

Proteomuntersuchung von Körperflüssigkeiten
mittels online gekoppelter
Kapillarelektrophorese – Massenspektrometrie
als Routineverfahren der Diagnostik

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Ing. Thorsten Kaiser
geboren am 11.05.1968 in Unna

(2004)

Schlagworte: **Proteomuntersuchung, Körperflüssigkeiten, CE-MS**

Key words: **Proteomics, body fluids, CE-MS**

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Harald Mischak für die Gelegenheit, meine Promotionsarbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen. Neben der Anregung, eine komplexe Proteomuntersuchung mit den beschriebenen Verfahren durchzuführen, stellte Herr Prof. Dr. Mischak nicht nur die technische Ausstattung, sondern auch die Kontakte zur Beschaffung der notwendigen Proben zur Verfügung. Nicht zuletzt haben seine konstruktive Anregungen und Diskussionen zu einer erfolgreichen Durchführung meiner Arbeit beigetragen.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Bernd Otto für die freundliche Übernahme der Begutachtung und Vertretung meiner Arbeit vor dem Fachbereich Chemie der Universität Hannover.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern der mosaiques diagnostics GmbH für ihre Hilfe bei der Bewältigung der vorhandenen Probleme und für die Freude an der täglichen Arbeit. Insbesondere gilt mein Dank Meike Hillmann, Frank Hausadel, Peer Köster, Igor Golovko und Dr. Stefan Wittke.

Für die Umsetzung der Softwareentwicklung danke ich Sebastian Bartel und Ronald Krebs. Ohne ihre hervorragenden Fähigkeiten hätten die erzeugten Datenmengen nicht bewältigt werden können.

Herrn Dr. Mark Dangers danke ich für viele anregende Diskussionen und Hilfen, aber auch für die manchmal notwendigen entspannenden Stunden.

Nicht vergessen möchte ich an dieser Stelle meine Eltern, die mich überhaupt erst soweit gebracht haben. Meiner Schwester Nina danke ich für alle Anregungen, Anstöße und die Hilfe beim Verfassen der Dissertation. Der lieben Helga danke ich für die Korrektur der Arbeit.

Mein besonderer und größter Dank gilt aber Andrea, die mir während der ganzen Zeit eine große Hilfe gewesen ist und mich stets mit Rat und Tat unterstützt hat. Ohne sie wäre ich nicht soweit gekommen.

Für Sophia.

Zusammenfassung

Proteomuntersuchungen, in der wissenschaftlichen Praxis längst in Form unterschiedlicher Techniken etabliert, haben bis heute keinen Zugang in die klinische Praxis gefunden. Ein Verfahren, welches Krankheiten zuverlässig diagnostizieren kann, muss dafür eine hochauflösende Technik mit guter Automatisierbarkeit und einem der Vielfältigkeit des Proteoms gerecht werdenden Lösungsansatz kombinieren. Eine Technologie, die diese Voraussetzungen erfüllen kann, ist die on-line Kopplung einer Kapillarelektrophorese als hochauflösende Trenntechnik mit einem Elektrospray-Massenspektrometer zur Detektion und Charakterisierung der Proteine. Die hier vorgestellte Arbeit kombiniert diese beiden Techniken zur Untersuchung einfach zugänglicher Körperflüssigkeiten und wendet Verfahren zur Proteom-Muster-Erkennung an, um klinisch relevante Fragestellungen zu beantworten.

Durch die Untersuchung des Urins von 195 Proben gesunder Probanden und Patienten mit klinisch manifestierten Nierenerkrankungen (diabetische Nephropathie, fokalsegmentaler Glomerulosklerose, membranöser Glomerulopathie, Minimalchanges-Glomerulopathie) wurde ein Proteommuster für Nierenschädigungen ermittelt, welches diese mit einer Sensitivität von 90 % und einer Spezifität von 99 % zu erkennen vermag. Durch eine Kombination aus Krankheits- und differentialdiagnostischen Mustern kann eine diabetische Nephropathie in 86 % aller Fälle von anderen Erkrankungen der Niere abgegrenzt werden. Die Untersuchung weiterer Proben zeigt, dass die verwendete Technik eher in der Lage ist, beginnende Nierenschäden zu erkennen, als die heute verwendeten Gesamtproteintests. In weiteren Studien wird die Verwendbarkeit der Technik für Plasma und Dialysat gezeigt. Eine vierte Untersuchung beschäftigt sich mit der Analyse von Urinproben von Patienten nach einer Stammzelltransplantation. Mit Hilfe der eingesetzten Proteomdiagnostik kann dabei die Gefahr einer Abstoßungsreaktion des Transplantates frühzeitig erkannt werden.

Die in dieser Arbeit entwickelte Technologie bringt alle Voraussetzungen mit sich, um den Sprung von der wissenschaftlichen Forschung in die klinische Praxis schnell zu schaffen. Das Verfahren ist schnell, hochautomatisierbar und beinhaltet ein dem Proteom gerecht werdendes enormes Informationspotenzial. Die Kombination aus der Untersuchung des Proteoms von Körperflüssigkeiten mittels Kapillarelektrophorese/Massenspektrometrie und bioinformatischen Muster-Algorithmen kann in der Zukunft ein Diagnosetool darstellen, um den Gesamtzustand des Körpers und einzelne Erkrankungen routinemäßig zu erfassen.

Abstract

The analysis of the proteome, established in science with different technologies, still has not entered clinical praxis. A method for the reliable diagnosis of diseases has to be with high-resolution, fully automatic and utilizing techniques that are able to deal with the manifoldness of the proteome.

One technique which accomplish these requirements is the on-line coupling of capillary electrophoresis with electrospray mass spectrometry for protein separation, detection and characterization. This work combines these technologies for the analysis of easily accessible body fluids and uses proteome pattern recognition algorithms to solve clinical relevant questions.

After measurement of 195 urine samples from healthy individuals and patients with renal diseases (diabetic nephropathy, focal segmental glomerulosclerosis, membranous glomerulonephritis, minimal changes glomerulonephritis) a proteome pattern for the diagnosis of renal diseases was established with a sensitivity of 90% and a specificity of 99%. By utilizing a combination of disease-specific pattern and those for differential diagnosis the affection with diabetic nephropathy can distinguished from other renal diseases in 86% of the analyzed samples. The used technique seems to be more sensible for the detection of beginning nephritic damage than other technologies used today.

Other studies show the usability of the system for plasma and dialysis fluids. A forth study has analyzes urine samples from patients after hematopoietic stem cell transplantation. Utilizing the proteome pattern diagnostic the risk of a severe graft versus host reaction can be recognized at an early stage.

The technology established in this work shows all preconditions to enter clinical science. The method is fast, high-automatically and reveals all the information within the proteome. In future the combination of body fluid analysis by capillary electrophoresis / mass spectrometry and bioinformatic pattern recognition may lead to a diagnostic tool that depict the health state of the body and identifies single diseases by routine analysis.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	4
Abstract	5
1. Einleitung	
1.1. Proteomuntersuchungen von Körperflüssigkeiten	10
1.2. CE – MS – Technik	
1.2.1. Kapillarelektrophorese von Proteinen	15
1.2.2. Massenspektrometrie	24
1.2.3. Kopplungstechniken	30
1.3. Urin – Proteomuntersuchungen	33
1.3.1. Zusammensetzung und Eigenschaften von humanem Urin	34
1.3.2. Das Proteom des humanen Urins	37
1.3.3. Diabetes und die diabetische Nephropathie	40
1.3.4. Andere wichtige Nephropathien	45
1.3.5. GvHD nach Stammzelltransplantation	47
1.4. Plasma – Proteomics	
1.4.1. Zusammensetzung und Eigenschaften des humanen Plasmas	50
1.4.2. Das Proteom des humanen Plasmas	51
1.5. Dialysat – Proteomics	55
2. Material und Methoden	
2.1. CE – MS – Technik	
2.1.1. Kapillarelektrophorese	60
2.1.2. Massenspektrometrie	61
2.1.3. Kopplungstechnik	61
2.1.4. MALDI MS/MS – Technik	62
2.1.5. Zusammensetzung der Standardlösung	63
2.2. Datenaufzeichnung und –prozessierung	
2.2.1. Datenaufzeichnung	64
2.2.2. Auswertung der Messungen	65

2.2.3. Datenbanken und nachfolgende Bearbeitung	65
2.3. Proben	
2.3.1. Urinproben zur Untersuchung der diabetischen Nephropathie	66
2.3.2. Urinproben anderer Nierenerkrankungen	67
2.3.3. Urinproben von Kontrollpatienten	67
2.3.4. Urinproben von Patienten nach Stammzelltransplantation	67
2.3.5. Dialysatproben	68
2.3.6. Plasmaproben	68
2.4. Probenpräparation	
2.4.1. Präparation von Urinproben	68
2.4.2. Präparation von Dialysatproben	69
2.4.3. Präparation von Plasmaproben	69
2.4.4.	
2.5. Proteom-Muster-Generierung und Auswertung	
2.5.1. Diabetische Nephropathie und andere Nierenerkrankungen	70
2.5.2. Nachweis von Arteriosklerose in Plasma	72
2.5.3. Vergleich verschiedener Dialysate	73
2.5.4. Zeitlicher Verlauf von GvH Reaktionen	73
3. Ergebnisse und Auswertung	
3.1. CE – MS – Technik	
3.1.1. Aufbau und Etablierung eines Kapillarelektrophorese – Elektrospray – Time-Of-Flight-Massenspektrometrie – Systems	74
3.1.2. Prozessierung der erzeugten Daten	80
3.1.3. Proteomuntersuchung von Körperflüssigkeiten mittels CE-MS	84
3.2. Untersuchungen zur Diagnose der diabetischen Nephropathie und anderer Nierenerkrankungen anhand von Urinproben	
3.2.1. Markerdefinitionen	89
3.2.2. Anwendung der definierten Muster auf individuelle Proben	111
3.2.3. Ergebnisse der Anwendung der definierten Muster auf individuelle Proben	113
3.3. Ergebnisse der Untersuchung von Plasma	119
3.4. Ergebnisse der Untersuchungen von Dialysaten	123
3.5. Ergebnisse der Untersuchungen zur Stammzelltransplantation	129
4. Diskussion und Ausblick	
4.1. Proteomics zur klinischen Diagnostik	134

4.2. Etablierung der CE – MS – Messtechnik	135
4.3. Proteomuntersuchung im Urin: Nierenerkrankungen	137
4.4. Proteomuntersuchung im Plasma	141
4.5. Proteomuntersuchung im Dialysat	143
4.6. Proteomuntersuchung im Urin als Verlaufskontrolle nach einer Stammzelltransplantation.....	144
4.7. Ausblick	146
5. Verzeichnis der Abkürzungen	148
6. Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen	149
7. Literaturverzeichnis	151
Anhang I	163
Anhang II	169
Lebenslauf	170
Publikationsliste	172

*Erstlich ward er ein Leu mit fürchterlich wallender Mähne,
Drauf ein Pardel, ein bläulicher Drach', und ein zürnender Eber,
Floss dann als Wasser dahin, und rauscht' als Baum in den Wolken.*

Homer, Odyssee, 4. Gesang
über Proteus, einem göttlichen Greis,
der sich in vielerlei Gestalt zeigen konnte.
Erst als er mit Gewalt überwunden werden konnte, zeigte er
sich in seiner wahren Gestalt und konnte dann über
die Vergangenheit, die Gegenwart und die Zukunft weissagen.

1. Einleitung

1.1 Proteomuntersuchungen von Körperflüssigkeiten

In den vergangenen Jahren hat sich die Erkenntnis dahingehend gefestigt, dass bei der Untersuchung pathologischer Situationen auf molekularer Ebene die Betrachtung des zugrunde liegenden Proteoms eine entscheidende Rolle spielt. Weder genomische Untersuchungen, noch die isolierte Betrachtung einzelner Proteine stellen ein ausreichendes Kriterium zur Beurteilung der Prozesse dar, die eine Erkrankung bewirken. Die zellulären Prozesse, die der Expression eines Proteins zugrunde liegen und die fortlaufende intra- und extrazelluläre Kontrolle seiner Funktion und seiner Degradation sind dermaßen vielschichtig, dass nur die weitestgehend vollständige und möglichst quantitative Untersuchung des beteiligten Proteoms einen ausreichenden Einblick in die Vorgänge gewährt und eine Aufklärung ermöglicht.

Neben der Untersuchung des Proteoms einzelner Zelltypen und Gewebeverbände steht die Betrachtung des Proteoms der verschiedenen Körperflüssigkeiten (body fluids) im Vordergrund des wissenschaftlichen Interesses. Körperflüssigkeiten wie Blut und Lymphe dienen nicht nur der Stoff- und Informationsübermittlung im Körper, sie stellen auch exzellente, proteinreiche Informationsquellen dar, die Auskunft über das geben können, was sie auf der Reise durch den Körper entdeckt haben (Wulfkuhle et al. 2003).

Im Mittelpunkt des Interesses der wissenschaftlichen Forschung steht natürlich das menschliche Blut-Proteom, welches aufgrund seiner zentralen Rolle in der klinischen Diagnostik und einfachen Verfügbarkeit die mit Abstand am meisten mit Mitteln der Proteomforschung untersuchte Körperflüssigkeit darstellt (Tabelle 1.1). Doch auch Urin und Liquor werden zurzeit mit wachsendem Interesse betrachtet.

Genauso vielseitig wie die untersuchten Körperflüssigkeiten und die zugrunde liegenden Ziele der Proteomforschung sind die dabei verwendeten Technologien. Begründet durch die Eigenheit der Idee, die hinter Proteomics-Studien steht, möglichst alle

vorhandenen Proteine gleichzeitig zu betrachten, besteht jedes darin verwendete Verfahren aus wenigstens zwei Schritten, einer effizienten Trenntechnik und einer sensitiven Nachweisttechnik.

Eine der verwendeten Kerntechnologien ist immer noch die vor 25 Jahren durch O'Farrell entwickelte zweidimensionale Gelelektrophorese (Gorg et al. 1988; Klose 1975; O'Farrell 1975) (2DE), deren unbestreitbare Vorteile in ihrer einfachen Handhabung und der nicht zuletzt daraus resultierenden weiten Verbreitung liegt. Die zweite Kerntechnologie, welche die Proteomforschung entscheidend vorangebracht hat, ist die Detektion und Identifizierung der zuvor getrennten Polypeptide mittels Massenspektrometrie (MS), welche heute den Gold-Standard der klinischen Proteomforschung darstellt (Pusch et al. 2003).

Tabelle 1.1: In NCBI PubMed gelistete Veröffentlichungen über „Proteomics“.
Stand 14. Dez. 2003.

Suchbegriff „proteome“ and ...	Total	Jahr der Publikation					Technologie				
		- 1999	2000	2001	2002	2003 (Jan- Dez)	2DE	LC	CE	SELDI	MS
„Blood“	185	9	15	41	62	58	91	34	2	10	87
„Plasma“	74	5	8	12	19	30	45	13	-	2	43
„Serum or sera“	116	8	7	24	43	34	64	29	3	10	69
„Urine or urinary“	38	5	6	12	9	6	14	6	-	2	13
„Cerebrospinal fluid“	18	-	2	5	6	5	10	1	1	-	10
„lymph“	6	1	-	-	3	2	4	1	-	2	3
„Aqueous humor“	3	1	-	-	1	1	1	-	1	1	2
„Synovial fluid“	3	-	-	1	1	1	2	-	-	-	1
Gesamt		29	38	95	144	137					

Die zur Verfügung stehenden Technologien, einzeln oder in Kombination verwendet, erlauben ein immer detaillierteres Bild des Proteoms einer Probe zu erzeugen. Pieper et al. haben durch multidimensionale Trenntechniken (Immunoaffinitäts-Chromatographie, Anionenaustausch-Chromatographie, Größenausschluss-Chromatographie, zweidimensionale Gelelektrophorese) sowie MALDI-TOF- und LC(C18)-MS/MS-Identifikation humanes Plasma in nahezu 3700 Proteinspots aufgetrennt (Pieper et al. 2003b; Pieper et al. 2003a). Es hat sich jedoch gezeigt, dass aufgrund von vielen post-translationalen Modifikationen daraus „nur“ 325 unterschiedliche Proteine identifiziert werden konnten. Mit ähnlichen Verfahren, basierend auf μ LC-MS/MS einer zunächst ultrafiltrierten und anschließend Trypsin-behandelten Probe, haben Tirumalai et al. das „low-molecular-weight“ Serum Proteom untersucht und darin 340 verschiedene Proteine identifiziert (Tirumalai et al. 2003).

Mittels 2DE und MALDI-TOF-Analyse haben Sinz et al. Synovialflüssigkeit und Blutplasma von Patienten mit rheumatoider Arthritis vergleichend untersucht (Sinz et

al. 2002). Lorenz et al. haben ebenfalls Synovialflüssigkeit untersucht, sich dabei aber zur Detektion und Identifikation einer Western-Blot-Technologie mit 791 verschiedenen Antikörpern bedient (Lorenz et al. 2003).

Die Proteine im Speichel wurden von Ghafouri et al. mittels 2DE getrennt und analysiert (Ghafouri et al. 2003). Vejda et al. identifizierten Proteinveränderungen im Plasma von Prostata-, Brust- und Lungenkrebspatienten mit Hilfe von zweidimensionaler Gelelektrophorese (Vejda et al. 2002). He et al. berichten von Biomarkern für Hepatitis B Virusinfektionen im Serum, die in 2DE Gelen gefunden wurden (He et al. 2003). Rohde (Rohde et al. 1998a; Rohde et al. 1998b) beschreibt die Untersuchung der Proteine des Kammerwassers im Auge nach Membrankonzentrierung, Kapillarelektrophorese und Massenspektrometrie. Die Proteine in Lymphe sind von Leak et al. parallel mittels 2DE und SELDI untersucht worden (Leak et al. 2004).

Die Vielzahl der bekannten Technologien ermöglicht es, die den Krankheiten zugrunde liegenden Ursachen mit unterschiedlichen Methoden zu erforschen. Steel et al. (Steel et al. 2003) berichten von Serumuntersuchungen mittels 2DE zur Findung von Biomarkern des hepatozellulären Karzinoms, während Rosty et al. (Rosty et al. 2002) diese mittels Protein Biochip Technologie (SELDI) im Pankreas aufspürten. Auch die Suche nach Biomarkern für Eierstockkrebs wurde anhand von 2DE (Jones et al. 2002), wie auch unter Verwendung der SELDI-Technologie, beschrieben (Issaq et al. 2002b; Petricoin et al. 2002b; Rai et al. 2002). Bei der Untersuchung der an der Alzheimer'schen Krankheit beteiligten Proteine wurden sowohl Blut (Ueno et al. 2000) als auch im großen Umfang auch Liquor (Cerebrospinalflüssigkeit) (Blennow et al. 2003; Choe et al. 2002; Sjogren et al. 2001; Tsuji et al. 2002) betrachtet.

Das Ziel jeder durchgeführten Proteomstudie ist das Verständnis der grundlegenden Zusammenhänge, eine Vermehrung des Wissens der molekularen Medizin und natürlich das Aufspüren von Biomarkern.

Die Suche nach einem Biomarker, der idealer Weise als Reaktion auf eine pathologische Situation in seiner Konzentration verändert und in eine leicht zugängliche Körperflüssigkeit, wie Urin oder Blut, ausgeschieden wird, besteht in der Regel darin, verschiedene Proteome zu definierten Zeitpunkten zu vergleichen (Wulfkühle et al. 2003). Doch obwohl es erfolgreiche Beispiele für diesen Ansatz gibt (Kim et al. 2002), ist er zeit- und arbeitsaufwendig, da die Identifizierung und Charakterisierung von tausenden potentieller Marker in einer Körperflüssigkeit Jahre dauern kann (Petricoin et al. 2002a).

Ein vielversprechender Ansatz zur Lösung dieses Problems ist die Muster- oder Pattern-Diagnostik der Proteine einer Probe. Dieses Verfahren, das bereits bei verschiedenen Studien erfolgreich angewendet wurde (Adam et al. 2002; Jones et al. 2002; Petricoin et al. 2002a; Petricoin et al. 2002b; Wulfkuhle et al. 2003), bietet die Voraussetzungen, die eine klinische Proteomanalyse als Hochdurchsatztechnologie benötigt. Nicht mehr der einzelne, ideale Biomarker wird für die Diagnose verwendet, sondern ein Muster hoch- oder herunterregulierter Marker, die jeder für sich gar nicht genau charakterisiert sein müssen, in ihrer Gemeinsamkeit aber zur Klassifizierung der Probe beitragen. Dabei geht der Labor-Teil der Proteomforschung nahtlos über in den Bereich der Bioinformatik, die mit geeigneten statistischen Methoden, wie Baum- oder Clusteranalysen (Hecker et al. 2003; Petricoin et al. 2002a), der biomedizinischen Forschung Methoden zur Verfügung stellt, um die schier unübersichtliche Datenmenge zu reduzieren und auszuwerten.

