisse.

Literaturverzeichnis

1. Bellomo R, Kellum JA, Ronco C. Acute kidney injury. *The Lancet*. 2012;380(9843):756–766.
2. Herold G. und Mitarbeiter. Akutes Nierenversagen. In: Herold G. *Innere Medizin: eine vorlesungsorientierte Darstellung; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis*. Köln, Deutschland: Herold; 2015: 633-637.
3. Bihorac A, Yavas S, Subbiah S, Hobson CE, Schold JD, Gabrielli A, Layon AJ, Segal MS. Long-term risk of mortality and acute kidney injury during hospitalization after major surgery. *Ann Surg*. 2009;249(5):851–858.
4. Wu V-C, Wu C-H, Huang T-M, Wang C-Y, Lai C-F, Shiao C-C, Chang C-H, Lin S-L, Chen Y-Y, Chen Y-M, Chu T-S, Chiang W-C, Wu K-D, Tsai P-R, Chen L, Ko W-J, NSARF Group. Long-Term Risk of Coronary Events after AKI. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(3):595–605.
5. Wald R, Quinn RR, Adhikari NK, Burns KE, Friedrich JO, Garg AX, Harel Z, Hladunewich MA, Luo J, Mamdani M, Perl J, Ray JG, University of Toronto Acute Kidney Injury Research Group. Risk of Chronic Dialysis and Death Following Acute Kidney Injury. *Am J Med*. 2012;125(6):585–593.
6. Khadzhyrov D, Schmidt D, Hardt J, Rauch G, Gocke P, Eckardt K-U, Schmidt-Ott KM. The incidence of acute kidney injury and associated hospital mortality - a retrospective cohort study of over 100 000 patients at Berlin's Charité hospital. *Dtsch Arztebl*. 2019;116(22):397–404.
7. Willam C, Eckardt K-U, John S. KDIGO-Leitlinien zum akuten Nierenversagen. *Bayer Arztebl*. 2015;(7-8/2015):344–348.
8. KDIGO AKI Work Group. Section 2: AKI Definition. *Kidney Int Suppl*. 2012;2(1):19–36.
9. Levey AS, Inker LA, Coresh J. GFR Estimation: From Physiology to Public Health. *Am J Kidney Dis*. 2014;63(5):820–834.
10. Segerer K, Wanner C. Nephrologische Diagnostik. In: Segerer K, Wanner C, Steffel J, Luescher T. *Niere und Ableitende Harnwege*. Berlin/Heidelberg, Deutschland: Springer; 2014: 15–27.
11. Kiryluk K, Bomback AS, Cheng Y-L, Xu K, Camara PG, Rabadan R, Sims PA, Barasch J. Precision Medicine for Acute Kidney Injury (AKI): Redefining AKI by Agnostic Kidney Tissue Interrogation and Genetics. *Semin Nephrol*. 2018;38(1):40–51.
12. Field M, Pollock C, Harris D. Glomeruläre Filtration und akutes Nierenversagen. In: *Niere, Integrative Grundlagen und Fälle*. 1. Auflage. München, Deutschland: Elsevier GmbH; 2017: 57–68.
13. Miller TR, Anderson RJ, Linas SL, Henrich WL, Berns AS, Gabow PA, Schrier RW. Urinary Diagnostic Indices in Acute Renal Failure. *Ann Intern Med*. 1978;89(1):47–50.
14. Esson ML, Schrier RW. Diagnosis and treatment of acute tubular necrosis. *Ann Intern Med*. 2002;137(9):744–752.
15. Perazella MA, Coca SG, Kanbay M, Brewster UC, Parikh CR. Diagnostic Value of Urine Microscopy for Differential Diagnosis of Acute Kidney Injury in Hospitalized Patients. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3(6):1615–1619.