Das Proteom einer Zelle, eines Organs oder einer Körperflüssigkeit stellt im Gegensatz zu dem ihm zugrunde liegenden Genom ein hoch dynamisches System dar. Aus einzelnen Gensequenzen können im Zuge der Translation und Prozession unterschiedliche Proteine hervorgehen. Diese werden im Folgenden häufig durch Phosphorylierung, Glycosylierung, Acetylierung, Methylierung oder proteolytisch modifiziert, so dass eine unübersehbare Vielzahl an verschiedenen Proteinen entsteht. Die Konzentrationen einzelner Proteine liegen häufig bis zu 5 Zehnerpotenzen auseinander, was deren analytische Erfassung weiter erschwert.

Dennoch stehen heute mit den vorhandenen Techniken und dem in den vergangenen Jahren aufgebauten Wissen über das Genom alle Möglichkeiten zur Verfügung, hochsensible und zuverlässige Verfahren zu etablieren, um die in dem Proteom steckenden Informationen im großen Durchsatz zu erforschen. Mittels einer Kombination aus Grundlagenforschung, Technologieentwicklung und Datenverarbeitung kann es in den kommenden Jahren gelingen, die Proteomforschung als klinisches Verfahren zu etablieren und die ungeheure Information, die in einem umfangreichen und dynamischen System wie dem Proteom einer Körperflüssigkeit steckt, zu bewältigen und nutzbar zu machen (Aebersold et al. 2001).

Um dieses Ziel zu erreichen, bedarf es einer Technologie, die die notwendigen Rahmenbedingungen (schnelle Analyse, hohe Automatisierbarkeit, Robustheit und Zuverlässigkeit) mit einem Optimum an Sensitivität und Auflösung verbindet. Diese Voraussetzungen sind bei den heute üblichen Techniken nicht erfüllt (Neuhoff et al. 2004), weshalb sich diese Arbeit mit einem neuen Ansatz beschäftigt.

Die online-Verbindung von Kapillarelektrophorese und Massenspektrometrie berücksichtigt die genannten Voraussetzungen und stellt eine geeignete Technik dar, um Proteomanalysen im benötigten Umfang durchzuführen. Bei der Kapillarelektrophorese handelt es sich um eine äußerst hochauflösende Technik, die zudem in der Proteinanalytik etabliert ist. Die auf dem Markt befindlichen Geräte sind auf einen hohen Probendurchsatz ausgelegt und bieten damit die Möglichkeit, eine Vielzahl an Proben automatisch abzuarbeiten. Die Massenspektrometrie ist in dieser Kombination nicht nur das Detektionssystem, sondern stellt mittels der aufgezeichneten Informationen (Masse/Ladung, Isotopenabstand) eine zweite Dimension dar, die es erlaubt, auch solche Analyten von einander zu unterscheiden, die innerhalb des Elektrophoreselaufs nicht getrennt wurden. Werden diese beiden Techniken mit Hilfe eines Elektrosprays miteinander verbunden, so entsteht eine neue analytische Technologie, die hochauflösend, automatisierbar und robust ist und deren Informationsgewinn dem Proteom gerecht wird.

Werden als Probenquelle dazu noch einfach zu gewinnende Körperflüssigkeiten, wie Urin oder Plasma, verwendet, so steht ein diagnostisches Werkzeug zur Verfügung, das die Möglichkeit bietet, jede im Proteom abgebildete Erkrankung im Routineverfahren nachzuweisen.

Neben der Entwicklung einer neuen Technik für die Proteomforschung, steht in dieser Arbeit der Nachweis ihrer Eignung für klinisch relevante Fragestellungen im Vordergrund. Bei der Untersuchung von Urin als einfachste zu gewinnende Körperflüssigkeit stellt sich unmittelbar die Frage der Diagnose von Nierenerkrankungen. Die weltweit am häufigsten auftretende Nierenschädigung ist die diabetische Nephropathie, deren Diagnose daher im Mittelpunkt dieser Arbeit steht. Aber auch die Diagnose, beziehungsweise differenzialdiagnostische Abgrenzung, anderer wichtiger Nephropathien wird untersucht. Weiterhin wird die Eignung der Technologie zur Proteomanalytik von Plasma und Dialysat gezeigt. Anhand eines vierten Beispiels, das sich mit der Untersuchung des Urin-Proteoms nach Stammzelltransplantationen beschäftigt, wird schließlich der Einsatz bei zeitkritischen Diagnosen, wie der frühzeitigen Erkennung von Abstoßungsreaktionen, dargestellt. Dabei gehen alle Untersuchungen von der Überlegung aus, dass es nicht einzelne Polypeptide sind, deren An- oder Abwesenheit eine Erkrankung darstellen. Statt dessen wird immer ein Muster aus einzelnen Markern betrachtet, dessen mehr oder weniger vorhandene Übereinstimmung mit einer Probe, eine Diagnose ermöglicht.

1.2 CE – MS – Technik

1.2.1 Kapillarelektrophorese von Proteinen

Die Elektrophorese als analytische Trenntechnologie für Proteine wurde bereits 1930 von Tiselius mit einer Arbeit über die Trennung der Blutplasmaproteine Albumin, alpha-, beta- und gamma-Globulin eingeführt (Tiselius 1930). Seit dieser 1948 mit dem Nobelpreis gewürdigten Arbeit wurden eine Reihe von Variationen wie Papier- und Gelelektrophorese entwickelt, unterschiedliche Trägermaterialien wie Agar, Gelatine und Polyacrylamid eingesetzt, bis hin zu der Einführung der heutigen hochauflösenden zweidimensionalen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit immobilisierten pH-Gradienten.

Obwohl bereits 1967 von Hjertén (Hjerten 1967) die Möglichkeit der Elektrophorese in Glasröhren gezeigt wurde, gelang der Kapillarelektrophorese der Durchbruch erst im Jahr 1981, als Jorgenson und Lukacs in ihrer Arbeit die hohe Auflösungskapazität dieser Technik demonstrierten (Jorgenson et al. 1981). Der einfache und effiziente Aufbau, der damals von ihnen verwendet worden ist, eine gezogene Glaskapillare mit weniger als 100 µm Innendurchmesser, hohe Spannung von 30 kV sowie direkte UV-Detektion in der Kapillare, bildet auch heute noch die Basis für die meisten im Handel erhältlichen Geräte.

Die Kapillarelektrophorese (CE) stellt inzwischen in vielen Bereichen eine weithin akzeptierte Trenntechnologie mit hoher Trennschärfe dar, vergleichbar mit gängigen HPLC-Techniken (Manabe 1999). Lediglich in der Proteomforschung wird die in den vergangenen Jahren deutlich stärker entwickelte Gelelektrophorese vorgezogen. Dabei liegt die Stärke der Kapillarelektrophorese gegenüber Gaschromatographie (GC), Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC), Dünnschichtchromatographie (DC) und Plattengelelektrophorese (SGE) nicht zuletzt in ihrer universellen Anwendbarkeit, so auch für komplexe Proteingemische. Keine andere Technologie ist in der Lage, anorganische Ionen, organische Moleküle und große Biomoleküle mit einem Gerät und in den meisten Fällen auch mit der gleichen Kapillare, nur mit unterschiedlicher Zusammensetzung des Laufpuffers zu trennen. Zusätzlich besitzt die Kapillarelektrophorese aufgrund der vorliegenden Pfropfenströmung und einer minimalen Diffusion die höchste Auflösung aller Trennverfahren in flüssigen Medien. Verglichen mit

konventionellen Gelelektrophoresen ist die Kapillarelektrophorese schneller und erzielt eine wesentlich höhere Auflösung (Issaq 2000). CE benötigt wenige Nanoliter an Probe und Mikroliter an Puffern, während für SGE, HPLC und DC Mikroliter an Probe benötigt werden und häufig große Mengen an Puffer-Abfällen entstehen, die organische Zusätze oder toxische Reagenzien enthalten. CE bietet zwar, anders als SGE und DC, nicht die direkte Möglichkeit einer zweidimensionalen Trennung, kann aber einfach an andere Techniken, wie HPLC, Massenspektrometrie (MS) oder Kernresonanzspektrometrie (NMR) gekoppelt werden.

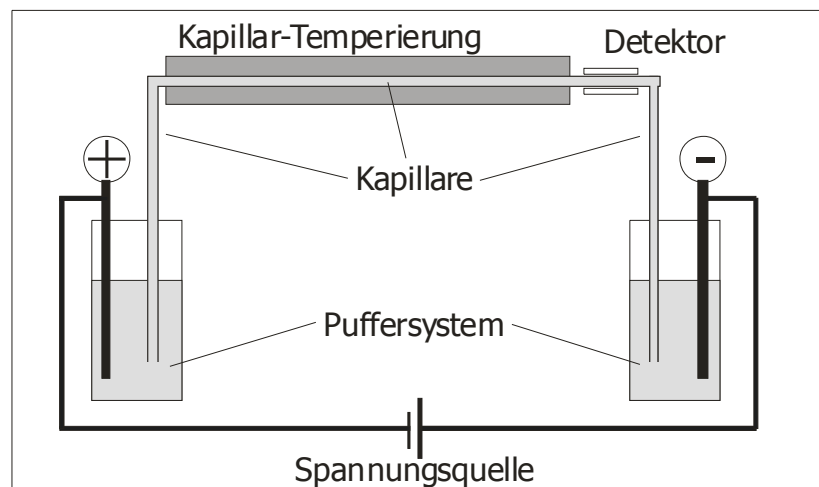


Abbildung 1.2: Aufbau eines Kapillarelektrophoresesystems

Die Kapillarelektrophorese ist eine einfache analytische Technologie. Der jeder CE zugrunde liegende Aufbau besteht aus 4 wichtigen Teilen, wie in Abbildung 1.2 dargestellt. Eine Kapillare, in der die Trennung stattfindet, eine Hochspannungsquelle, um die die Trennung antreibende Kraft zu erzeugen, ein Detektor sowie eine sichere Umhüllung, um den Benutzer vor der anliegenden Spannung zu schützen. Zusammen mit einem Autosampler, einem Datenaufzeichnungssystem und einer Auswertesoftware, wie in den meisten CE-Instrumenten realisiert, ist das ganze System einfach zu automatisieren.

Eine Temperiervorrichtung ist in den meisten Geräten vorhanden, jedoch für den Prozess nicht zwingend erforderlich. Durch die Kontrolle der Kapillartemperatur kann die Trenneffektivität nicht gesteigert werden, da diese von dem Temperaturgradienten innerhalb der Kapillare abhängt, welcher in erster Näherung von der Temperatur an der Außenseite unabhängig ist (Ivory 1990; Knox 1989). Für die Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten ist eine Kontrolle der Kapillartemperatur jedoch unerlässlich. Mit jedem Grad Temperaturerhöhung sinkt die Viskosität einer wässrigen Lösung um 2,5 % (Lux et al. 1990). Da die elektrophoretische Mobilität

umgekehrt proportional zu der Viskosität ist, würden Temperaturveränderungen, zum Beispiel im jahreszeitlichen Verlauf, unweigerlich zu Änderungen der Trennzeiten führen.

In den letzten zehn Jahren sind verschiedene Betriebsarten der CE entwickelt worden. Die wichtigsten sind Kapillaronenelektrophorese (CZE), Mizellare elektrokinetische Chromatographie (MEKC), Kapillargelelektrophorese (CGE), Kapillar-Isoelektrofokussierung (CIEF) und Kapillar-Isotachophorese (CITP). Gemessen an der Zahl der Veröffentlichungen ist die CZE nicht nur die älteste, sondern mit 60% die bei weitem bedeutendste Betriebsart (Camilleri 1998). MEKC, 1984 von Terabe (Terabe et al. 1984) eingeführt, erlaubt im Gegensatz zur CZE die Trennung von geladenen und ungeladenen Substanzen und kommt damit der klassischen HPLC am nächsten. Im Bereich der Proteinanalytik stellt jedoch die Kapillaronenelektrophorese die wichtigste Anwendung dar, da Proteine aufgrund ihrer Zwitterionenstruktur hervorragend als Ionen trennbar sind.

Elektrophorese beruht auf dem Prinzip der unterschiedlichen Beweglichkeit oder Wanderung von Ionen hervorgerufen durch Anziehung oder Abstoßung in einem elektrischen Feld. In der Praxis stehen verschiedenste Variationen dieser Grundüberlegung zur Verfügung, wie die Änderung des Ladungszustandes der Analyten (z. B. Isoelektrische Fokussierung, IEF) oder die Wechselwirkung mit einer stationären Phase (z. B. Polyacrylamidgelelektrophorese, PAGE), die dem Anwender eine große Anzahl an Möglichkeiten geben, eine Trennaufgabe zu lösen.

Der einfachste Ansatz der Elektrophorese, der in der Free-Flow-Elektrophorese, wie sie die Kapillaronenelektrophorese ist, verwendet wird, beinhaltet jedoch lediglich eine Pufferlösung, die an allen Punkten zwischen Anode und Kathode nahezu identisch ist. Die zu trennenden Analyten können sich hierin, angezogen oder abgestoßen von den Kräften des anliegenden elektrischen Feldes, frei bewegen.

Die wichtigste Kenngröße, die das Verhalten eines geladenen Teilchens, so auch eines Proteins oder Peptids, in der Elektrophorese beschreibt und damit auch die Trennmöglichkeiten zwischen verschiedenen Teilchen ausdrückt, ist die elektrophoretische Mobilität μ , definiert als die Geschwindigkeit eines Ions unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes. Die beiden wichtigsten Kräfte, die auf die Geschwindigkeit eines Teilchens in Flüssigkeit im elektrischen Feld wirken, sind die elektrische Kraft (\bar{F}_{EF}) sowie die Reibungskraft (\bar{F}_R). Die elektrische Kraft beruht auf der Ladung des Ions (q) und der angelegten elektrischen Feldstärke \bar{E} (in V/cm).

$$\bar{F}_{EF} = q \cdot \bar{E} \quad (1)$$

Unter Vernachlässigung des Einflusses anderer Ionen in der Lösung und unter der Annahme, dass die Moleküle durch das Stoke'sche Gesetz beschrieben werden können, kann die auf das Ion wirkende Reibungskraft auf die Viskosität der umgebenden Pufferlösung (η), die Geschwindigkeit des Moleküls (v , in cm/s) und seiner Größe (Radius, r) ausgedrückt werden.

$$\bar{F}_R = 6\pi \cdot \mu \cdot r \cdot v \quad (2)$$

Im Gleichgewichtszustand enthält die resultierende Formel (3) alle Parameter des Analyten und der Trennparameter, die für die Geschwindigkeit der Ionen verantwortlich sind:

$$\bar{v} = \frac{q \cdot \bar{E}}{6\pi\eta r} \quad (3)$$

Normalisiert auf die angelegte elektrische Feldstärke \bar{E} folgt für die elektrophoretische Mobilität:

$$\bar{\mu} = \frac{\bar{v}}{\bar{E}} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (4)$$

Daraus folgt für die Eigenschaft der elektrophoretischen Mobilität eines Ions im elektrischen Feld, dass diese direkt proportional zu seiner Ladung und umgekehrt proportional zu seiner Größe und der Viskosität des umgebenden Puffermediums ist.

Unter der effektiven Mobilität eines Ions (μ_i) versteht man schließlich die Summe der Mobilitäten aller dissoziierbarer Gruppen, die jeweils aus dem Grad der Dissoziation dieser Gruppe (α_i) und der absoluten Mobilität jedes Ions (μ_i^0) berechnet werden kann.

$$\bar{\mu}_i = \sum_i \alpha_i \times \bar{\mu}_i^0 \quad (5)$$

Da der Grad der Dissoziation von Proteinen nach der Henderson-Hasselbach-Gleichung (6) mit dem pH-Wert der umgebenden Lösung korreliert werden kann, folgt, dass der einfachste Weg, die Mobilität eines Proteins in der Elektrophorese zu modifizieren, darin besteht, den pH-Wert der verwendeten Pufferlösung zu variieren.

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log(1 / \alpha_i - 1) \quad (6)$$

Die Effizienz der elektrophoretischen Trennleistung kann in Form der theoretischen Böden (N) eines Systems ausgedrückt werden (Giddings 1989; Jorgenson et al. 1981). Im einfachsten Ansatz kann diese als eine Funktion der elektrophoretischen Mobilität ($\bar{\mu}_{\text{total}}$), der angelegten Spannung (V) und des Diffusionskoeffizienten des Analyten (D_0) verstanden werden:

$$N = \frac{\bar{\mu}_{\text{total}} \cdot V}{2D_0} \quad (7)$$

Eines der größten Probleme der Elektrophorese in engen Kapillaren resultiert aus dem Phänomen einer elektrisch induzierten Bewegung, dem elektroosmotischen Fluss (EOF). Dieser entsteht aufgrund von Wechselwirkungen zwischen der Silikatoberfläche der Kapillare und dem wässrigen Lösungsmittel und erzeugt einen positiven Ladungsüberschuss, der sich selbst und damit auch die umgebende Lösung in Richtung der Kathode bewegt. Da sich die Gesamtmobilität nun aus der effektiven Mobilität des Ions und der durch den elektroosmotischen Fluss induzierten Mobilität zusammensetzt (8), kann dieses Phänomen bei Wahl der richtigen Bedingungen dazu benutzt werden, sowohl die Geschwindigkeit der Trennung als auch die Zahl der theoretischen Böden zu erhöhen (9).

$$\bar{\mu}_{\text{total}} = \bar{\mu} + \bar{\mu}_{\text{EOF}} \quad (8)$$

$$N = \frac{(\bar{\mu} + \bar{\mu}_{\text{EOF}}) \cdot V}{2D_0} \quad (9)$$

Dieser elektroosmotische Fluss beruht auf der Ausbildung eines kleinen Zeta-Potentials (ζ) an der Silikat / Wasser Grenzfläche. Das Zeta-Potential ist aufgrund der Titration der dissoziierten Silikat-Gruppen an der Kapillaroberfläche

($-\text{SiOH} \Leftrightarrow -\text{SiO}^- + \text{H}^+$) von dem pH-Wert der Lösung abhängig und beeinflusst die Bewegung der Ionen in Abhängigkeit der elektrischen Feldstärke, der Viskosität des Mediums und der dielektrischen Konstante.

$$\bar{\mu}_{\text{EOF}} = \left(\frac{\varepsilon_0}{4\pi\eta} \right) E\zeta \quad (10)$$

Obwohl dieser Effekt zunächst einmal eine reizvolle Möglichkeit zur Verbesserung der Trennleistung darstellt, ist er doch in vielen Fällen schwer zu kontrollieren. Ein gegen die Trennrichtung gerichteter EOF verschlechtert die Performance sogar erheblich.

Zur Kontrolle des elektroosmotischen Flusses stehen eine Reihe von Maßnahmen zur Verfügung, welche die Puffer-Kapillar-Wechselwirkung beeinflussen. Am einfachsten kann durch eine Anpassung der Temperatur die Viskosität der Lösung verändert werden. Eine Änderung des pH-Wertes bei konstanter Ionenstärke führt in Abhängigkeit von dem verwendeten Kapillarmaterial zu der in Abbildung 1.3 (a) gezeigten erheblichen Veränderung des EOFs. Die Zugabe von organischen Lösungsmitteln (Methanol, Ethanol, 2-Propanol, Acetonitril) modifiziert ebenfalls die Viskosität und so den elektroosmotischen Fluss. Durch die Zugabe vieler Salze, insbesondere Ammoniumderivaten, wird die Wechselwirkung der wässrigen Pufferlösung mit der Silikatwand verändert (Watzig et al. 1998). Im Gegensatz zu diesem reversiblen, „dynamischen“ Coating wurden viele Versuche unternommen, den EOF mittels permanenter Belegung der Kapillarwand zu kontrollieren, beispielsweise durch Polyacrylamid (Cifuentes et al. 1999; Strege et al. 1993), Polyvinylalkohol (Belder et al. 2001), Oligourethan (Konig et al. 2000), cycloaliphatischem Epoxyd (Shah et al. 2002), Acryl-Oxirane (Chiari et al. 2000) oder quartärnären Amininen (Gelfi et al. 2001).

Die Trennleistung des Systems wird aber nicht zuletzt auch durch die Säulen-geometrie bestimmt. Wie schon 1983 von Lukacs und Jorgenson gezeigt (Jorgenson et al. 1983), ist die Zahl der theoretischen Böden auch von der Länge der Kapillare und ihrem Innendurchmesser abhängig (Abb. 1.3 (b) und (c)). Mit steigendem Kapillarinnendurchmesser steigt der durch Reibungsenergie verursachte radiale Temperaturgradient in der Kapillare, da die zugrunde liegende Querschnittsfläche (πr^2) schneller steigt, als der Radius der wärmeabführenden Umrandung ($2\pi r$). Derselbe Effekt tritt bei einer Verlängerung der Kapillare auf, da aufgrund des mit der

größeren Länge erhöhten Widerstandes nach dem Ohm'schen Gesetz mehr Strom durch die Kapillare geleitet werden muss, um die Spannung aufrecht erhalten zu können.

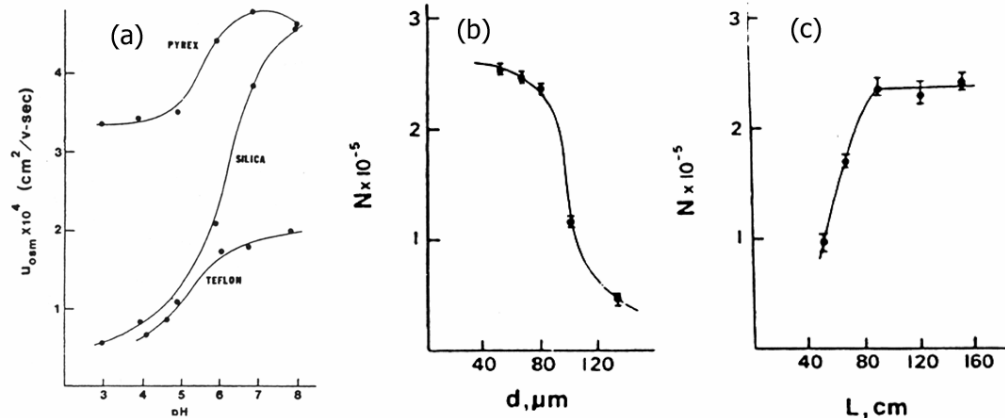


Abbildung 1.3: Einfluss verschiedener Parameter auf die CE-Trennung. (a) Einfluss des pH-Wertes des Puffers auf den EOF, (b) Einfluss des Kapillarinneendurchmessers und (c) der Kapillarlänge auf die Trenneffizienz. Jeweils bei konstanter Ionenstärke (Kühr 1998).

Einer der größten Vorteile der Kapillarelektrophorese stellt auch gleichzeitig ihren größten Nachteil dar. Kaum eine andere analytische Technik erfordert ein derart geringes Volumen an Probe. Für die meisten Anwendungen werden nur wenige Nanoliter benötigt. Doch sinkt damit auch die absolute Menge der zu analysierenden Teilchen, was die Anforderung an die eingesetzte Detektionstechnik deutlich erhöht. Dieses Problem kann prinzipiell auf zwei Wegen gelöst werden – durch Etablierung immer sensitiverer Nachweisverfahren oder durch Erhöhung der Konzentration der injizierten Probenmoleküle.

Aus diesem Grund sind eine Vielzahl von Verfahren entwickelt worden, um das Volumen der aufgetragenen Probe erhöhen zu können, ohne an Trennleistung und Auflösung zu verlieren. Den größten technischen Aufwand erfordern dabei Kopplungstechniken zu anderen chromatographischen Verfahren. So werden Festphasenextraktionsverfahren an unterschiedlichen Materialien, sowohl isoliert von der CE als auch online gekoppelt, verwendet (Figeys et al. 1996; Figeys et al. 1998; Guzman et al. 2001a; Guzman et al. 2001b).

Viel einfacher und ohne Einbindung weiterer Systeme können elektrische und chemische Grundsätze ausgenutzt werden, um die Analyten nach der Injektion eines großen Volumens in einer schmalen Bande zu fokussieren („Stacking“).

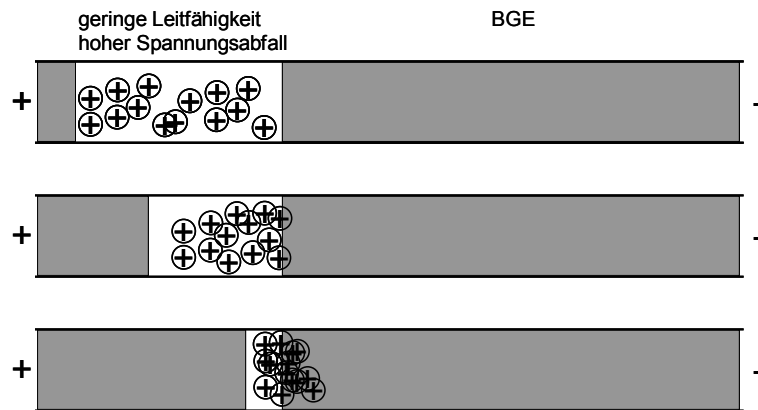


Abbildung 1.4 Stacking einer Probe basierend auf unterschiedlichen Leitfähigkeiten.

Wird die Probe in oder aus einem Puffer mit geringerer Leitfähigkeit als der des Laufmittels injiziert, so kann ein Stacking an der Phasengrenze erzielt werden (Abb. 1.4). Da der Strom über die gesamte Kapillare konstant ist, ist der Spannungsabfall nach dem Ohm'schen Gesetz in dem schlechter leitenden Medium größer, so dass die Analyten, deren Mobilität von dem angelegten elektrischen Feld abhängig sind, hier beschleunigt und beim Übergang in den Laufpuffer abgebremst werden (Beckers et al. 2000; Burgi et al. 1992).

Ein Ansatz, der sich die zwitterionischen Eigenschaften von Proteinen zunutze macht, ist das pH-unterstützte Stacking. Hierbei wird zunächst ein Pfropfen einer Base in die Kapillare und anschließend die im aciden Milieu vorliegende Probe injiziert. Als Abschluss wird noch einmal ein Pfropfen einer Säure oder der saure Puffer verwendet (Abb. 1.5). Die positiv geladenen Proteine wandern nun schnell in Richtung der Kathode, bis sie auf die Zone mit dem hohen pH-Wert stoßen, wo sie einen negativen Ladungsüberschuss aufnehmen und in die Gegenrichtung zurückwandern. Erreichen sie das saure Milieu, so werden sie wieder positiv geladen und ändern ihre Wanderungsrichtung erneut. Dieses setzt sich so lange fort, bis die Base durch die saure Pufferlösung neutralisiert worden ist und die normale elektrophoretische Trennung beginnt (Aebersold et al. 1990; Arnett et al. 2003; Schwer et al. 1992).

Ausgehend von der Kopplung einer Kapillar-Isotachophorese zur Fokussierung mit einer nachfolgenden Kapillaronenelektrophorese als Trennmethode (Kaniansky et al. 1999), wurde die transiente Isotachophorese als Präkonzentrierungsschritt entwickelt, die unter Einsatz von nur einer Säule durchzuführen ist. Durch geeignete Wahl der Pufferbedingungen geht dabei eine Isotachophorese in eine Kapillaronenelektrophorese über (Foret et al. 1993; Gebauer et al. 2000; Krivankova et al. 1997; Shihabi 2002).

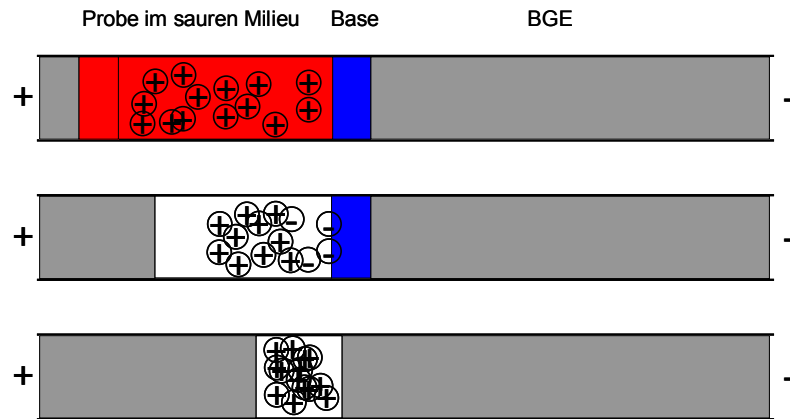


Abbildung 1.5 : pH-unterstütztes Stacking.

Die Wahl des Detektionssystems bietet ebenfalls einen Weg, die Nachweisgrenze zu verbessern. Die meisten der verwendeten Systeme beruhen auf spektroskopischen Methoden mit einem deutlichen Fokus auf der UV-Absorption. Die Nachweisgrenzen bewegen sich bei den wichtigsten Verfahren etwa im selben Bereich (Tabelle 1.6), lediglich die laserinduzierte Fluoreszenz erzielt einen deutlichen Zugewinn an Empfindlichkeit. Neben den aufgeführten online-Detektionssystemen ist unter Verwendung geeigneter Probensammler auch eine offline-Kopplung von CE und (MALDI) MS zu realisieren.

Obwohl die Kopplung von Kapillarelektrophorese und Massenspektrometrie keine Vorteile im Bezug auf die Nachweisgrenze bringt, ist doch der erzielbare Informationszuwachs bedeutend, da molekulare Masse, Struktur und Identität der Analyten aufgeklärt werden können (Aebersold et al. 2003; Figeys et al. 1996).

Tabelle 1.6: online-Detektionssysteme in der Kapillarelektrophorese

Methode	Nachweisgrenze absolut [mol]	Nachweisgrenze relativ [mol/l]	Vor- und Nachteile
UV-Absorption	$10^{-13} - 10^{-16}$	$10^{-5} - 10^{-8}$	- Universell - Einfach
Fluoreszenz	$10^{-15} - 10^{-17}$	$10^{-7} - 10^{-9}$	- Sensitiv - Probenderivatisierung notwendig
laserinduzierte Fluoreszenz	$10^{-18} - 10^{-20}$	$10^{-10} - 10^{-12}$	- Extrem Sensitiv - Probenderivatisierung notwendig
Amperometrie	$10^{-18} - 10^{-19}$	$10^{-10} - 10^{-11}$	- Sensitiv - nicht für alle Analyten geeignet - benötigt spezielle Instrumente und Kapillaren
Leitfähigkeit	$10^{-15} - 10^{-16}$	$10^{-7} - 10^{-8}$	- Universell - benötigt spezielle Instrumente und Kapillaren
Massenspektrometrie	$10^{-16} - 10^{-17}$	$10^{-8} - 10^{-9}$	- Sensitiv - Ermöglicht Strukturinformationen - Interface notwendig

Relative Nachweisgrenze bezogen auf ein Injektionsvolumen von 10 nl. Andere nicht aufgeführte Verfahren: Radioaktivität, Refraktrometrie, Raman-Spektroskopie, Chemielumineszenz, Kernresonanzspektroskopie, etc. (Heiger et al. 2000).

1.2.2 Massenspektrometrie

Die Messung der molekularen Masse durch ein Massenspektrometer setzt voraus, dass Ionen gebildet, in eine Gasphase transferiert und anschließend analysiert werden. Damit besteht ein Massenspektrometer aus zwei Hauptkomponenten, der Ionenquelle und dem Massenanalysator. Die Generierung von Ionen in der Gasphase stellt gerade für hoch molekulare Substanzen, wie Proteine und Peptide, eine Herausforderung dar. Einige ältere Ionisierungstechniken, wie fast-atom-bombardement oder ^{252}Cf -plasma-desorption, hatten gerade hier ihre Beschränkungen (Patterson et al. 1995).

Der Durchbruch der Massenspektrometrie für Proteine und Peptide begann 1988 mit der Einführung zweier neuer Methoden, um große, intakte Moleküle mit einem Ladungsüberschuss zu versehen und in die Gasphase zu überführen. In der electrospray-ionization (ESI-MS) werden die Ionen aus einer Flüssigkeit unter Atmosphärendruck erzeugt. ESI wird daher häufig in Kombination mit flüssigchromatographischen Trenntechniken, wie HPLC, LC oder CE, verwendet und stellt in diesem Fall eine online-Kopplung zwischen der Trenntechnik und dem Massenanalysator als Detektionssystem dar. Gänzlich anders sieht die Situation bei der Matrix-Assisted-Laser-Desorption Ionization Technik (MALDI-MS) aus. Hier wird die Probe auf einer festen Oberfläche zusammen mit einer Matrix kristallisiert und anschließend in eine Vakuum-Ionisierungskammer überführt. Diese Einbettung und Co-Kristallisation der Probe in einem Überschuss an Matrixmolekülen ermöglicht es, dass die Aufnahme der Laserenergie zu einer Ionisierung der Probenmoleküle führt, ohne dass die dabei auftretende hohe Energie eine Fragmentierung durch intermolekulare Wechselwirkungen mit sich bringt. Der Prozess beginnt dabei wahrscheinlich mit der Photo-Ionisierung von Matrixmolekülen, gefolgt von einer Reaktion mit anderen Matrixmolekülen und der Bildung von neutralen Radikalen. In weiterer Folge kommt es dann auch zu einer Ionisierung der Probenmoleküle durch Protonierung und Deprotonierung (James 2004).

Die Ionisierung erfolgt durch Beschuss der Matrix mit kurzen Laserpulsen (Abbildung 1.7). MALDI stellt damit immer ein ungekoppeltes offline-System dar, wenn es mit anderen Trenn- oder Vorbereitungsverfahren kombiniert werden soll.

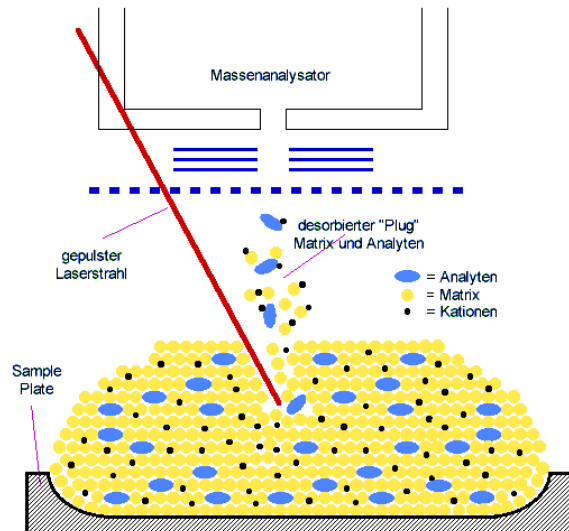


Abbildung 1.7 MALDI - Ionisierungstechnik

Bei der ESI-Technologie werden die Analyten in einer Flüssigphase durch eine feine Nadel geführt, welche auf einem hohen elektrischen Potential von typischerweise etwa +5.000 Volt liegt. Unter dem Einfluss dieses elektrischen Feldes wird unter Atmosphärendruck ein Spray erzeugt, das zunächst aus einer Mischung der Analyten mit der Flüssigphase besteht und in Richtung eines auf einem geringeren Potential liegenden Einlasses gerichtet ist. In der Zone zwischen dem Auslass der Spraynadel und dem Einlass des evakuierten Massenanalysators werden die Analyten in einem mehrstufigen Prozess vollständig desolvatisiert und schonend mit Ladung versehen.

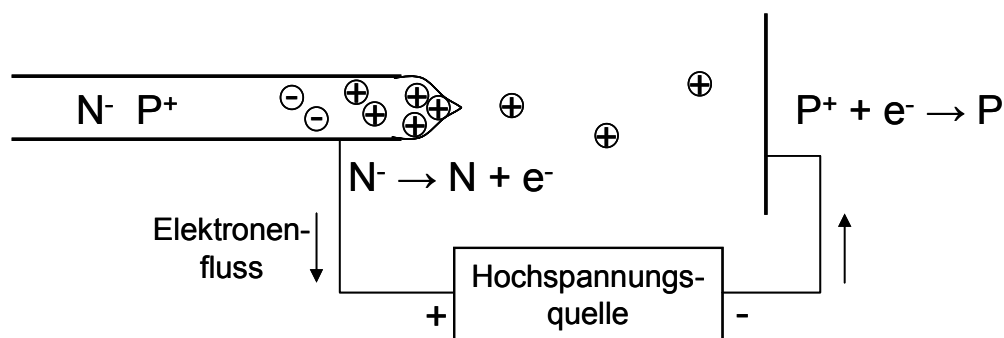


Abbildung 1.8 ESI als Sonderfall einer Elektrolysezelle (Bruins 1998).

Die Bildung des Sprays beginnt mit der Ladung der Flüssigphase durch die anliegende Stromquelle (Abb. 1.8). Aufgrund des Spannungsgradienten zwischen der Spraynadel und dem Einlass des Massenanalysators sammelt sich positive Ladung an der Front der Flüssigkeit an. Wird die elektrostatische Abstoßung größer als die

Oberflächenspannung, so löst sich ein kleiner elektrisch geladener Tropfen von der Spitze der Flüssigkeitsfront (Taylor cone) ab und wandert durch die umgebende Gasphase in Richtung des Gegenpols. Dieser Vorgang stellt kein Problem dar, solange das Volumen der austretenden Flüssigkeit gering ist (Bruins 1998). Der Prozess kann bei größeren Flüssigkeitsmengen durch Umspülung mit einem Inertgas (nebulizing gas) deutlich stabilisiert werden. Auch der Einsatz einer geeigneten umspülenden Flüssigkeit (sheath flow) kann deutliche Vorteile bringen, wenn z. B. eine verwendete wässrige Flüssigphase durch einen organischen sheath flow verdünnt wird, wodurch die Oberflächenspannung sinkt. Der Einsatz eines pneumatisch unterstützten Sprays (Nebulizer) erlaubt es, die Spraynadel in der Kammer frei zu positionieren, da die Ausbildung des Sprays nicht allein durch die Spannung, sondern im Wesentlichen durch den Gasstrom erfolgt. Eine Ausrichtung diagonal oder rechtwinklig zur Einlassöffnung stabilisiert das Spray nicht nur, sondern vermindert auch das Eindringen von Flüssigkeit und Kontaminationen in den Massenanalysator (Ingendo et al. 1999; Serwe et al. 1999).

Die austretenden Flüssigkeitstropfen, die unter Atmosphärendruck durch einen dichten Gasstrom in Richtung des elektrischen Gegenpols fliegen, schrumpfen aufgrund von verdampfendem Lösungsmittel in sich zusammen, so dass die Ladungsdichte an der Oberfläche weiter zunimmt. Dadurch, wie auch aufgrund auftretender Reibungskräfte, entstehen Deformationen in den Tropfen, die lokale, extrem starke elektrische Felder mit sich bringen. Sobald diese Deformationen und Ladungsdichten elektrostatische Abstoßungen erzeugen, die die Oberflächenspannung der Flüssigkeitstropfen übersteigt, werden die Tropfen instabil und zerfallen (Abb. 1.9).

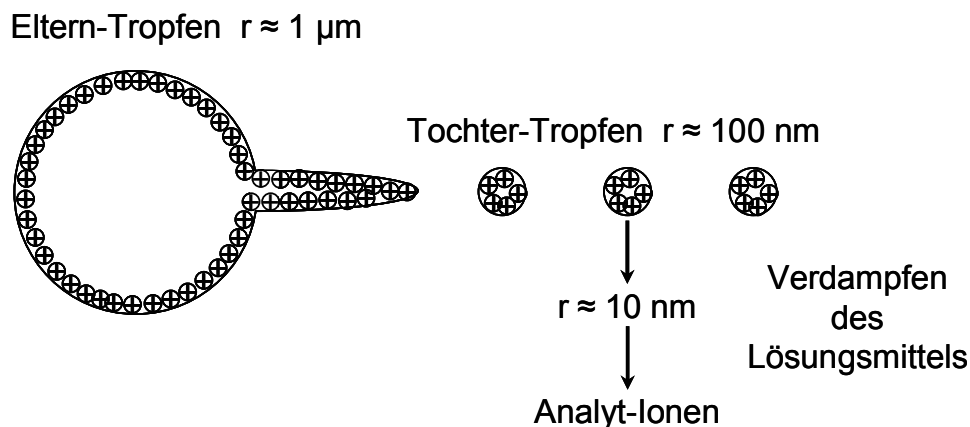


Abbildung 1.9: Tropfen Disintegration und Analyt-Ionenbildung durch das Austreten von Tochter-tropfen aufgrund hoher Ladungsdichten an der Oberfläche, gefolgt von weiteren Abspaltungen und Evaporation des Lösungsmittels (Bruins 1998).