16. Espinel CH, Gregory AW. Differential diagnosis of acute renal failure. *Clin Nephrol.* 1980;13(2):73–77.
17. Steiner RW. Interpreting the fractional excretion of sodium. *Am J Med.* 1984;77(4):699–702.
18. Chawla LS, Davison DL, Brasha-Mitchell E, Koyner JL, Arthur JM, Shaw AD, Tumlin JA, Trevino SA, Kimmel PL, Seneff MG. Development and Standardization of a Furosemide Stress Test to Predict the Severity of Acute Kidney Injury. *Crit Care.* 2013;17(5):R207.
19. KGIGO AKI Work Group. Section 3: Prevention and Treatment of AKI. *Kidney Int Suppl.* 2012;2(1):37–68.
20. Zarbock A, John S, Jörres A, Kindgen-Milles D. Neue KDIGO-Leitlinien zur akuten Nierenschädigung: Praktische Handlungsempfehlungen. *Anaesthesist.* 2014;63(7):578–588.
21. KDIGO AKI Work Group. Section 5: Dialysis Interventions for Treatment of AKI. *Kidney Int Suppl.* 2012;2(1):89–115.
22. Bellomo R. Decade in review—acute kidney injury: Acute kidney injury—a decade of progress. *Nat Rev Nephrol.* 2015;11(11):636–637.
23. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69(3):89–95.
24. Ebashi S, Kodama A. A new protein factor promoting aggregation of tropomyosin. *J Biochem (Tokyo).* 1965;58(1):107–108.
25. Katus HA, Remppis A, Looser S, Hallermeier K, Scheffold T, Kübler W. Enzyme Linked Immuno Assay of Cardiac Troponin T for the Detection of Acute Myocardial Infarction in Patients. *J Mol Cell Cardiol.* 1989;21(12):1349–1353.
26. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA, White HD, Executive Group on behalf of the Joint European Society of Cardiology (ESC)/American College of Cardiology (ACC)/American Heart Association (AHA)/World Heart Federation (WHF) Task Force for the Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *Glob Heart.* 2018;13(4):305–338.
27. von Haehling S, Hasenfuß G. Biomarker in der Akutmedizin. *Internist.* 2019;60(6):553–554.
28. Slocum JL, Heung M, Pennathur S. Marking renal injury: can we move beyond serum creatinine? *Transl Res.* 2012;159(4):277–289.
29. Ostermann M, Philips BJ, Forni LG. Clinical review: biomarkers of acute kidney injury: where are we now? *Crit Care.* 2012;16(5):233.
30. Moledina DG, Parikh CR. Phenotyping of Acute Kidney Injury: Beyond Serum Creatinine. *Semin Nephrol.* 2018;38(1):3–11.
31. Pozzoli S, Simonini M, Manunta P. Predicting acute kidney injury: current status and future challenges. *J Nephrol.* 2018;31(2):209–223.
32. Wallbach M, Tampe B, Dihazi H, Koziulek MJ. Akute Nierenschädigung: von Kreatinin zu KIM-1? *Internist.* 2019;60(6):578–586.
33. Schrezenmeier E, Barasch J, Budde K, Westhoff T, Schmidt-Ott KM. Biomarkers in acute kidney injury – pathophysiological basis and clinical performance. *Acta Physiol.* 2017;219(3):554–572.

34. Vanmassenhove J, Kielstein JT, Ostermann M. Have renal biomarkers failed in acute kidney injury? Yes. *Intensive Care Med.* 2017;43(6):883–886.
35. Yilmaz A, Sevketoglu E, Gedikbasi A, Karyagar S, Kiyak A, Mulazimoglu M, Aydogan G, Ozpacaci T, Hatipoglu S. Early prediction of urinary tract infection with urinary neutrophil gelatinase associated lipocalin. *Pediatr Nephrol.* 2009;24(12):2387–2392.
36. Koyner JL, Garg AX, Coca SG, Sint K, Thiessen-Philbrook H, Patel UD, Shlipak MG, Parikh CR, TRIBE-AKI Consortium. Biomarkers Predict Progression of Acute Kidney Injury after Cardiac Surgery. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23(5):905–914.
37. Mungrue IN, Pagnon J, Kohannim O, Gargalovic PS, Lusic AJ. CHAC1/MGC4504 is a novel proapoptotic component of the unfolded protein response, downstream of the ATF4-ATF3-CHOP cascade. *J Immunol.* 2009;182(1):466–476.
38. Kumar A, Tikoo S, Maity S, Sengupta S, Sengupta S, Kaur A, Bachhawat AK. Mammalian proapoptotic factor ChaC1 and its homologues function as γ -glutamyl cyclotransferase acting specifically on glutathione. *EMBO Rep.* 2012;13(12):1095–1101.
39. Bachhawat AK, Kaur A. Glutathione Degradation. *Antioxid Redox Signal.* 2017;27(15):1200-1216.
40. Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calfon M, Sadri N, Yun C, Popko B, Paules R, Stojdl DF, Bell JC, Hettmann T, Leiden JM, Ron D. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell.* 2003;11(3):619–633.
41. Jiang H-Y, Jiang L, Wek RC. The Eukaryotic Initiation Factor-2 Kinase Pathway Facilitates Differential GADD45a Expression in Response to Environmental Stress. *J Biol Chem.* 2006;282(6):3755–3765.
42. Tattoli I, Sorbara MT, Vuckovic D, Ling A, Soares F, Carneiro LAM, Yang C, Emili A, Philpott DJ, Girardin SE. Amino Acid Starvation Induced by Invasive Bacterial Pathogens Triggers an Innate Host Defense Program. *Cell Host Microbe.* 2012;11(6):563–575.
43. Örd D, Örd T, Biene T, Örd T. TRIB3 increases cell resistance to arsenite toxicity by limiting the expression of the glutathione-degrading enzyme CHAC1. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 2016;1863(11):2668–2680.
44. Gargalovic PS, Imura M, Zhang B, Gharavi NM, Clark MJ, Pagnon J, Yang W-P, He A, Truong A, Patel S, Nelson SF, Horvath S, Berliner JA, Kirchgessner TG, Lusic AJ. Identification of inflammatory gene modules based on variations of human endothelial cell responses to oxidized lipids. *Proc Natl Acad Sci.* 2006;103(34):12741–12746.
45. Dorweiler B, Grechowa I, Wallrath A, Vahl CF, Horke S. Activation of the Proapoptotic Unfolded Protein Response in Plaques of the Human Carotid Artery. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2014;48(3):248–257.
46. Galluzzi L, De Santi M, Crinelli R, De Marco C, Zaffaroni N, Duranti A, Brandi G, Magnani M. Induction of Endoplasmic Reticulum Stress Response by the Indole-3-Carbinol Cyclic Tetrameric Derivative CTet in Human Breast Cancer Cell Lines. *PLoS ONE.* 2012;7(8):e43249.
47. Goebel G, Berger R, Strasak AM, Egle D, Müller-Holzner E, Schmidt S, Rainer J, Presul E, Parson W, Lang S, Jones A, Widschwendter M, Fiegl H. Elevated mRNA expression of CHAC1 splicing variants is associated with poor outcome for breast and ovarian cancer patients. *Br J Cancer.* 2012;106(1):189–198.