Der Radius der ersten Aerosole in einem Elektrospray beträgt etwa 0,5 bis 1 μm . Diese benötigen zur vollständigen Verdampfung der Flüssigkeit nur wenige Millisekunden und die erste Generation an Tochtertropfen mit einem Radius von etwa 0,1 μm verdampft in einem Zeitraum von weniger als einer Millisekunde, so dass eine dritte Generation von Tropfen mit einem Durchmesser von etwa 10 nm entsteht (Bruins 1998). Diese kleinen Tropfen der dritten Generation schließlich schrumpfen durch Emission von Ionen weiter in sich zusammen. Erst diese nackten Analytationen sind es, die in den Massenanalysator eindringen sollen. In der Praxis werden verbliebene Flüssigkeitsreste durch eine Passage, ein Schutzgas oder einen temperierten Einlass verdampft und nur einzelne, geladene Ionen nach einer Passage durch verschiedene Filtersysteme (Skimmer, Quadrupol) zum Massenanalysator durchgelassen (Abb. 1.10).

Die beschriebene Elektrospray-Ionisierung bietet ein für Proteine und Peptide recht schonendes Verfahren an, dass eine online-Kopplung zu vielen gut etablierten Trennsystemen ermöglicht. Die Stabilität der Methode ist allerdings wesentlich weniger tolerant gegenüber Lösungsmitelegenschaften als MALDI. Hohe Salzkonzentrationen führen zu einer Signalunterdrückung und schon kleine Konzentrationen vieler bei der Aufreinigung und Trennung von Proteinen verwendeter Substanzen können aufgrund ihrer polymerischen Natur uninterpretierbare Ergebnisse bewirken. Auf der anderen Seite kann bei geeigneter Wahl des Interfaces und der Ionisierungsbedingungen (hohe oder niedrige Flussrate, miniaturisierte Interfaces) eine Steigung der Sensitivität bis in den unteren Femtomolbereich erreicht werden (Li et al. 2000; Waterval et al. 2001; Zhang et al. 1999).

Während handelsübliche MALDI-Geräte schon seit langem mit Flugzeit-Analysatoren (Time-Of-Flight) arbeiten, da der auslösende, gepulste Laserstoß hervorragend als Startsignal für die ebenfalls gepulste Flugzeitmessung verwendet werden kann, werden ESI-Systeme meist mit Quadrupol Messeinheiten ausgestattet, die den kontinuierlich eintretenden Ionenstrom in Schritten von circa einem Dalton scannen (Spengler 2000). Da eine Erhöhung der Auflösung im Quadrupol-Analysator zwar prinzipiell möglich ist, jedoch immer auf Kosten der Sensitivität geht (Thomas 2001), werden seit einiger Zeit auch andere Systeme als finale Massenanalysatoren eingesetzt, wie doppelt fokussierende Magnetsektor-Massenspektrometer, Ionenfallen, Fourier-Transform-Cyclotron-Resonance-Massenspektrometer (FT-ICR) und eben Flugzeitanalysatoren (TOF). Magnetsektorsysteme ermöglichen zwar eine äußerst hohe Auflösung, scannen aber sehr langsam, so dass sie für Proteomstudien uninteressant sind. Ionenfallen bieten eine geringe Auflösung, haben aber den Vorteil,

diskrete Ionen gleichzeitig sowohl zu akkumulieren als auch zu detektieren, was die Erfassung vieler transients Signale möglich macht. FT-ICR bietet zwar ebenfalls eine ausgezeichnete Auflösung, die Systeme haben aber aufgrund ihres Preises noch keine weite Verbreitung gefunden. TOF-Analysatoren, in ESI-Systemen als orthogonale Massenspektrometer ausgeführt, bieten schließlich hervorragende Sensitivität und Auflösung zu erschwinglichen Preisen.

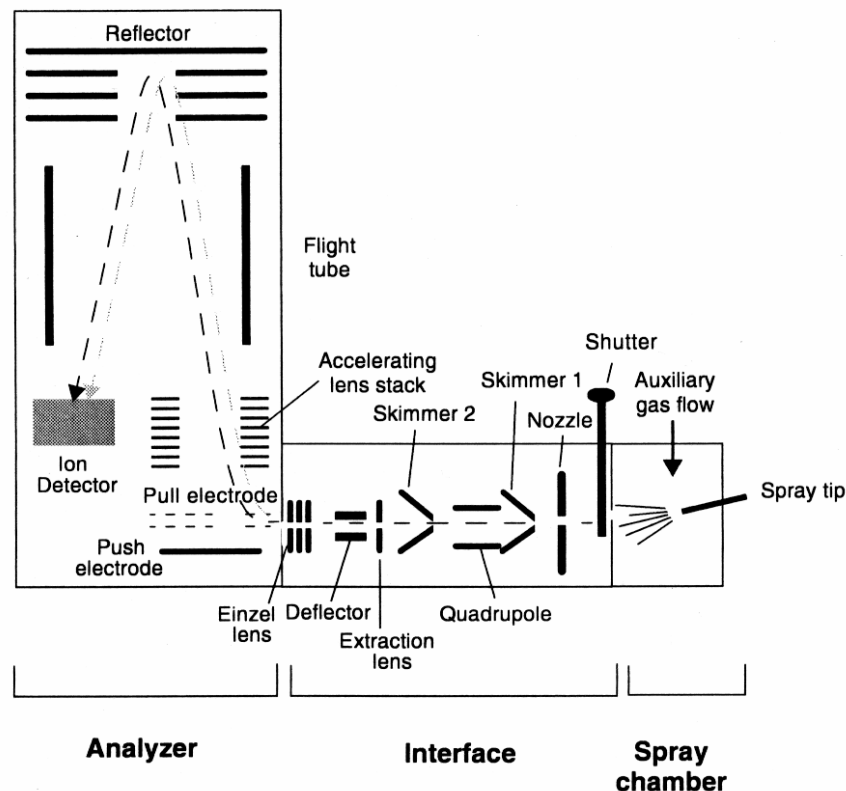


Abbildung 1.10: Aufbau eines Elektrospray-Time-Of-Flight-Massenspektrometers.

Dargestellt am Beispiel eines Mariner (ABI). Die Ionenerzeugung beginnt in der unter Atmosphärendruck arbeitenden Spray-Kammer (rechts). Im Interface findet sowohl eine Selektionierung der Ionen als auch der Übergang in das Hochvakuum des Analysators statt (Applied Biosystems 1998).

Ein Time-Of-Flight-Massenspektrometer beruht auf dem Prinzip, dass alle Ionen dieselbe kinetische Energie aufweisen und daher die Zeit (t), welche sie für ihren Weg zum Detektor benötigen, nach Formel (11) proportional zu ihrer Masse (m) und umgekehrt proportional zu ihrer Ladung (n) ist.

$$t = s \cdot \left(\frac{m}{(2KE) \cdot n} \right)^{1/2} \quad (11)$$

(mit t =Flugzeit, s =Flugstrecke, KE =kinetische Energie, m =Masse, n =Ladung)

Anders als in einem Quadrupol-MS ist die Auflösung eines TOF damit von der Beschleunigungsspannung und der Länge der Flugröhre abhängig. Damit können in der Praxis Auflösungen von 0,01 bis 0,1 Masseneinheiten erreicht werden, was etwa eine Zehnerpotenz über der eines Quadrupol liegt (Thomas 2001). Dabei ermöglicht ein o-TOF gleichzeitig eine um das 20- bis 100fach höhere Sensitivität als ein Tripel-Quadrupol (Niessen 1999).

Diese Eigenschaften schließlich machen einen TOF-Analysator zu dem idealen Hilfsmittel, um generierte Fragment-Ionen zu detektieren, ohne den damit einhergehenden Verlust an Sensitivität in Kauf nehmen zu müssen. Die Schaffung von Quadrupol – Time-Of-Flight Hybriden (Q-TOF) stellt Proteomstudien daher ein außergewöhnlich starkes Hilfsmittel zur Verfügung, da diese in zwei verschiedenen Modi, als MS oder MS/MS betrieben werden können (Abb. 1.11). Im ersten Fall, wird der erste Quadrupol, genau wie der evakuierte mittlere rf-only Quadrupol (oder Hexapol) nur als Breitbandfilter für Ionen betrieben, welche mit Hilfe des TOF detektiert werden können. Im MS/MS-Mode hingegen dient der erste Quadrupol als Massenfilter, bevor die durchgelassenen Ionen im rf-only-Quadrupol durch eingelassenes Kollisionsgas fragmentiert werden. Die entstehenden Tochterionen können nun mit Hilfe des TOF detektiert werden, wodurch in vielen Fällen eine Identifizierung und Sequenzierung der vorher selektierten Polypeptide möglich wird.

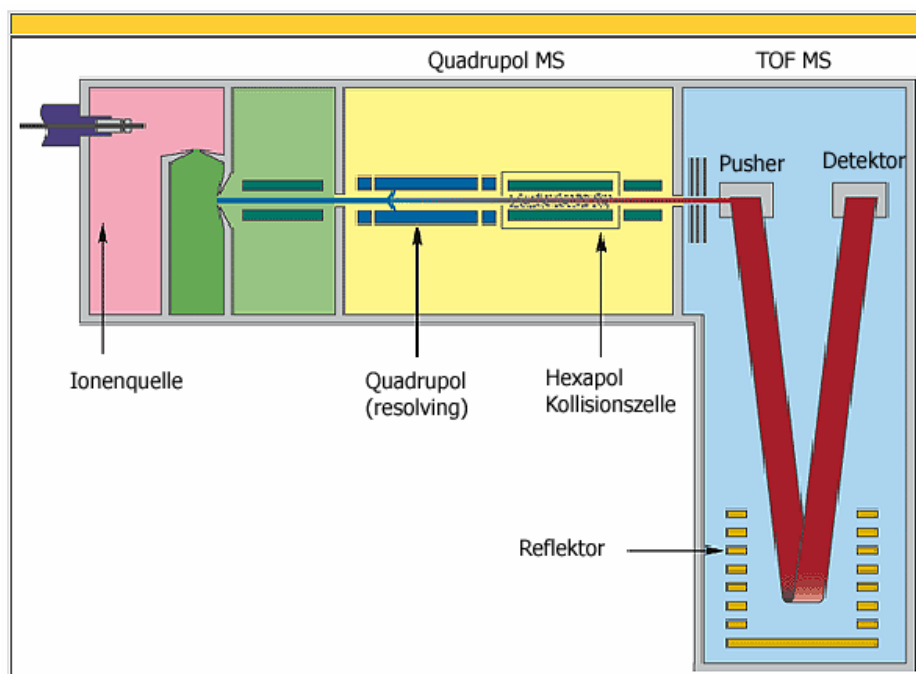


Abbildung 1.11: Q-TOF Quadrupol / Time-Of-Flight-Hybrid (Micromass).

Das erste MS (Quadrupol) kann entweder als reiner Durchlassfilter betrieben werden, oder dazu dienen, spezifische Massen in der Kollisionszelle zu fragmentieren (Thomas 2001).

1.2.3 CE – (ESI) – MS – Kopplungstechniken

Wie in Abbildung 1.2 gezeigt, funktioniert die Kapillarelektrophorese als geschlossener Stromkreis, in dem die ionischen Lösungsmittelbestandteile in Richtung ihrer Gegenelektrode wandern, dort durch Redoxreaktionen mit Wasser reagieren und in Form von Elektronen den Stromkreis über die Spannungsquelle schließen. Wird eines der Kapillarenden als Auslass in ein getrenntes Detektionssystem verwendet, so wird eine Öffnung des Stromkreises notwendig, der durch geeignete Maßnahmen überbrückt werden muss. Bei Verwendung der ESI-Ionisierungstechnik dient dieser interfaceseitige Stromanschlusspunkt gleichzeitig auch der Schließung des ESI-Stromkreises (Abb. 1.12).

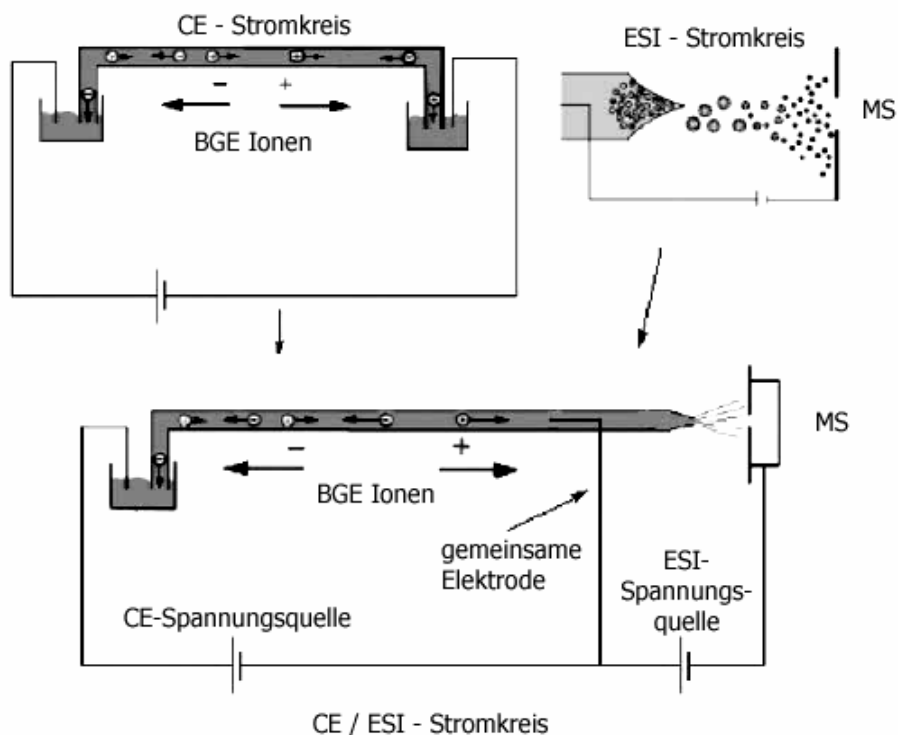


Abbildung 1.12: Schematische Darstellung eines (sheathless) CE/ESI-MS, in welcher zwei einzeln kontrollierte Spannungstechniken, CE und ESI, mittels einer gemeinsamen Elektrode verbunden sind (Moini 2002).

Aus Sicht der Kapillarelektrophorese muss dieses Interface, unabhängig von der nachgeschalteten Ionisierungs- und Detektionstechnik, einige wichtige Punkte gewährleisten, zu welchen zählen:

- Das Interface sollte die Auflösung der CE aufrechterhalten. Da die Peakbreiten nach einer CE-Trennung in der Regel nur einige Sekunden betragen und der Pufferfluss im Bereich weniger Nanoliter pro Minute liegt, würde jeder Totraum im Interface zu einer Peakverbreiterung und damit zu Auflösungs- und Sensitivitätsverlust führen.
- Das Interface sollte im Hinblick auf hohe Sensitivität strukturiert sein. Die geringen CE-Flussraten würden durch eine hohe sheath-flow-Flussrate zu einer starken Verdünnung und damit zu einer Verringerung der Sensitivität führen.
- Das Interface für die ESI-Ionisierung sollte einen möglichst dünnen Auslass aufweisen, da kleine Innendurchmesser auch kleinere Spray-Tropfen ermöglichen und damit die Sensitivität erhöhen.

In den letzten 15 Jahren wurden eine Reihe CE-ESI-Interfaces entwickelt, die sich im Prinzip in zwei Gruppen gliedern, sheath-flow- und sheath-less-Interfaces.

Sheath-flow-Verbindungen stellen den elektrischen Kontakt über eine Flüssigkeit her, die am MS-seitigen Kapillarendende mit dem Trennpuffer vermischt wird, entweder über eine koaxiale Umspülung oder über ein T-Stück (Liquid Junction). Die koaxiale Vermischung mit einem sheath-flow innerhalb eines Edelstahl-ESI-Emitters stellt das einfachste und günstigste Verfahren dar (Abb. 1.13 A), ist leicht zu fabrizieren, problemlos zu installieren und ausgezeichnet zu reproduzieren (Moini 2002). Nachteilig ist bei allen sheath-flow-Techniken jedoch die Verdünnung des Analyten durch die zusätzliche Flüssigkeit.

Sheath-less-Interfaces, erstmals 1987 durch Smith et al. eingeführt (Olivares et al. 1987; Smith et al. 1988a; Smith et al. 1988b), werden unter Benutzung eines metallisch gecoateten Kapillarendstückes (Silber, Gold, Platin, etc.), eines dünnen Drahtes, der in die Kapillarspitze hineingelegt wird, oder eines metallischen Zwischenstückes konstruiert (Abb. 2.13 B und C). Die in Bild D dargestellte einfache Liquid-Junction-Verbindung kann dahingehend erweitert werden, dass die Kapillare mit reduziertem Innendurchmesser weitergeführt wird, so dass eine beliebige CE-Trennkapillare in einen mikro- oder nano-Emitter übergeht. Abian et al. haben diese Verbindung mittels einer stahlummantelten Fritte hergestellt, so dass ein micro-sheathless-Emitter entsteht (Abian et al. 1999).

In einem neueren Ansatz zur Kopplung von CE-ESI-MS verwendeten Petersson et al. eine einfache enge Stahlkapillare, durch welche die CE Kapillare gelegt wurde. Der notwendige Stromfluss wurde durch einen dünnen Flüssigkeitsfilm aufrecht erhalten, der sich zwischen den beiden Kapillaren ausbildete (Petersson et al. 1999).

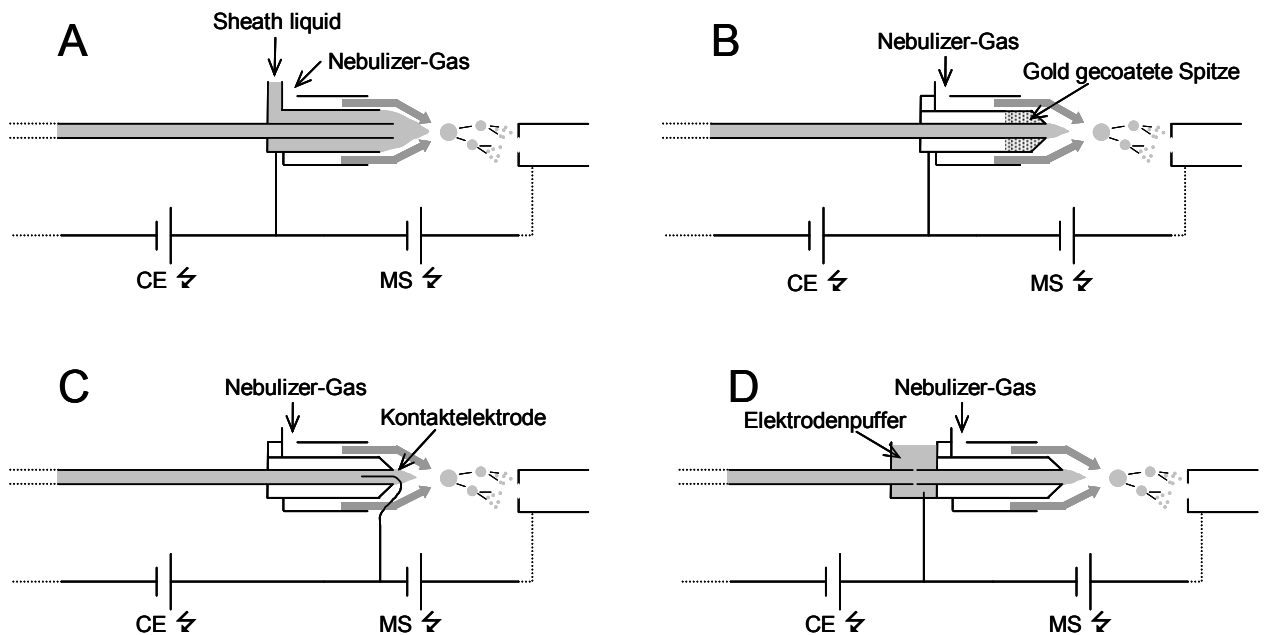


Abbildung 1.13: Konstruktion verschiedener CE-ESI-Interfaces.