48. Selvik L-KM, Fjeldbo CS, Flatberg A, Steigedal TS, Misund K, Anderssen E, Doseeth B, Langaas M, Tripathi S, Beisvag V, Læg Reid A, Thommesen L, Bruland T. The duration of gastrin treatment affects global gene expression and molecular responses involved in ER stress and anti-apoptosis. *BMC Genomics*. 2013;14(1):429.
49. Joo NE, Ritchie K, Kamarajan P, Miao D, Kapila YL. Nisin, an apoptogenic bacteriocin and food preservative, attenuates HNSCC tumorigenesis via CHAC1. *Cancer Med*. 2012;1(3):295–305.
50. Chen P-H, Shen W-L, Shih C-M, Ho K-H, Cheng C-H, Lin C-W, Lee C-C, Liu A-J, Chen K-C. The CHAC1-inhibited Notch3 pathway is involved in temozolomide-induced glioma cytotoxicity. *Neuropharmacology*. 2017;116:300–314.
51. Yasuda M, Tanaka Y, Ryu M, Tsuda S, Nakazawa T. RNA Sequence Reveals Mouse Retinal Transcriptome Changes Early after Axonal Injury. *PLoS ONE*. 2014;9(3):e93258.
52. Zhou Y, Bennett TM, Shiels A. Lens ER-stress response during cataract development in Mip-mutant mice. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis*. 2016;1862(8):1433–1442.
53. Magne L, Blanc E, Legrand B, Lucas D, Barouki R, Rouach H, Garlatti M. ATF4 and the integrated stress response are induced by ethanol and cytochrome P450 2E1 in human hepatocytes. *J Hepatol*. 2011;54(4):729–737.
54. Inagi R, Ishimoto Y, Nangaku M. Proteostasis in endoplasmic reticulum—new mechanisms in kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2014;10(7):369–378.
55. Yan M, Shu S, Guo C, Tang C, Dong Z. Endoplasmic reticulum stress in ischemic and nephrotoxic acute kidney injury. *Ann Med*. 2018;50(5):381–390.
56. Linkermann A, Chen G, Dong G, Kunzendorf U, Krautwald S, Dong Z. Regulated Cell Death in AKI. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(12):2689–2701.
57. Segerer K, Wanner C. Akutes Nierenversagen (ANV). In: Segerer K, Wanner C, Steffel J, Luescher T. *Niere und Ableitende Harnwege*. Berlin/Heidelberg, Deutschland: Springer; 2014: 33–39.
58. Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J Clin Invest*. 2004;114(1):5–14.
59. Mishra J, Ma Q, Prada A, Mitsnefes M, Zahedi K, Yang J, Barasch J, Devarajan P. Identification of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as a Novel Early Urinary Biomarker for Ischemic Renal Injury. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(10):2534–2543.
60. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang Y (Lucy), Castro AFI, Feldman HI, Kusek JW, Eggers P, Van Lente F, Greene T, Coresh J, CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration). A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. *Ann Intern Med*. 2009;150(9):604–612.
61. Ebbing J, Seibert FS, Pagonas N, Bauer F, Miller K, Kempkensteffen C, Günzel K, Bachmann A, Seifert HH, Rentsch CA, Ardelt P, Wetterauer C, Amico P, Babel N, Westhoff TH. Dynamics of Urinary Calprotectin after Renal Ischaemia. *PloS One*. 2016;11(1):e0146395.
62. Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, Levin A, Acute Kidney Injury Network. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care*. 2007;11(2):R31.
63. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci*. 1979;76(9):4350–4354.

64. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Meth.* 2012;9(7):671–675.
65. Volpe A, Blute ML, Ficarra V, Gill IS, Kutikov A, Porpiglia F, Rogers C, Touijer KA, Van Poppel H, Thompson RH. Renal Ischemia and Function After Partial Nephrectomy: A Collaborative Review of the Literature. *Eur Urol.* 2015;68(1):61–74.
66. Abassi Z, Shalabi A, Sohotnik R, Nativ O, Awad H, Bishara B, Frajewicki V, Sukhotnik I, Abbasi A, Nativ O. Urinary NGAL and KIM-1: Biomarkers for Assessment of Acute Ischemic Kidney Injury Following Nephron Sparing Surgery. *J Urol.* 2013;189(4):1559–1566.
67. Zhang Z, Zhao J, Dong W, Remer E, Li J, Demirjian S, Zabell J, Campbell SC. Acute Kidney Injury after Partial Nephrectomy: Role of Parenchymal Mass Reduction and Ischemia and Impact on Subsequent Functional Recovery. *Eur Urol.* 2016;69(4):745–752.
68. Tanagho YS, Kaouk JH, Allaf ME, Rogers CG, Stifelman MD, Kaczmarek BF, Hillyer SP, Mullins JK, Chiu Y, Bhayani SB. Perioperative Complications of Robot-assisted Partial Nephrectomy: Analysis of 886 Patients at 5 United States Centers. *Urology.* 2013;81(3):573–580.
69. Parekh DJ, Weinberg JM, Ercole B, Torkko KC, Hilton W, Bennett M, Devarajan P, Venkatachalam MA. Tolerance of the Human Kidney to Isolated Controlled Ischemia. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24(3):506–517.
70. Alge JL, Arthur JM. Biomarkers of AKI: A Review of Mechanistic Relevance and Potential Therapeutic Implications. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2015;10(1):147–155.
71. McMahan BA, Koynier JL. Have biomarkers failed in acute kidney injury? No. *Intensive Care Med.* 2017;43(6):887–889.
72. Prowle JR, Rosner MH. Have biomarkers failed in acute kidney injury? We are not sure. *Intensive Care Med.* 2017;43(6):890–892.
73. Bando Y, Tsukamoto Y, Katayama T, Ozawa K, Kitao Y, Hori O, Stern DM, Yamauchi A, Ogawa S. ORP150/HSP12A protects renal tubular epithelium from ischemia-induced cell death. *FASEB J.* 2004;18(12):1401–1403.
74. Lindenmeyer MT, Rastaldi MP, Ikehata M, Neusser MA, Kretzler M, Cohen CD, Schlöndorff D. Proteinuria and Hyperglycemia Induce Endoplasmic Reticulum Stress. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19(11):2225–2236.
75. Ohse T, Inagi R, Tanaka T, Ota T, Miyata T, Kojima I, Ingelfinger JR, Ogawa S, Fujita T, Nangaku M. Albumin induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in renal proximal tubular cells. *Kidney Int.* 2006;70(8):1447–1455.
76. Kim Y, Park S-J, Manson SR, Molina CAF, Kidd K, Thiessen-Philbrook H, Perry RJ, Liapis H, Kmoch S, Parikh CR, Bleyer AJ, Chen YM. Elevated urinary CRELD2 is associated with endoplasmic reticulum stress-mediated kidney disease. *JCI Insight.* 2017;2(23):e92896.
77. Kim Y, Lee H, Manson SR, Lindahl M, Evans B, Miner JH, Urano F, Chen YM. Mesencephalic Astrocyte-Derived Neurotrophic Factor as a Urine Biomarker for Endoplasmic Reticulum Stress-Related Kidney Diseases. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(10):2974–2982.
78. Collins FS, Varmus H. A New Initiative on Precision Medicine. *N Engl J Med.* 2015;372(9):793–795.