Bild A zeigt ein sheath-flow Interface mit koaxialer Umströmung. Bild B und C zeigen sheath-less-Interfaces, bei denen der elektrische Kontakt über die gecoatete Kapillarspitze (B) oder eine Elektrode (C) hergestellt wird. Bild D zeigt ein Beispiel einer „Liquid Junction“ (Gelpi 2002; von Brocke et al. 2001).

Während die Signalintensität bei sheath-less-Methoden im Vergleich zum sheath-flow aufgrund der nicht auftretenden Verdünnung deutlich besser ist, zeigen sheath-less-Systeme eine größere Instabilität und eine geringe Haltbarkeit, nicht zuletzt aufgrund von elektrochemischen Reaktionen an den Edelmetallen (Gelpi 2002; Moini 2002). Welches System verwendet wird, hängt damit in der Regel von dem Einsatzziel und den gewählten Prioritäten – Sensitivität oder Stabilität – ab.

Prinzipiell kann auch die MALDI-Technik mit einer Kapillarelektrophorese gekoppelt werden. Im einfachsten Fall werden die Analyten in Gegenwart eines sheath-flow auf ein MALDI-Target abgespottet und dabei oder nachträglich mit der Matrix versehen (Johnson et al. 2001). Während in diesem Fall der offline-Charakter bestehen bleibt, erlauben andere Verfahren eine direkte Verbindung mit sofortiger Messung. Hierzu zählen continuous-flow- (cf-) MALDI, pulsed sample introduction (PSI) oder continuous vacuum deposition interface (CVDI) (Gelpi 2002). Doch diese Verfahren sind kompliziert und wenig zuverlässig. Für den Einsatz in einem robusten System ist daher der Einsatz eines ESI-Interfaces vorzuziehen. In der hier dargestellten Arbeit ist dieses unter Verwendung von sheath-flow realisiert worden. Der dadurch in Kauf genommenen Verlust an Sensitivität wird durch den Zugewinn an Stabilität ausgeglichen.

1.3 Urin – Proteomics

Der menschlich Harn (oder Urin, von lat. *urina*) ist die von den Nieren durch die Harnwege abgesonderte Flüssigkeit, mit der harnpflichtige Substanzen ausgeschieden werden. Als ein komplexes Gemisch von Proteinen und Salzen, welches durch die sekretorischen und reabsorbierenden Funktionen der Nieren zusammengestellt wird, kann der Urin als ein Filtrat des Blutes verstanden werden, dessen Zusammensetzung qualitativ, wenn auch nicht quantitativ, der des Blutes entspricht.

Als eine der am einfachsten zu gewinnenden menschlichen Körperflüssigkeiten ist Urin mit einer Vielzahl von Technologien unter unterschiedlichsten physiologischen Fragestellungen, einschließlich Metabolismus, Toxikologie und den Prozessen vieler Krankheiten, untersucht worden. Einzelne Proteinmarker im Urin konnten schon früh identifiziert werden, wie das menschliche Choriongonadotropin (HCG), das bis heute mit hoher Zuverlässigkeit zur Erkennung einer Schwangerschaft verwendet wird (Ascheim et al. 1927). Doch in den meisten Fällen verliefen diese Identifizierungen in Bezug auf ihr Vorhersagepotential enttäuschend (Barrett et al. 1994; Westhuyzen et al. 1996). Erst mit dem Aufkommen der Proteomforschung, der Möglichkeit zur Sequenzierung mittels Massenspektrometrie und dem durch das Humangenomprojekt zur Verfügung gestellten Wissen über mögliche Proteine und Funktionen (expressed sequence tags, EST), wurde die Reichhaltigkeit der Information, die im menschlichen Harn zu finden ist, deutlich. Allerdings fehlen bis heute zuverlässige Hochdurchsatzmethoden, die den Einzug in die klinische Diagnostik gefunden haben.

Als Probenquelle für eine klinische Proteomdiagnostik wäre der Urin ideal geeignet, wenn davon ausgegangen werden kann, dass das Ergebnis der Untersuchung nicht durch die native Nierenfunktion beeinträchtigt wird. Primär wird sich daher jede Analyse von Urin mit der Diagnose des renalen Status beschäftigen müssen, bevor andere Beurteilungen zulässig sind. Als Beispiel einer Nierenschädigung wird in dieser Arbeit hauptsächlich die diabetische Nephropathie behandelt, welche die epidemiologisch wichtigste Nephropathie darstellt. Doch daneben wird auch die differenzialdiagnostische Abgrenzung zu weiteren Nephropathien untersucht.

1.3.1 Zusammensetzung und Eigenschaften von humanem Urin

Der durch die Nieren ausgeschiedene Harn spielt bei der Regulation des Flüssigkeits- und Elektrolythaushaltes sowie der Säure-Base-Regulation eine wichtige Rolle. Beim gesunden Menschen zunächst klar, bernsteingelb und mit einem pH-Wert von 5 bis 7 wird der Urin durch bakterielle Gärung mit Umwandlung des Harnstoffs zu Ammoniak stechend riechend und alkalisch.

Neben ihren inkretorischen Funktionen, der Produktion renaler (von lat. ren, Niere) Hormone (Erythropoetin, Prostaglandine, Cholecalciferol, Kimine), verrichtet die Niere ihre Hauptfunktion in zwei Schritten: Der relativ unspezifischen Exkretion harnpflichtiger Substanzen vom Blut in den Harn und einer anschließenden Aufkonzentrierung des Harns mit Rückgewinnung einzelner Substanzen und die Regulation der osmotischen Eigenschaften des Blutes. Die funktionelle Einheit der Niere ist das Nephron, ein kompliziert gebauter Tubulusapparat (Röhrensystem), der an einem Ende verschlossen ist und sich mit dem anderen Ende in das Nierenbecken öffnet. Es lässt sich morphologisch und funktionell in drei Abschnitte gliedern: das proximale Nephron, die Henle-Schleife und das distale Nephron.

Das proximale Nephron ist die verschlossene Seite und liegt in der Nierenrinde. Es enthält ein Kapillarnetz (Glomerulum) und wird von der Bowman-Kapsel umschlossen. Hier erfolgt der erste Schritt der Harnbildung, die glomeruläre Filtration. Der Primärharn (Filtrat, Vorharn) wird aus dem Blut der Kapillaren in das Lumen der Bowman-Kapsel gepresst und im Weiteren durch den Nierentubulus und das Sammelrohr in das Nierenbecken geleitet (Abbildung 1.14).

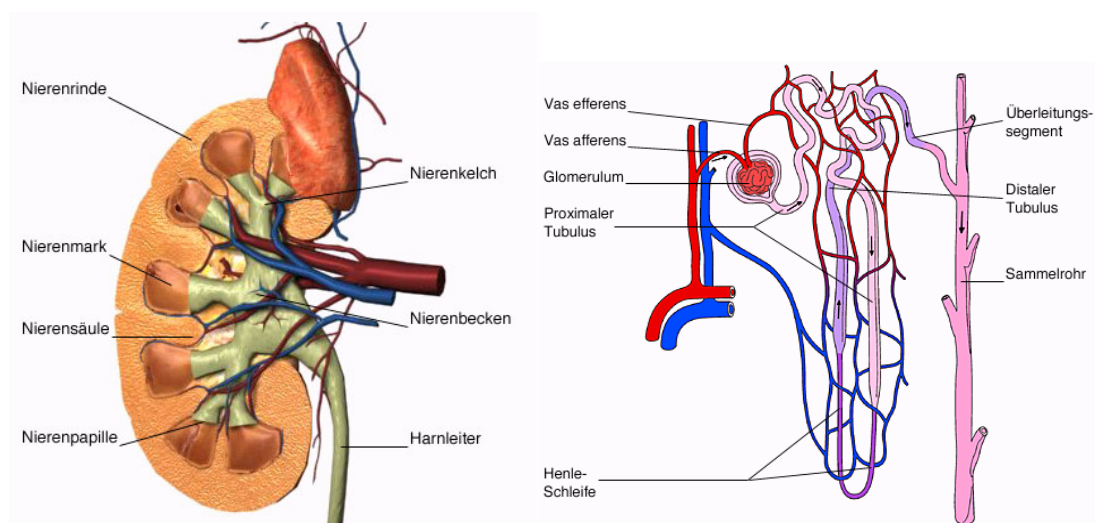


Abbildung 1.14: Schematischer (links) und Funktioneller (rechts) Aufbau der humanen Niere.

Der Primärharn enthält 20-25 % des Wassers sowie praktisch alle Bestandteile des Blutes außer den Blutzellen und größeren Proteinen. Die glomeruläre Filtration ist unselektiv und hängt nur von der Molekülgröße der filtrierte Stoffe ab. Die molekulare Ausschlussgröße der gesunden Niere liegt bei etwa 15-20 kDa.

Rund 99 % des Wassers des Primärharns und fast alle Ionen werden in den Nierentubuli wieder in den interstitiellen Raum abgegeben (zweite tubuläre Reabsorption). Die Wand des Nierentubulus besteht aus einer einzigen Epithelzellschicht, deren Zellen nur punktuell miteinander verbunden sind, so dass eine interzelluläre Diffusion möglich ist. Die tubuläre Reabsorption ist bis zu einem gewissen Grad selektiv und führt zu einer Konzentrierung der Abfallstoffe. Die meisten Ionen werden aktiv aus dem Glomerulusfiltrat reabsorbiert, während andere Substanzen (z.B. Wasser) passiv entlang dem osmotischen Gradienten reabsorbiert werden. Der osmotische Gradient wird mit Hilfe der Henle-Schleife aufgebaut, die nach dem Gegenstromprinzip arbeitet. Gleichzeitig findet ein entgegengerichteter, aktiver, selektiver Transport von bestimmten Substanzen in den Nierentubulus statt (dritte tubuläre Sekretion). Er sorgt für die Regulierung der K^+ - und H^+ -Ionenkonzentrationen und des Hydrogencarbonates im Blut, sowie für die Beseitigung von Fremdstoffen.

Die menschlichen Nieren verfügen über rund 2 Millionen Nephrone, die von täglich etwa 1500 Litern Blut passiert werden. Die etwa 150 – 170 Liter Primärharn werden schließlich zu 1 – 2 Liter Endharn aufkonzentriert.

Tabelle 1.15 Wichtige Bestandteile des 24-Std. Urins gesunder Erwachsener

Harnstoff	20	g
Kreatinin	1,2 – 1,8	g
Gesamtprotein	< 150	mg
Albumin	< 30	mg
Aminosäuren	800	mg
Harnsäure	500	mg
D-Glukose	70	mg
Ionen		
Natrium	60 – 200	mmol
Kalium	20 – 100	mmol
Calcium	2,5 – 6	mol
Magnesium	1 – 10	mmol
Ammonium	30 – 40	mmol
Chlorid	120 – 240	mmol
Phosphat	15 – 30	mmol
Sulfat	18 – 22	mmol

Quelle: (Hildebrandt 1998)

Die Zusammensetzung des menschlichen Harns ist in Tabelle 1.15 dargestellt. Da die Zusammensetzung in erheblichem Maße von der körperlichen Konstitution und der Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme abhängig ist, werden in der Regel bei allen Untersuchungen Urinproben verwendet, die über einen längeren Zeitraum von beispielsweise 24 Stunden gesammelt wurden.

Mit Hilfe der mikroskopischen Untersuchung des Harnsedimentes, sowie der qualitativen oder semi-quantitativen Messung einiger Komponenten durch Schnelltestverfahren, können pathologische Fehlfunktionen, insbesondere der Nieren, erkannt werden. Da aber das Harnvolumen, sowie die Konzentration der meisten seiner Bestandteile von der akuten körperlichen Verfassung, der Nahrungsaufnahme, dem Alter sowie anderer Flüssigkeitsverluste (Schweißsekretion, Erbrechen) abhängig sind, besteht die klinische Nierendiagnostik aus einer Reihe teilweise erheblich invasiver Verfahren bis hin zur Nierenbiopsie (Tab 1.16).

Tabelle 1.16 Klinische Nierendiagnostik

1. qualitative Funktionsprüfungen:
Messung der Serumkonzentration von Kreatinin (abhängig von der Muskelmasse und bestimmten Erkrankungen), Harnstoff (beeinflusst von Proteinstoffwechsel und tubulärer Rückdiffusion), den Elektrolyten (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , PO_4^{3-}) und dem Säure-Basen-Status
2. quantitative Funktionsprüfungen:
Bestimmung des renalen Plasmaflusses durch $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Mercaptoacetyltryglycin-Clearance und der glomerulären Filtrationsrate durch Kreatinin-, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA oder ^{51}Cr -EDTA-Clearance; Messung der Ausscheidung von Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , PO_4^{3-} , Oxalsäure, Harnsäure, Aminosäuren und Glukose im 24h-Urin
3. Bestimmung der Proteinurie:
Gesamtprotein, Albumin, IgG, Alpha-1- und Beta-2-Globulin und zytologische Untersuchung des Harnsediments zur Abschätzung der Aktivität eines pathologischen Prozesses
4. Morphologische Beurteilung der Nieren und ableitenden Harnwege:
Makroskopisch mittels Ultraschalldiagnostik, Computertomographie, Kernspintomographie und statischer Szintigraphie;
Mikroskopisch mittels Nierenbiopsie

Quelle: (Hildebrandt 1998)

1.3.2 Das Proteom des humanen Urins

Bereits mit Hilfe einfacher elektrophoretischer Methoden kann eine Proteomanalyse im Urin zur differentialdiagnostischen Untersuchung von Nierenschädigungen herangezogen werden (Abb. 1.17 A und B) (Kolios et al. 2001; Marshall et al. 1998). Zur detaillierteren Darstellung sind jedoch hochauflösende Proteomtechniken wie 2DE notwendig. So sind auf der Website des Danish Centre for Human Genome Research (Biobase, URL: <http://proteomics.cancer.dk>) auf 2DE Gelen von Urinen gesunder Probanden und Patienten mit Blasenkarzinom 459 Proteinspots gezeigt (Abb. 1.17 C). 197 dieser Spots konnten identifiziert werden. Allerdings entstammen diese 197 identifizierten Spots von nur 38 verschiedenen Proteinen. Allein 45 Spots konnten dem humanen Serumalbumin (HSA) zugeordnet werden.

Thongboonkerd et al. haben die Proteine aus Urinproben von gesunden Probanden einerseits mittels Acetonpräzipitation und andererseits durch Ultrafiltration isoliert und auf 2-D Gelen aufgetrennt (Thongboonkerd et al. 2002). Sie konnten insgesamt 47 unterschiedliche Proteine identifizieren. Ein Ansatz von Spahr et al. bestand hingegen in dem Versuch, Urin ohne vorherige Fraktionierung einem tryptischen Verdau zu unterziehen und anschließend mittels C18-RP-MS/MS zu identifizieren (Davis et al. 2001; Spahr et al. 2001). Sie konnten so 115 Proteine aus insgesamt 1451 Spektren identifizieren. 63% der aufgezeichneten Spektren wurden dabei von nur 9 Proteinen erzeugt (Serumalbumin, Serotransferrin, Ig kappa light chain c, Ig gamma heavy chain c, Uromodulin, Apolipoprotein a-i, Alpha-1-Mikroglobulin, Zinc-Alpha-2-Glycoprotein, Alpha-1-Antitrypsin). Allein 508 Spektren konnten auf Serumalbumin zurückgeführt werden. Mittels 2DE, Immunoaffinitätssubtraktion und LC-MS/MS haben Pieper et al. eine Charakterisierung des menschlichen Urinproteoms gezeigt. Von 1400 einzelnen Spots konnten 420 identifiziert werden, die auf 150 unterschiedliche Genprodukte zurückgeführt werden konnten (Pieper et al. 2004).

Neben diesen hochauflösenden Verfahren, deren Ansatz darin besteht, das Proteom des Urins als Ganzes darzustellen, werden auch immer häufiger weniger gut auflösende MS gestützte Methoden, wie die SELDI-Technologie (surface enhanced laser desorption/ionization) eingesetzt, deren Stärke in dem komparativen Vergleich verschiedener Proben liegen, da die gefundenen Informationen per se reduziert sind und in einfacher Weise grafisch dargestellt werden können (Abb. 1.18) (Dare et al. 2002; Hampel et al. 2001; Neuhoff et al. 2004).

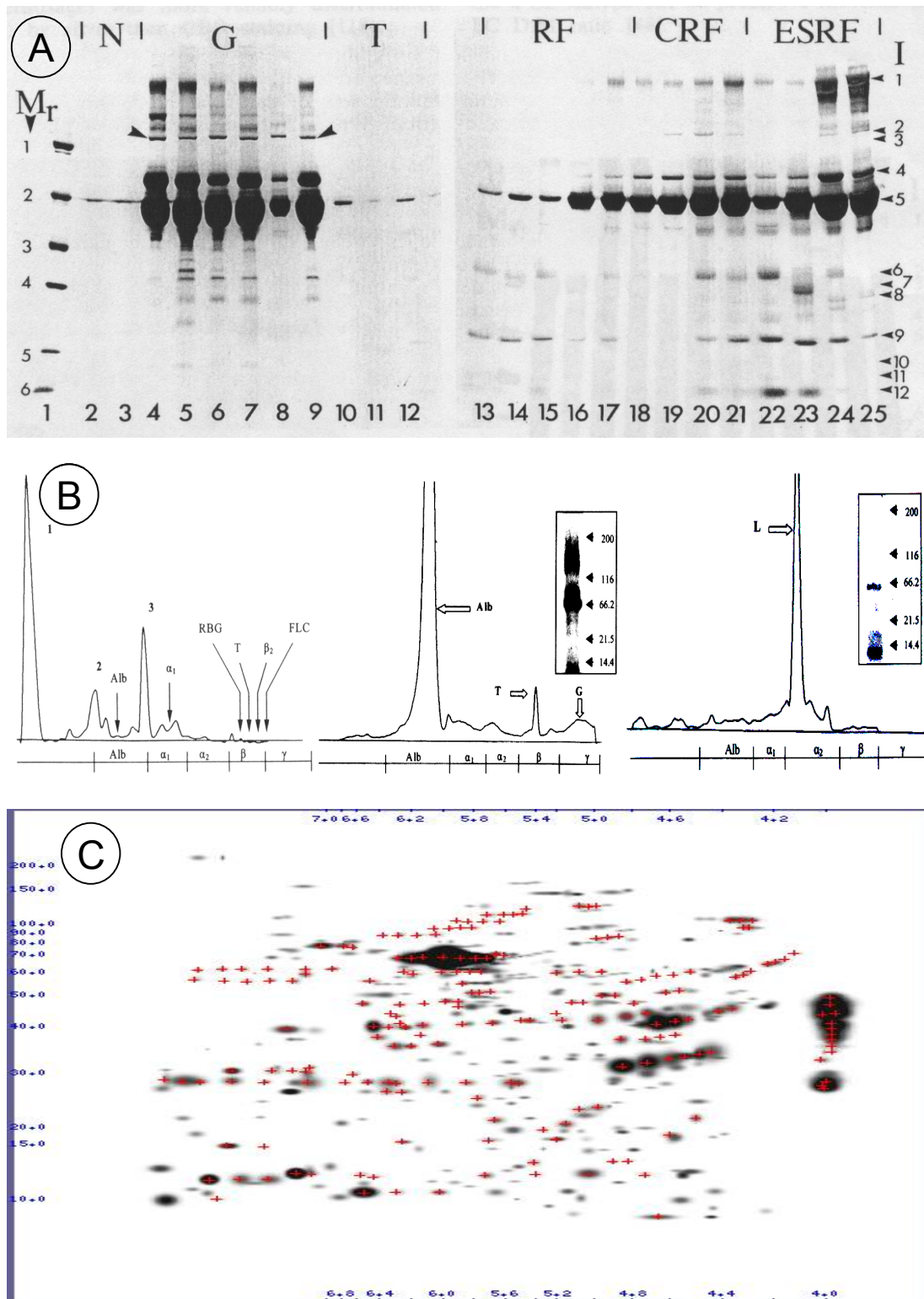


Abbildung 1.17: Elektrophoretische Trennungen von humanem Urin. Bild A: SDS-PAGE von normalem Urin (N), Glomerulonephritis (G), Renaler Transplantation (T), akutem Nierenversagen (RF), chronischen Nierenversagen (CRF) und terminaler Niereninsuffizienz (ESRF) nach Coomassie-Blau-Färbung. Identifizierung mittels Immunoblotting (I): 1 IgG, 5 Albumin, 12 β-2-Mikroglobulin. Bild B: Kapillarelektrophorese von normalem Urin (links), glomerulärer (mitte) und tubulärer (rechts) Dysfunktion. Alb: Albumin, T: Transferrin, β2: β-2-Mikroglobulin, L: low-molecular-weight proteins (20000-30000 Da). Bild C: Zweidimensionale Gelelektrophorese von humanem Urin (Danish Centre for Human Genome Research 2004; Kolios et al. 2001; Marshall et al. 1998).

Insgesamt zeigt sich, dass der mit den heutigen Methoden erzielbare Informationsgehalt bezüglich des Urinproteoms zwar begrenzt ist, jedoch noch deutlich über dem liegt, was klinisch diagnostisch verwendet wird (Albumin, Gesamtprotein, Immunglobuline). Die bislang mit hochauflösenden Techniken identifizierten Proteine scheinen aber ein gutes, wenn auch durch die renale Funktion modifiziertes, qualitatives Bild des Serum-Proteoms wiederzugeben (Marshall et al. 1998; Spahr et al. 2001). Dabei stellt die molekulare Ausschlussgröße der Nierenfiltration offensichtlich kein Problem dar, sondern eher die mit der Anwesenheit großer, prominenter Proteine einhergehende Menge an Abbauprodukten und Isoformen. Diese Informationsflut auf das Wesentliche zu reduzieren und dabei die Komplexität des Urins im Auge zu behalten, ist die größte Herausforderung an hochauflösende Proteom-Forschungen, sollen diese Einzug in die klinische Diagnostik finden.

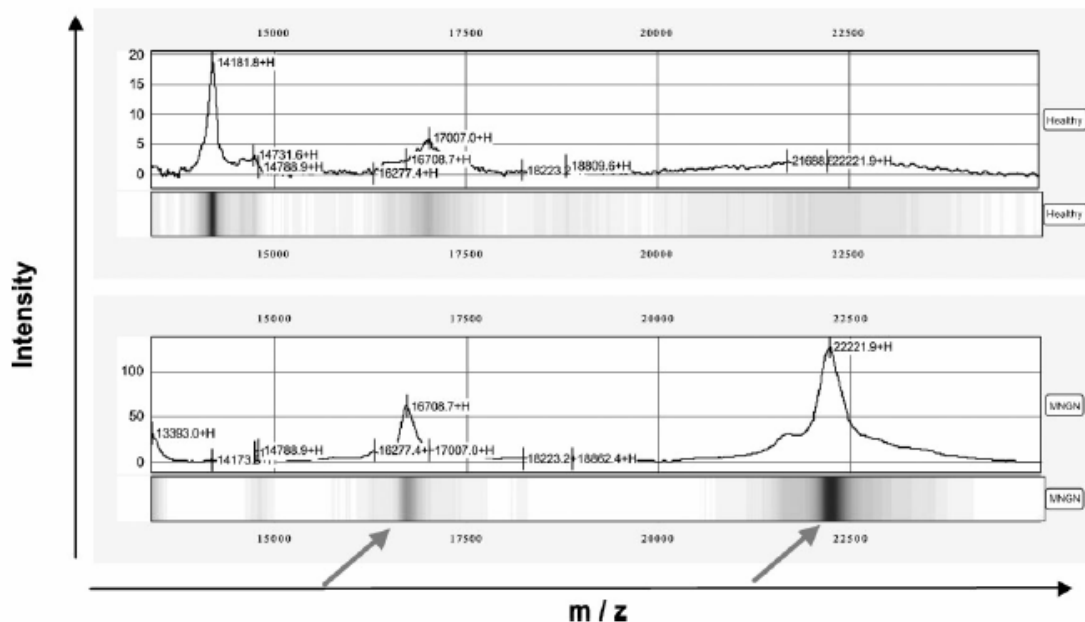


Abbildung 1.18: Vergleich zweier Urinproben mittels SELDI.

Die SELDI-Technologie trennt Proben zunächst mittels einer stationären Phase. Anschließend wird die gesamte Trennlänge mit einem Laser abgefahren und die dort befindlichen Proteine massenspektrometrisch erfasst (Neuhoff et al. 2004).

1.3.3 Diabetes und die diabetische Nephropathie

In den letzten Jahrzehnten hat die Häufigkeit des Diabetes mellitus (Zuckerkrankheit) erheblich zugenommen, so dass derzeit in Deutschland fast 6 Millionen Menschen davon betroffen sind. Weitere 2 Millionen Betroffene dürften nach Schätzungen der Versicherer unentdeckt sein. Damit ist allein seit 1998 ein Anstieg um 43 Prozent zu beobachten (Standl et al. 2004). Durch die nicht selten schwerwiegenden Begleiterscheinungen, wie Beinamputationen, Herzinfarkt, Nierenversagen, Erblinden, Nervenleiden, sowie die Notwendigkeit einer jahrelangen Behandlung, verursacht Diabetes großes individuelles Leid und immense gesellschaftliche Kosten. Tabelle 1.19 zeigt die durch Diabetes mellitus hervorgerufene Erhöhung des Erkrankungsrisikos für verschiedene Krankheiten.

Diabetes mellitus beruht auf einer mangelnden Insulinwirkung. Insulin ist ein von der Bauchspeicheldrüse produziertes Hormon, welches unter anderem die Aufnahme und den Abbau von Glukose in den Körperzellen steuert. Ist dieser Prozess gestört, kann der Zucker nicht normal umgesetzt werden und reichert sich in Geweben, im Blut und im Urin an. Dabei kommt es zu einer verminderten Glukoseoxidation und Drosselung der Glykogenbildung, Verminderung der Lipogenese und Steigerung der Cholesterinproduktion, Verminderung der Peptid- und Proteinsynthese, sowie allgemein zu einer Herabsetzung der Bildung von energiereichen Verbindungen.

Die Krankheit Diabetes mellitus ist ein Sammelbegriff für Glukosestoffwechselstörungen unterschiedlicher Ätiologie und Symptomatik. Beim Diabetes Typ I (insulinabhängiger D.m., IDDM) werden die Inselzellen der Bauchspeicheldrüse durch eine immunologische Fehlfunktion zerstört, was einen Insulinmangel zur Folge hat. Der Typ Ia, der praktisch nur im Kindesalter auftritt, wird vermutlich durch virale Infektionen manifestiert. Der Typ Ib ist bei Erwachsenen bis etwa zum 40. Lebensjahr die häufigste Diabetes Form und tritt gehäuft mit anderen Autoimmunerkrankungen auf. Die Erkrankten des Typ I Diabetes müssen in der Regel ihr Leben lang mit Insulin behandelt werden.

Beim Diabetes vom Typ II sprechen die Körperzellen schlecht auf Insulin an und die Aufnahme und der Umsatz von Glukose ist verzögert. Es besteht zunächst kein Insulinmangel (nicht insulinabhängiger D.m., NIDDM). Die Krankheit tritt vorwiegend im höheren Lebensalter auf, beginnt oft schleichend und wird häufig nur „nebenbei“, z. B. nach einem Herzinfarkt, festgestellt.

Tabelle 1.19: Risikoerhöhung für Folgekrankheiten des Diabetes

Krankheit	Erhöhung des Erkrankungsrisiko für Diabetiker
Erblindung	10 – 20
Durchblutungsstörungen	15 – 20
- des Herzens	2 – 6
- der Gliedmaßen	20 – 35
Schlaganfall	2 – 3
Chronisches Nierenversagen	15 – 20

Das durchschnittliche Erkrankungsrisiko in der Bevölkerung beträgt 1.

Quelle: (Robert-Koch-Institut 2000).

Obwohl die Spätschäden des Diabetes mellitus zumindest beim Typ II durch gut eingestellten Zucker, sowie durch medikamentöse Blutdruckkontrolle in Form von Angiotensin-Converting-Enzym-(ACE)-Hemmung oder Angiotensin-Rezeptor-Blockern (ARB) weitestgehend eingedämmt werden können, greifen diese Maßnahmen meist nur, wenn die Erkrankung frühzeitig erkannt und therapiert wird (American Diabetes Association 2002; Gaede et al. 2003; Montori et al. 2002). Später scheint auch bei kombinierter medikamentöser Therapie von ACE-Hemmern und ARBs nur eine kurzfristige Besserung einzutreten (Rossing et al. 2003a; Rossing et al. 2003b).

Bei etwa einem Drittel aller Diabetiker kommt es nach meist mehr als 10 Jahren bestehender Erkrankung zu einer Schädigung der glomerulären Kapillaren der Niere, der diabetischen Glomerulosklerose oder diabetischen Nephropathie. Diese, als Folge des Diabetes auftretende Nierenschädigung, stellt in den USA und in Europa inzwischen die häufigste Einzel-Ursache für eine terminale Niereninsuffizienz dar (Wolf et al. 2003). In den USA werden etwa 40% aller neuen Fälle eines Nierenversagens auf diabetische Nephropathie zurückgeführt, die damit im Jahr 1997 Behandlungskosten in Höhe von über 15,6 Billionen Dollar verursachte (American Diabetes Association 2002). In Deutschland gab es Ende 1996 rund 42.950 chronisch niereninsuffiziente Patienten, die regelmäßigen Dialysebehandlungen unterzogen werden müssen und jährlich werden etwa 12.600 neue Fälle diagnostiziert (Robert-Koch-Institut 2000). Etwa ein Drittel dieser Neuerkrankungen wird auf die Grundkrankheit Diabetes mellitus zurückgeführt. Die Lebenserwartung besonders dieser Patienten ist deutlich verkürzt, da viele aufgrund weiterer Nebenerkrankungen bereits im Stadium der kompensierten Niereninsuffizienz versterben, vor allem an Herzinfarkt und Schlaganfall. Zusätzlich fallen große Kosten im Gesundheitswesen an, da die Patienten früh arbeitsunfähig werden und intensiv therapiert werden müssen. Für die Dialyse entstehen in der Bundesrepublik Deutschland Kosten

zwischen 25.000 und 60.000 Euro je Jahr und Patient. Hochgerechnet kostet die chronische Dialysebehandlung in Deutschland derzeit jährlich etwa 1,75 Mrd. Euro, für Nierentransplantationen werden jährlich über 100 Mio. Euro aufgewendet und für die Nachsorge bei den Nierentransplantierten rund 125 Mio. Euro. Prognosen des Robert-Koch-Institutes besagen, dass die Zahl der Patienten in Zukunft trotz aller präventiver Bemühungen weiter zunehmen wird (Robert-Koch-Institut 2000).

Da auf der einen Seite die Grunderkrankung Diabetes mellitus durch Regulation der Ernährungsgewohnheiten und medikamentöse Präparate gut kontrollierbar ist, die bei nicht rechtzeitiger Intervention auftretenden Folgeschäden auf der anderen Seite zu enormen gesellschaftlichen Kosten und persönlichem Leid führen, ist eine möglichst frühzeitige Erkennung der beginnenden Sekundärerkrankungen oder des Risikos dieser Erkrankung wünschenswert (Brenner et al. 2001; Lewis et al. 2001; Parving et al. 1982). Der heute in der klinischen Praxis verwendete Test, um eine Diabetes bedingte Nephropathie zu erkennen, ist die Messung des mit dem Urin ausgeschiedenen Albumins. Je nach der darin gefundenen Konzentration wird zwischen den Stadien der Mikroalbuminurie und der Makroalbuminurie unterschieden (Tab. 1.20). Da die Filtrationsleistung der Niere stark von dem akuten Zustand des Patienten, von seiner Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme, sowie von möglichen Infektionen abhängig ist, gilt das Ergebnis erst als gesichert, wenn die Grenzen in zwei von drei Messungen innerhalb einer 3-6 monatigen Periode überschritten worden sind. Doch auch dann müssen noch immer nicht renale Ursachen, wie körperliche Anstrengung, Harnwegsinfektionen, unkontrollierter Bluthochdruck, schlecht eingestellter Diabetes, Herzinsuffizienz oder fieberhafte Erkrankungen ausgeschlossen werden.

Tabelle 1.20: Definitionen der Albuminurie

Kategorie	24-h Sammelurin (mg / 24h)	Sammelurin (µg / min)	Spontanurin (µg / mg _{Kreatinin})
Normal (physiologische Albuminurie)	< 30	< 20	< 30
Mikroalbuminurie	30 – 299	20 – 199	30 – 299
Makroalbuminurie	≥ 300	≥ 200	≥ 300

Quelle: (American Diabetes Association 2002)

Ist die Proteinkonzentration im Urin persistierend erhöht, so liegt bei Diabetikern die Diagnose einer diabetischen Nephropathie nahe. Dennoch müssen nicht Diabetes bedingte Ursachen differenzialdiagnostisch ausgeschlossen werden. Daher werden in diesem Stadium die Kreatinin-Clearance und das Urinsediment untersucht und

Sonographien, wie auch Biopsien eingesetzt. Wird dabei eine Nierenschädigung festgestellt ist es aber auf jeden Fall zu spät, um mit präventiven Maßnahmen entgegenzuwirken.

Der Mikroalbumintest ist damit immer noch der wichtigste Parameter zur Erfassung einer beginnenden Nephropathie. Der tatsächliche Zusammenhang zwischen einer Proteinurie und der Ausbildung einer diabetischen Niereninsuffizienz wird heute jedoch umfassend diskutiert. Die gegenwärtige Praxis stützt sich im Wesentlichen auf Zahlen, die Anfang der 80er Jahre aus Studien über Typ-I-Diabetiker gewonnen wurden (Viberti et al. 1982). Hingegen belegen neuere Daten, dass eine Mikroalbuminurie in Typ-I-Patienten mit größerer Wahrscheinlichkeit in eine physiologische Albuminurie zurückkehrt als in eine Makroalbuminurie, so dass andere Entwicklungswege für viele der auftretenden Nephropathien angenommen werden können (Perkins et al. 2003). Ähnliche Beobachtungen werden auch bei Typ-II-Diabetikern berichtet, die Niereninsuffizienzen entwickeln, ohne dass eine Mikroalbuminurie vorausgeht (Kramer et al. 2003). Auch ist nicht auszuschließen, dass die reine Beurteilung des Risikofaktors aufgrund der Albuminausscheidung zu Fehleinschätzungen führt, da gerade bei Typ-II-Patienten andere Ursachen, wie Bluthochdruck, zu verminderter tubulärer Rückresorptionsleistung führen können (Bennett et al. 1995).

Da der „Marker“ Albumin zwar mittels Antikörperreaktionen einfach zu messen ist, jedoch in vielen Fällen versagt, zu falschen Schlüssen führt oder zu spät festgestellt wird, werden seit langem auch immer wieder andere Proteine im Zusammenhang mit der diabetischen Nephropathie diskutiert (Tab. 1.21). Dabei handelt es sich sowohl um glomeruläre (Transferrin, Fibronektin), wie auch um tubuläre Proteine (β_2 -Mikroglobulin, Retinol-Bindungsprotein, α_1 -Mikroglobulin, Urin Protein 1), was die vielfältigen Möglichkeiten der Entwicklung einer diabetischen Nephropathie deutlich macht.

Um den vermutlich vielfältigen Entwicklungsmöglichkeiten einer diabetischen Nephropathie gerecht zu werden und diese gleichzeitig von anderen renalen Schädigungen abzugrenzen, muss ein diagnostisches Verfahren gefunden werden, welches die Gefährdung frühzeitig, also noch vor dem Eintreten eines Organschadens, erkennen kann. Nur dann kann eine gezielte präventive Vorbeugung wirksam erfolgen.

Tabelle 1.21 Protein – Marker der diabetischen Nephropathie

<u>Glomeruläre Proteine</u>	
<i>Transferrin</i>	Mit 76,5 kDa ist Transferrin etwa ähnlich so groß wie Albumin und hat einen um eine Einheit höheren isoelektrischen Punkt. Daher darf erwartet werden, dass es eher und in höheren Raten ausgeschieden wird.
Urin	Die Ausscheidungsrate bei Patienten korreliert mit der des Albumins, ist bei niereninsuffizienten Patienten erhöht und führt häufiger zu positiven Befunden. Abgrenzung zwischen Diabetikern und Bluthochdruckpatienten möglich
<i>Fibronektin</i>	Hochmolekulares α_2 -Glycoprotein (250 kDa), ist Oberflächenbestandteil normaler Bindegewebezellen. Bindet an andere Makromoleküle und ist an der Pathogenese der diabetischen Mikroangiopathie beteiligt. Bei vielen Alterskrankheiten, wie Diabetes, Arteriosklerose, Arthritis dereguliert.
Plasma	Höherer Level bei Diabetikern als bei Kontrollpatienten, keine Verbindung zur Dauer der Diabetes-Erkrankung, zum body-mass-Index oder zum Blutdruck
Urin	Höherer Spiegel bei Diabetikern und bei Diabetikern mit Mikroalbuminurie, negativ korreliert mit Creatinine-Clearance
<i>Laminin P1</i>	
Serum	Erhöhter Spiegel bei Diabetikern
Urin	Höherer Spiegel bei Diabetikern
<i>Typ IV Collagen</i>	
Serum	Erhöhter Spiegel bei Diabetikern und diabetischer Nephropathie
Urin	Erhöht bei Diabetikern
<i>Heparan sulfate proteoglycan</i>	
Urin	Erhöhter Spiegel bei Diabetikern
<u>Tubuläre Proteine</u>	
<i>β_2-Mikroglobulin</i>	
Urin	Erhöhter Spiegel bei diabetischer Nephropathie, korreliert mit Mikroalbuminurie, kein Zusammenhang zur Diabetesdauer, Insulindosis, Blutdruck und Blutzuckerkonzentration.
Blut	Erhöhter Spiegel bei diabetischer Nephropathie, korreliert mit Albuminurie
<i>Retinol-binding protein</i>	
Urin	Erhöhte Ausscheidung bei diabetischer Nephropathie, korreliert mit β_2 -Mikroglobulin und mit Albumin. Kein Unterschied zwischen Typ-II Patienten mit erhöhtem und normalem Blutdruck
Serum	Erhöhter Level im Vergleich zu Kontrollpatienten
<i>α_1-Mikroglobulin</i>	
Urin	Erhöhte Ausscheidung im Vergleich zu Kontrollpatienten, korreliert mit Albumin und Transferrin Ausscheidungsrate
<i>Urin-Protein 1</i>	
Urin	Gilt als sensitiverer Marker für tubuläre Fehlfunktionen als α_1 -Mikroglobulin
<i>Tamm-Horsefall Protein</i>	
Urin	Erhöht im Vergleich zu Kontrollpatienten, Ausscheidungsrate steigt mit der Dauer der Diabeteserkrankung
<i>N-acetyl-β-D-glucose-amidase</i>	
Urin	Erhöhte Ausscheidungsrate auch bereits dann, wenn die Albuminausscheidung noch im normalen Bereich liegt. Erhöht im Zusammenhang mit Retinopathie.
Serum	Erhöhter Level
<i>Cholinesterase</i>	
Urin	Erhöhte Aktivität im Vergleich zu Kontrollen
<i>γ-Glutamyltranspeptidase</i>	
Urin	Erhöhte Ausscheidungsrate. Korreliert mit Zuckereinstellung und glomerulärer Filtrationsrate (GFR)
<i>Alanin-Aminopeptidase</i>	
Urin	Erhöhte Ausscheidungsrate
<u>Tubuläre Antigene</u>	
<i>Brush-border-antigen</i>	
Urin	Erhöhte Ausscheidungsrate, korreliert mit Albuminausscheidung, RBP und β_2 -Mikroglobulin

Quelle: (Hong et al. 1998)

1.3.4 Andere wichtige Nephropathien

Unter den Erkrankungen der Niere stellen die Glomerulopathien, also Erkrankungen der Glomeruli, die wesentlichsten und häufigsten Formen dar. Glomeruläre Erkrankungen können primär, aber auch sekundär im Rahmen systemischer Krankheiten auftreten. Aufgrund der Pathogenese lassen sie sich in die Hauptkategorien inflammatorisch (nephritisches Syndrom) und hämodynamisch (nephrotisches Syndrom) einteilen (Tabelle 1.22) (Weissinger et al. 2004a).