79. Kidney Precision Medicine Project. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK). National Institutes of Health (NIH). Bethesda (Maryland), USA. (Accessed June 14, 2019 at <https://www.niddk.nih.gov/research-funding/research-programs/kidney-precision-medicine-project-kpmp>).
80. de Caestecker M, Harris R. Translating Knowledge Into Therapy for Acute Kidney Injury. *Semin Nephrol.* 2018;38(1):88–97.
81. Liu C, Lu X, Mao Z, Kang H, Liu H, Pan L, Hu J, Wang L, Zhou F. The diagnostic accuracy of urinary [TIMP-2]·[IGFBP7] for acute kidney injury in adults: A PRISMA-compliant meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2017;96(27):e7484.
82. Krawczeski CD, Goldstein SL, Woo JG, Wang Y, Piyaphanee N, Ma Q, Bennett M, Devarajan P. Temporal Relationship and Predictive Value of Urinary Acute Kidney Injury Biomarkers After Pediatric Cardiopulmonary Bypass. *J Am Coll Cardiol.* 2011;58(22):2301–2309.
83. Koyner JL, Davison DL, Brasha-Mitchell E, Chalikonda DM, Arthur JM, Shaw AD, Tumlin JA, Trevino SA, Bennett MR, Kimmel PL, Seneff MG, Chawla LS. Furosemide Stress Test and Biomarkers for the Prediction of AKI Severity. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26(8):2023–2031.
84. Goldstein SL, Chawla LS. Renal Angina. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010;5(5):943–949.
85. Basu RK, Wang Y, Wong HR, Chawla LS, Wheeler DS, Goldstein SL. Incorporation of Biomarkers with the Renal Angina Index for Prediction of Severe AKI in Critically Ill Children. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2014;9(4):654–662.
86. Murray PT, Mehta RL, Shaw A, Ronco C, Endre Z, Kellum JA, Chawla LS, Cruz D, Ince C, Okusa MD, ADQI 10 workgroup. Potential use of biomarkers in acute kidney injury: report and summary of recommendations from the 10th Acute Dialysis Quality Initiative consensus conference. *Kidney Int.* 2014;85(3):513–521.
87. Huen SC, Parikh CR. Molecular phenotyping of clinical AKI with novel urinary biomarkers. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2015;309(5):F406–413.
88. Haase M, Devarajan P, Haase-Fielitz A, Bellomo R, Cruz DN, Wagener G, Krawczeski CD, Koyner JL, Murray P, Zappitelli M, Goldstein SL, Makris K, Ronco C, Martensson J, Martling C-R, Venge P, Siew, E, Ware LB, Iqbal Z, Mertens PR. The Outcome of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin-Positive Subclinical Acute Kidney Injury. *J Am Coll Cardiol.* 2011;57(17):1752–1761.
89. Coca SG, Garg AX, Thiessen-Philbrook H, Koyner JL, Patel UD, Krumholz HM, Shlipak MG, Parikh CR, TRIBE-AKI Consortium. Urinary Biomarkers of AKI and Mortality 3 Years after Cardiac Surgery. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(5):1063–1071.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Paula Halbeisen, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Evaluation von CHAC1 als Marker der akuten Nierenschädigung nach renaler Ischämie“ / “Evaluation of CHAC1 as a marker of acute kidney injury after renal ischemia“ 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/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

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

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Kai Schmidt-Ott für die Überlassung des Themas und für seine Unterstützung während der gesamten Durchführung des Projektes. Außerdem danke ich Frau Dr. med. Eva-Vanessa Schrezenmeier, meiner zweiten Betreuerin, für die ausführliche Einarbeitung in die Thematik und die praktische Arbeit im Labor und dafür, dass Sie mir auch im weiteren Verlauf des Projektes stets zuverlässig mit Rat und Tat zur Seite stand. Ich möchte mich natürlich auch beim gesamten Team der Arbeitsgruppe Schmidt-Ott am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin-Buch bedanken. Außerdem danke ich Herrn Dr. med. Jan Ebbing und Herrn Prof. Dr. med. Timm H. Westhoff für die Bereitstellung der Urinproben der Teilnephrektomie-Studie. Schlussendlich möchte ich auch dem Team der *Mass Spectrometry and Proteomics Core Unit* des Max-Delbrück-Centrums für die unkomplizierte und produktive Zusammenarbeit danken.