Die Glomerulopathie wird als Folge einer Autoimmunreaktion gesehen, bei der entweder im Glomerulus fixierte bzw. abgefangene Immunkomplexe oder gegen die Basalmembran gerichtete Antikörper über eine Aktivierung des Komplementsystems, von Makrophagen, Neutrophilen und T-Lymphozyten eine Schädigung der benachbarten glomerulären Strukturen bewirken (Hildebrandt 1998). Die Diagnostik der Glomerulonephritis beruht auf klinischen und laborchemischen Daten, aber vor allem auf der Nierenbiopsie. Diese ermöglicht mittels mikroskopischer Untersuchung des gewonnenen Gewebes, die genaue Einteilung der Glomerulonephritis. Der Eingriff ist nicht gefahrlos, da in etwa einem von 200 Fällen eine ernstzunehmende Komplikation in Form einer Nachblutung auftritt, die zum Verlust der punktierten Niere führen kann (Cutillas et al. 2004).

Tabelle 1.22: Einteilung der Glomerulopathien (Vierfeldschema).

	Primär - idiopathisch	Sekundär - systemisch
entzündlich	Poststreptokokken-GN Idiopathische, rapid-progressive GN IgA – Nephropathie Membranproliferative GN Messangioproliferative GN	Lupusnephritis Goodpasture-Syndrom Purpura Schoenlein-Henoch Wegener-Klinger-Granulomatose Panarteriitis nodosa Churg-Strauss-Syndrom
nicht-entzündlich	Minimal-changes GP Fokal-segmentale Glomerulosklerose Membranöse GP Syndrom der dünnen Basalmembran	Diabetische Glomerulopathie Paraproteinämische GP GP bei Amyloidose GP bei Kryoglobulinämie Alport-Syndrom Cystinose LCAT-Mangel

GN: Glomerulonephritis, GP: Glomerulopathie. Quelle: (Hildebrandt 1998).

Die glomeruläre Minimalläsion (MCN) oder minimal changes disease (MCD) ist eine häufige Nierenerkrankung des Kindes, tritt aber auch im Erwachsenenalter auf. Ihr Name beruht auf der Tatsache, dass sie Patienten klinisch an einem nephrotischen Syndrom leiden, die lichtmikroskopische Betrachtung des durch eine Nierenbiopsie

gewonnene Gewebes aber kaum Veränderungen zeigt. Die Patienten sprechen auf Kortikosteroide an, im Erwachsenenalter müssen häufig ACE-Inhibitoren und ARBs verabreicht werden (Cutillas et al. 2004; Kaiser et al. 2004b).

Die membranöse Glomerulonephritis (MNGN) ist die häufigste Ursache eines nephrotischen Syndroms bei Erwachsenen nach der diabetischen Nephropathie. Die auslösenden Faktoren sind entweder unbekannt (idopathische MNGN – 80 %), oder sind auf Tumoren, Infektionen mit Hepatitisviren oder Medikamente, z. B. Penicillamin, zurückzuführen (sekundäre MNGN). Mikroskopisch ist eine Verdickung der Basalmembranen der Glomeruli zu erkennen, welche auf Einlagerungen von Immunglobulinen und Komplement C3 zurückzuführen ist. Der Verlauf ist sehr unterschiedlich. Etwa 50 % der Patienten werden nach 10 bis 20 Jahren dialysepflichtig (Cutillas et al. 2004; Kaiser et al. 2004b).

Die fokal segmentale Glomerulosklerose (FSGS) wird häufig als eine Verlaufsform der MCD betrachtet. Dabei sind einzelne Glomeruli, aber auch verschiedene Teile eines Glomerulus von Vernarbungsprozessen betroffen. Anders als bei der MCD ist ein Fortschreiten zur dialysepflichtigen Niereninsuffizienz möglich. Die FSGS ist auf Kortikoidsteroiden nicht ansprechbar, jedoch auf Cyclosporin A.

Wie oben beschrieben, stellt die diabetische Glomerulopathie, oder diabetische Nephropathie, die häufigste Einzelursache für eine terminale Niereninsuffizienz und für die Indikation zu einer Dialyse-Behandlung dar, weshalb diese auch im Mittelpunkt dieser Arbeit steht. Daneben gilt es aber, auch einige andere Nephropathien, insbesondere aus differenzialdiagnostischer Sicht zu beachten.

Alle beschriebenen Nephropathien werden heute nach vorliegender Proteinurie durch eine Nierenbiopsie diagnostiziert. Erst dieser, nicht gefahrlose, Eingriff, zeigt die unterschiedlichen histologischen Ursachen der Erkrankungen auf. Da es nahe liegt, dass sich diese unterschiedlichen Erkrankungen auch in Form eines unterschiedlichen Proteinbildes im Urin abbilden, wäre es wünschenswert, eine nicht invasive Methode zur Diagnose der beschriebenen Erkrankungen zu finden.

1.3.5 Proteomuntersuchung von Urin bei nicht renalen Erkrankungen – GvHD nach Stammzelltransplantation

Als Beispiel einer Erkrankung, die nicht mit einer Fehlfunktion der Niere in Verbindung steht, soll die Abstoßungsreaktion des Transplantates gegen den Empfängerorganismus nach einer Stammzelltransplantation behandelt werden. Hierbei handelt es sich um eine Komplikation, die für den Betroffenen lebensbedrohend sein kann und rechtzeitig erkannt werden muss. Ein zuverlässiges Kriterium zur Diagnose ist bis heute nicht bekannt.

Benötigt wird eine vor allem kontinuierliche Überwachungsmethode, die die Entwicklung einer Abstoßung Tage vor ihrem Ausbruch anzeigen kann. Daher bietet sich die Untersuchung von Urin als einfach, schnell und regelmäßig zu bekommende Körperflüssigkeit an. Weiterhin muss die Nachweismethode schnell sein und entweder einen zuverlässigen Marker oder eine ganze Reihe von möglichen Markern erfassen.

Alle Zellen des Blutes und des Immunsystems stammen von blutbildenden (hämatopoetischen) Stammzellen (hematopoietic stem cells (HSC)) ab (Abb. 1.23). Da die reifen Zellen im peripheren Blut und in den immunologischen Organen eine begrenzte Lebensspanne besitzen, müssen diese Zellpopulationen lebenslang kontinuierlich regeneriert werden. Die Homöostase hämatopoetischer Zellen kann durch Zellvermehrung und durch Zelltod reguliert werden. Die Zellvermehrung kann einerseits durch Neubildung aus Stammzellen, andererseits durch Zellproliferation, d.h. Vermehrung unreifer oder reifer Zellstadien, erfolgen. Ein wichtiger Mechanismus zur Verringerung der Zellzahl ist die Apoptose.

Ist einer dieser Mechanismen gestört, kommt es zu bösartigen Blutkrankheiten, die ohne Behandlung zum Tod des Patienten führen würden. Allein in Deutschland erkranken jährlich etwa 4.000 Menschen, die entweder medikamentös durch eine Chemotherapie oder aber durch eine Stammzelltransplantation (HSCT) behandelt werden müssen. HSC besitzen die außerordentliche Fähigkeit nicht nur das blutbildende System in situ zu erhalten, sondern sind nach einer Transplantation auch in der Lage, die Blutbildung im Empfängerorganismus zu rekonstituieren. In der Praxis werden daher HSCT eingesetzt, wenn durch die Behandlung einer bösartigen Bluterkrankung (akute myeloische Leukämie (AML), chronische myeloische Leukämie (CML), akute lymphatische Leukämie (ALL), Non-Hodgkin-Lymphome

(NHL), Hodgkin'sche Erkrankung (HD), Plasmozytom (Multiples Myelom - MM), schwere aplastische Anämie (SAA)) das Blut- bzw. Immunsystem des Patienten fast vollständig zerstört wurde. Entscheidend für das Gelingen der Transplantation ist die Gewebetypisierung nach dem HLA-System (humane Leukozyten-Antigene). Stehen keine zuvor entnommenen eigenen HSC zur Verfügung (autologe HSCT), so wird zunächst in der Verwandtschaft des Patienten nach Spendern gesucht (allogene, HLA-identische HSCT unter Verwandten). Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Geschwister passende Spenderzellen besitzt, beträgt immerhin 25 %, bei Eltern ist die Übereinstimmung hingegen aufgrund der Vererbungswege sehr unwahrscheinlich. Muss eine allogene, HLA-identische HSCT unter nicht-Verwandten durchgeführt werden, so kann ein passender Spender in weltweit verknüpften Registern gesucht werden. Das zentrale Knochenmarkspender-Register für die Bundesrepublik Deutschland in Ulm führte im Jahr 2001 die Daten von 1.685.000 deutschen Spendern. Zur gleichen Zeit wurden fast 1.400 Suchanfragen für deutsche Patienten beantwortet. Etwa zwei Drittel davon wurden auch tatsächlich transplantiert.

Die Anwendung dieser Therapie bei Verwendung genetisch nicht identischer, also allogener Spender muss eine doppelte immunologische Barriere überwunden werden. Neben der Abstoßung transplantierte Zellen durch den Wirtsorganismus (host versus graft, HvG), besteht die Möglichkeit einer von dem Transplantat ausgehenden immunologischen Reaktion (graft versus host, GvH). Diese wird durch transplantierte T-Zellen ausgelöst, die gegen das Gewebe des Empfängers reagieren. Die akute Form der GvH manifestiert sich an der Haut in Form eines generalisierten Exanthems sowie an Leber und Magen-Darmtrakt durch Zeichen einer akuten Entzündung. Bei ungenügender Kontrolle kann sich eine chronische GvHD entwickeln, die in ihrer ausgeprägten Form zahlreiche Merkmale autoimmunologischer Erkrankungen hat. Zur Behandlung bzw. Verhütung werden immunsuppressiv wirksame Medikamente eingesetzt, vor allem Steroide, Cyclosporin A, Methotrexat und Anti-Lymphozytenserum. Dennoch stellt die GvHD eine ernstzunehmende Komplikation und den häufigsten Grund für eine transplantationsbezogene Sterblichkeit dar (Farag 2004; Gratwohl et al. 2002). Obwohl erste vielversprechende Erfolge dadurch zu verzeichnen sind, dass T-Zellen aus den Transplantaten entfernt werden (Rodewald et al. 2002), darf auch nicht vergessen werden, dass gerade von diesen eine entscheidende anti-Tumor Wirkung ausgeht (graft versus leukemia) (Horowitz et al. 1990; Kolb et al. 2004).

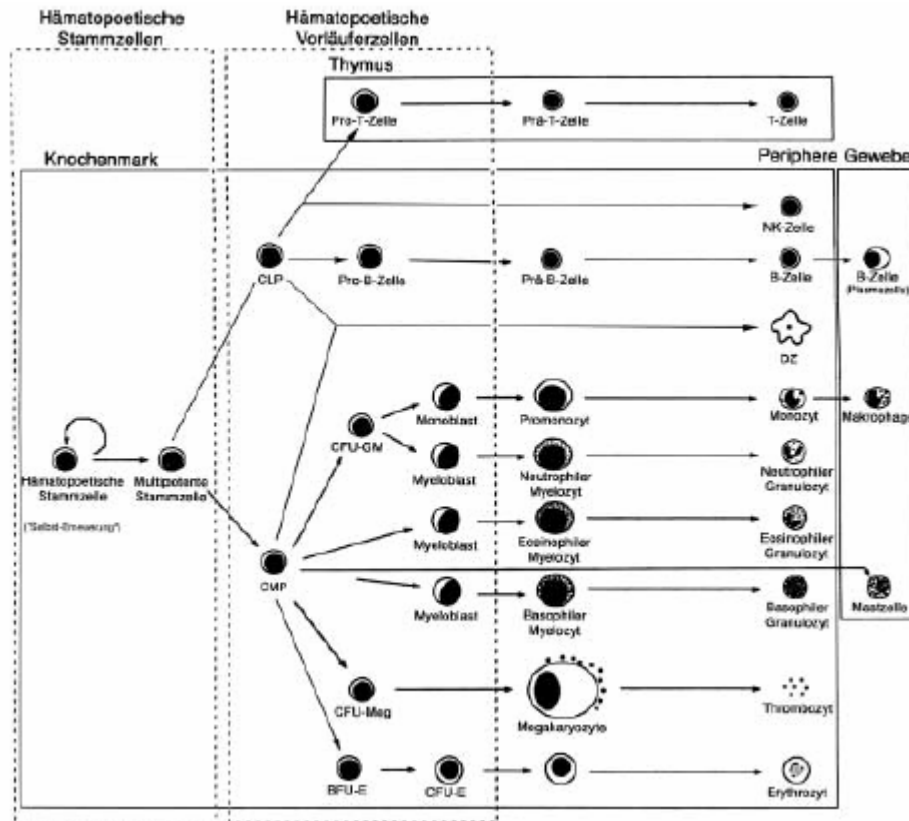


Abbildung 1.23 Der hämatopoetische Stammbaum

Dargestellt ist die Entwicklung der verschiedenen Blutzellen aus den hämatopoetischen Stammzellen. Mit Ausnahme der T-Zellen und der Mastzellen findet die Differenzierung aller Zellen im Knochenmark statt (Rodewald et al. 2002).

Trotz einiger Anstrengungen, zuverlässige Marker für eine beginnende GvH-Reaktion zu finden (Dickinson et al. 2002; Jaksch et al. 2004; Jarvis et al. 2003; Knulst et al. 1992; Seidel et al. 2003; Takatsuka et al. 2000), steht heute noch immer die Klinik im Vordergrund der Diagnose. Einzelne Proteine oder Gen-Transkripte haben sich bislang nicht als zuverlässig genug erwiesen oder sind zu spät oder zu langsam nachzuweisen. Auch ist es notwendig, diese Untersuchung im Abstand von wenigen Tagen bis zum Tag 100 nach der HSCT durchzuführen, da in diesem Zeitraum die akute GvHD am häufigsten auftritt.

Dieses Beispiel soll zeigen, dass eine Proteomuntersuchung im Urin mit der gewählten Methode auch im Falle eines zeitkritischen Prozesses möglich ist. Dabei handelt es sich um eine unabdingbare Voraussetzung, wenn die CE-MS-Technologie Einzug in den klinischen Alltag finden soll. Weiterhin zeigt dieses Beispiel, dass Urin als Untersuchungsmaterial für entzündliche Prozesse, die sich im Proteom abzeichnen, geeignet ist. Die zwischen Blut und Urin geschaltete Nierenfunktion wirkt zwar wie ein selektiver Filter, ermöglicht aber dennoch die Proteomuntersuchung vor allem kleiner bis mittelgroßer Polypeptide.

1.4 Plasma – Proteomuntersuchungen

1.4.1 Zusammensetzung und Eigenschaften des humanen Plasmas

Etwa ein Zwölftel des Körpervolumens eines normalen Erwachsenen ist Blut. Es dient der Versorgung des Gewebes mit Nährstoffen, dem Abtransport von Kohlendioxid und Stoffwechselprodukten, der Wärmeregulation sowie der Verteilung von Enzymen, Hormonen und anderem. Die Dichte des Blutes beträgt 1,057 bis 1,060 g/cm³, die Gefrierpunktserniedrigung 0,56°C, der osmotische Druck bei 37,5°C ist 3 atm (5600 mm Hg bzw. 745 kPa), der pH-Wert schwankt geringfügig zwischen 7,37 und 7,43.

Nach dem Entfernen der korpuskulären Bestandteile (Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten) verbleibt das Blutplasma, das ca. 55 % des Blutvolumens ausmacht. Dieses besteht im Wesentlichen aus Proteinen, Wasser, Ionen (Na, Ca, K, Cl, Mg, Fe, Br, I, Kohlen-, Phosphor- und Schwefelsäure), sowie diversen Transportstoffen. Die Plasmaproteine, die etwa 7-8 % des Plasmas ausmachen, sind hauptsächlich Albumine (60-80 %), Globuline (20-40 %) und Fibrinogen (4-7 %). Blutplasma ohne Fibrinogen wird als Blutserum bezeichnet (Abb. 1.24).

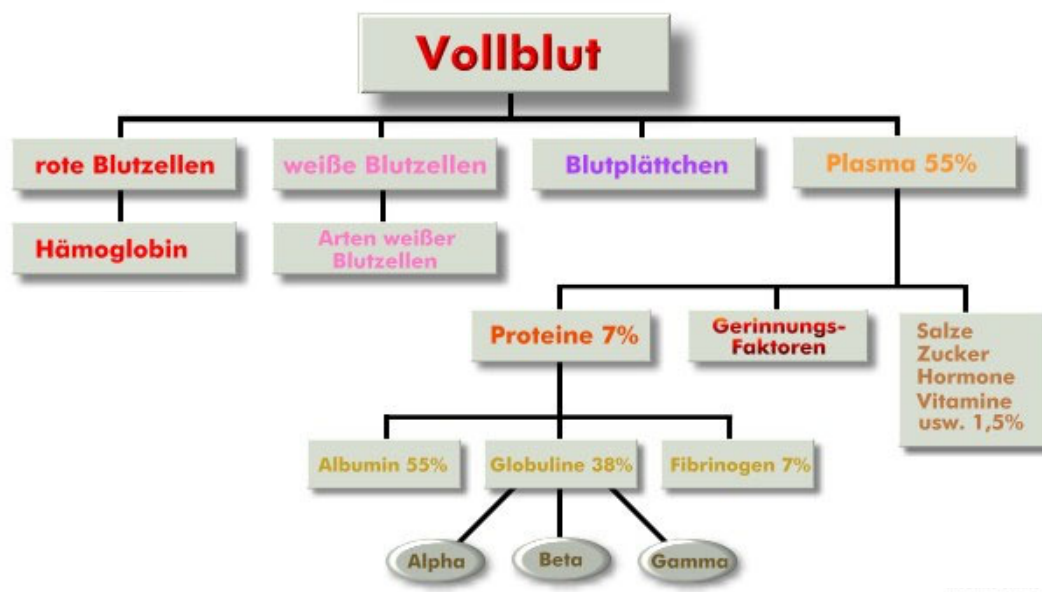
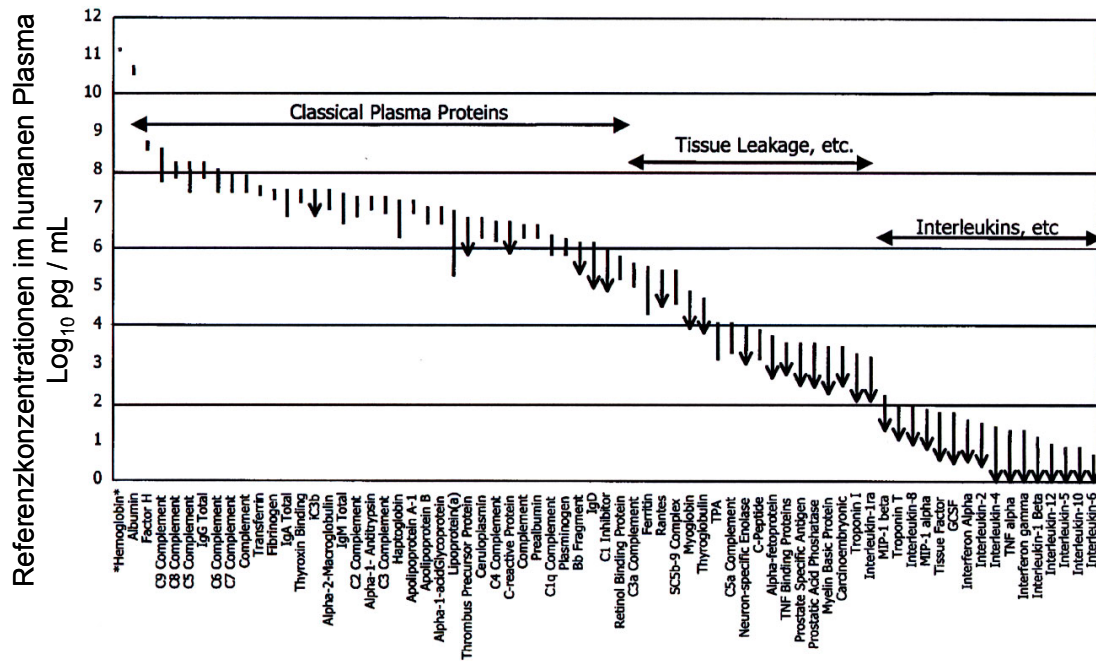


Abbildung 1.24: Zusammensetzung des menschlichen Blutes

1.4.2 Das Proteom des humanen Plasmas

Das menschliche Plasmaproteom enthält möglicherweise die meisten, wenn nicht sogar alle Proteine des Körpers. Zusätzlich können auch noch Proteine aus Bakterien, Pilzen oder Viren vorhanden sein. Viele dieser Proteine liegen in äußerst geringen Konzentrationen vor (\ll pg/ml), während andere, wie zum Beispiel Albumin, in sehr hohen Konzentrationen (\gg mg/ml) auftreten (Abb. 1.25). Neben Millionen von unterschiedlichen Immunglobulinen, treten viele Proteine in einer Vielzahl von post-translationalen Modifikationen auf. Diese Komplexität und der große Konzentrationsbereich machen Plasma zu einem der schwierigsten Untersuchungsmaterialien für Proteomuntersuchungen (Anderson et al. 2003).



:Abbildung 1.25: Referenzkonzentrationen einiger Proteine im humanen Plasma.
 Die zwölf Zehnerpotenzen überspannenden Konzentrationen sind in Proteingruppen eingeteilt. In den Fällen, in denen nur eine Obergrenze bekannt ist, wurde eine Pfeil an das untere Ende gezeichnet (Anderson et al. 2003).

Gleichzeitig stellt Plasma aus medizinischer Sicht die interessanteste aller Körperflüssigkeiten dar. Nahezu jede Zelle des menschlichen Körpers kommt direkt oder indirekt mit dem Blut in Berührung. Ihre Proteine werden dabei über Transmembrantransporte oder durch Verletzungen der Membran nach einem Zelltod in das Blut übertragen.

Viele Krankheiten werden bereits heute über spezifische Proteine im Blut nachgewiesen. Dazu zählen das prostataspezifische Antigen (Kuriyama et al. 1980), γ -Glutamyl-Transferase (Schmidt et al. 1982), Troponin T (Katus et al. 1989), Myoglobin (Drexel et al. 1983), Kreatinkinase MB (Neumeier et al. 1975) sowie einige andere, meistens tumorrelevante Proteine. Und es ist zu vermuten, dass praktisch jede Erkrankung sich durch neue, fehlende oder veränderte Proteine im Blut zeigt.

Allerdings hat die Zahl der neu zugelassenen Proteintests in den letzten Jahren stetig abgenommen (Anderson et al. 2003). Neben immer restriktiveren Zulassungsbeschränkungen ist die Ursache dafür vermutlich darin zu finden, dass das menschliche Plasma ein äußerst kompliziertes Proteom aufweist und zuverlässige Ein-Protein-Tests immer schwieriger zu finden sein werden. Es ist daher verständlich, dass in letzter Zeit zunehmend Methoden der Proteomforschung verwendet werden, um die Zusammenhänge zwischen einer Erkrankung und ihren Auswirkungen auf das Plasma darzustellen.

Insbesondere bei vielen Tumorerkrankungen konnten Veränderungen im Proteinpatternt gefunden werden (Adam et al. 2002; Issaq et al. 2002b; Jones et al. 2002; Petricoin, III et al. 2002; Petricoin et al. 2002b; Rogers et al. 2003; Rosenblatt et al. 2004). Die klassische zweidimensionale Gelelektrophorese kann in vielen Fällen Hinweise auf veränderte Proteinmuster geben (Gharbi et al. 2002; Ji et al. 1994; Wu et al. 2002), und nicht zuletzt ist es die Massenspektrometrie, die in Verbindung mit chromatographischen Trenntechniken klinisch relevante Informationen aufzeigen kann (Pusch et al. 2003).

Wie hoch der Informationsgehalt des menschlichen Serums tatsächlich ist, kann heute nur vermutet werden, da die verwendeten Technologien bei der hohen Dynamik der Serumproteinkonzentrationen natürlicherweise an ihre Nachweisgrenzen treffen. Hochauflösende Trenntechniken und sensitive Nachweisverfahren, wie die zweidimensionale Gelelektrophorese (Abbildung 1.26) und mehrdimensionale Chromatographieverfahren, sind heute in der Lage, weit mehr als Tausend einzelne Proteinspots im Plasma zu erkennen (Adkins et al. 2002; Jurgens et al. 1998; Pieper et al. 2003b; Pieper et al. 2003a; Tirumalai et al. 2003). Kürzlich haben Anderson et al. die Ergebnisse von vier verschiedenen Methoden kombiniert und daraus eine Liste mit 1.175 nicht redundanten Plasmaproteinen erstellt (Anderson et al. 2004). Allerdings konnten nur 195 Genprodukte gefunden werden, die mittels mehr als einer Technik nachgewiesen worden waren. Lediglich 46 Proteine konnten identifiziert werden, die durch alle vier Verfahren detektiert wurden. Die sich aus der Liste der 195 nicht-redundanten Proteine nach dem heutigen Stand des Wissens ergebende Zusammensetzung des menschlichen Plasmas ist in Abbildung 1.27 dargestellt.

Wenn in der Zukunft immer neue Proteomtechniken etabliert werden, die neue Bereiche abdecken oder vorhandene Schwächen beheben, kann davon ausgegangen werden, dass die Zahl der identifizierten menschlichen Plasmaproteine, sowie das Wissen über deren Verhalten in Krankheitssituationen stetig ansteigt.

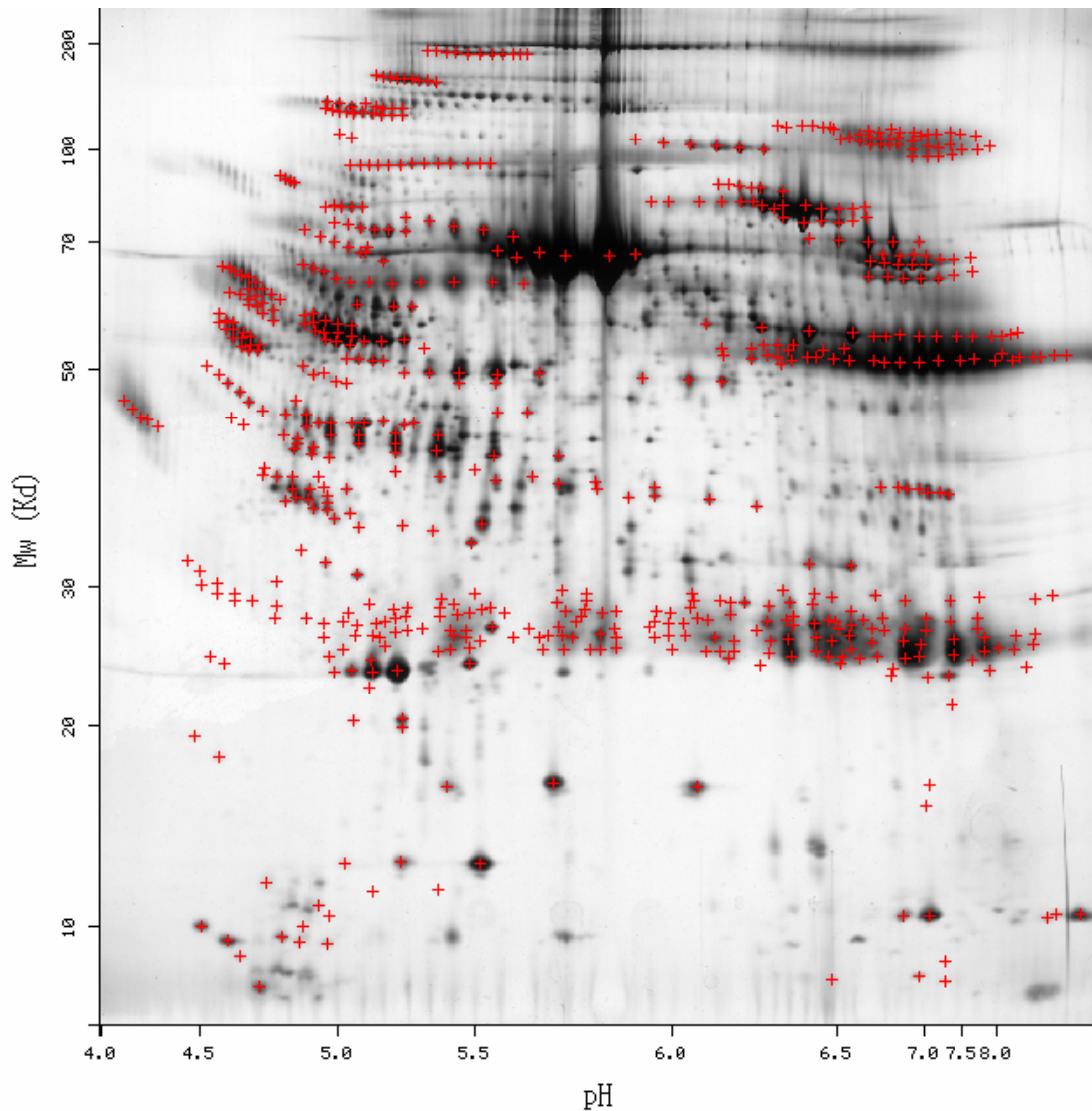


Abbildung 1.26: Trennung und Visualisierung einer humanen Plasmaprobe mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese (2DE). In der ersten Dimension wurde eine isoelektrische Fokussierung mit immobilisierten pH-Gradienten zwischen pH 4,0 und pH 10,0 verwendet. Die zweite Dimension (vertikal) ist eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit einem resultierenden Massenbereich von etwa 8 bis 200 kDa. Die roten Kreuze (+) zeigen Spots, die identifiziert und in der ExPASy-Datenbank eingetragen sind. Quelle: www.expasy.ch

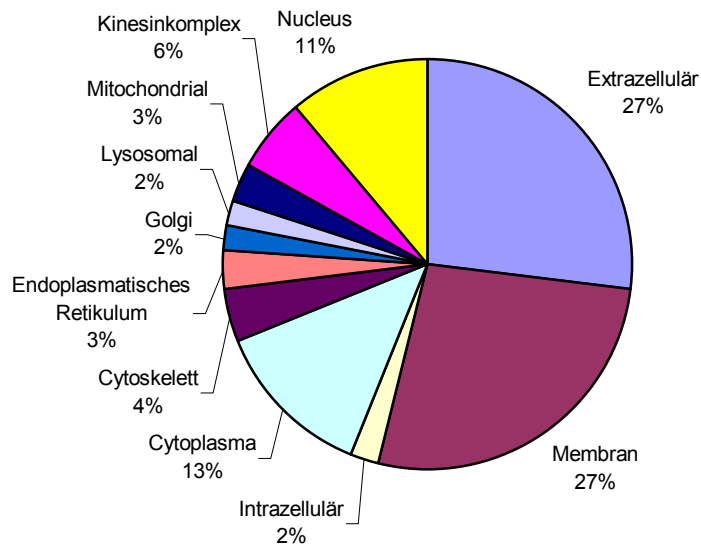


Abbildung 1.27: Zusammensetzung der humanen Plasmaproteine. Verteilung ermittelt aus einer nicht-redundanten Liste verschiedener Proteom-Methoden. Die Liste enthält 195 Proteine, die mittels wenigstens zweier unterschiedlicher Methoden gefunden wurden (Anderson et al. 2004).

1.5 Dialysat – Proteomuntersuchungen

Akutes Nierenversagen, Entgiftung bei Intoxikation mit dialysierbaren Substanzen und terminale Niereninsuffizienz, als Überbrückung bis zu einer Nierentransplantation oder als lebenslange Organersatztherapie. So lauten die Indikationen einer Dialyse. Das bei dieser Therapie anfallende Dialysat ist zwar keine Körperflüssigkeit im eigentlichen Sinne, kann aber als Filtrat des Blutes verstanden werden und wurde deshalb in dieser Arbeit als Untersuchungsmaterial verwendet. Ergänzend kommt hinzu, dass es sich bei Dialysat nicht nur um ein mögliches Probenmaterial zur Beurteilung des Gesundheitszustandes und zur Therapieüberwachung handelt, sondern dass aufgrund der hohen Zahl an durchgeführten Dialysen und der dabei auftretenden Nebenwirkungen ein enormer Bedarf an einer Verbesserung dieser Therapieform besteht.

Der mit Abstand größte Teil aller Dialysen wird durch die chronische Niereninsuffizienz (Nierenversagen) notwendig. Dabei handelt es sich meist um das Endstadium eines langen Leidens, das unweigerlich zum Tod führen würde, wenn es nicht lebensverlängernde Behandlungsmethoden wie die Dialyse und die Nierentransplantation geben würde. Die Niereninsuffizienz ist ein funktioneller klinischer Begriff und wird in vier Stadien eingeteilt (Tabelle 1.28), welche die unzureichende Fähigkeit der Nieren beschreiben, harnpflichtige Substanzen (vor allem die stickstoffhaltigen Endprodukte Harnstoff, Kreatinin, Harnsäure) aus dem Körper auszuscheiden. Die Folge ist eine Zunahme dieser Substanzen im Körper mit einer tödlichen Harnvergiftung (Urämie), wenn diese nicht durch Dialyse (Blutwäsche) oder Nierentransplantation verhindert wird.

Tabelle 1.28 Stadieneinteilung der chronischen Niereninsuffizienz nach Sarre.

Stadium	Klinische Merkmale
I	Eingeschränkte Niereninsuffizienz symptomlos; nur durch Messung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) erfassbar; GFR 70-120 ml/min x 1,73 m ² Körperoberfläche (KOF)
II	Leichte Niereninsuffizienz Anämie, Osteopathie; Kreatinin 1,5-4 mg/dl, GFR 20-70 ml/min x 1,73 m ² KOF
III	Schwere Niereninsuffizienz Anämie, Osteopathie, kompensierte metabolische Azidose, Salz-Wasser-Retention, Polyneuropathie ²² ; Kreatinin 4-7 mg/dl, GFR 5-20 ml/min x 1,73 m ² KOF
IV	Terminale Niereninsuffizienz Urämie, dekompensierte metabolische Azidose; Kreatinin >7 mg/dl, GFR <5 ml/min x 1,73 m ² KOF

Quelle: (Hildebrandt 1998).

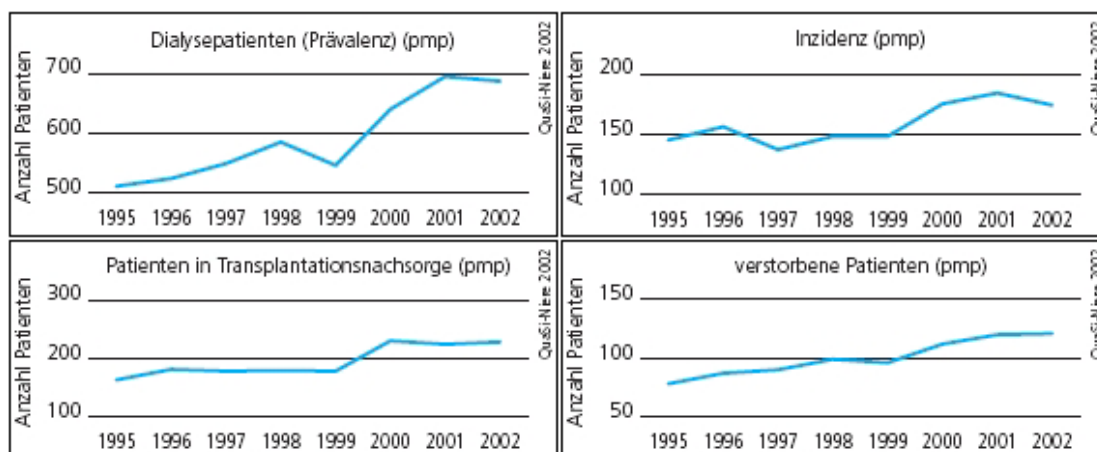
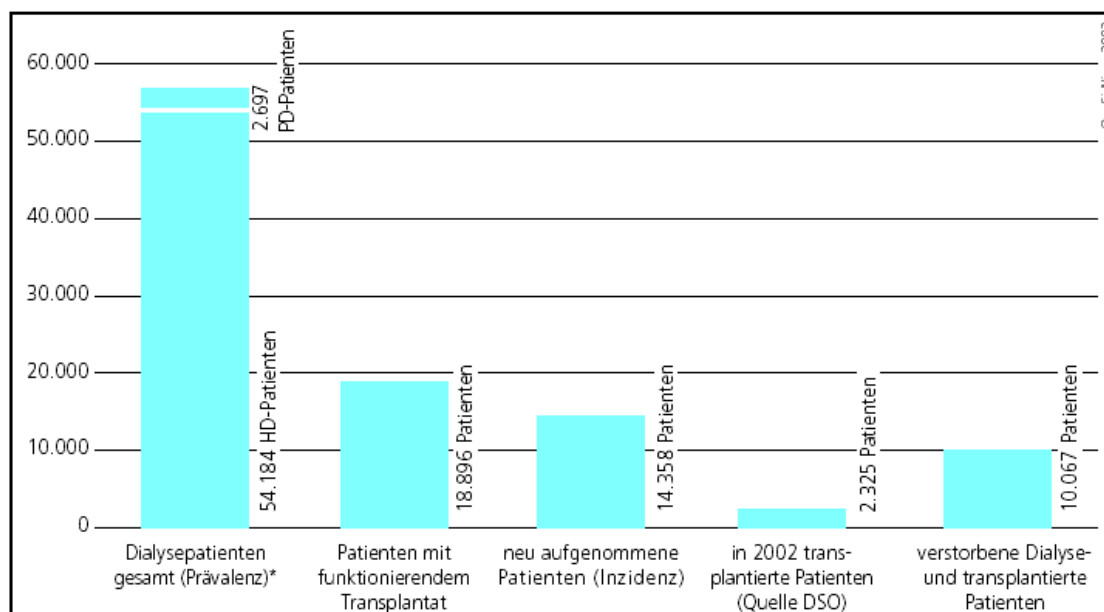


Abbildung 1.29: Übersicht: Chronische Nierenersatztherapie in Deutschland 2002.
Bericht von Quasi Niere gGmbH 2002 (Frei et al. 2003).

In Deutschland sind rund 75.000 chronisch nierenkranke Menschen auf eine regelmäßige und dauerhafte Nierenersatztherapie angewiesen. Jährlich beginnen rund 14.000 neue Patienten eine Dialyse. Diese sind im Durchschnitt 60 Jahre alt und viele von ihnen leiden unter Mehrfacherkrankungen. Im Gegensatz dazu ist die Zahl der zur Verfügung stehenden Spendernieren viel zu gering. 2002 erhielten in Deutschland nach Angaben der Deutschen Stiftung Organtransplantation (DSO) 2.325 Patienten eine Spenderniere, das sind nur rund 5 % der Dialysepatienten. Zum gleichen Zeitpunkt lebten in Deutschland etwa 19.000 Menschen mit funktionierenden Nierentransplantaten. Etwa 770 Patienten kehrten 2002 in die Dialysebehandlung zurück, weil das Transplantat versagte (Frei et al. 2003). Wie Abbildung 1.29 zeigt, nimmt die Prävalenz in den letzten Jahren stetig zu. Die Anzahl zur

Verfügung stehender Transplantate stagniert jedoch. Weiterhin ist die Nierentransplantation auch nur eine Nierenersatztherapie auf Zeit. Die Patienten leiden meist unter einer kompensierten Niereninsuffizienz, schwer einzustellendem Bluthochdruck, Übergewicht, Fettstoffwechselstörungen und Arteriosklerose. Auch die Infektionsabwehr ist durch die Medikamente geschwächt, die die Abstoßung des Transplantates verhindern sollen.

Bei den verwendeten Dialyseverfahren muss grundsätzlich zwischen zwei Varianten unterschieden werden. Die bei weitem gängigste Methode (Tab. 1.30) ist die Hämodialyse, die extrakorporal in einem Dialysator durchgeführt wird. Das Blut wird über eine Blutpumpe in den Filter transportiert. Dort werden die blutführenden Kapillaren von einer Dialyseflüssigkeit (Elektrolyte, Glukose, pH-Puffer, definierte Temperatur) umspült. Als treibende Kraft dient das Konzentrationsgefälle zwischen Blut und der Dialyseflüssigkeit. Der Stoffaustausch ist völlig unselektiv und nur von der molekularen Ausschlussgröße der eingesetzten Membran abhängig.

Um die Leistung der Hämodialyse zu verbessern, existieren einige Verfahrensvarianten. Bei der Hämofiltration wird das Blut über einen Druckgradienten durch einen Filter gepresst. Es gibt keine Dialysierflüssigkeit und die verwendeten Filter haben größere Poren, so dass die verlorene Flüssigkeit ständig durch steriles Dialysat ersetzt werden muss. Die Hämodiafiltration schließlich verbindet Hämofiltration und Hämodialyse, indem beide Verfahren in Kombination nacheinander eingesetzt werden.

Als zweite Variante wird die Peritoneal- oder Bauchfelldialyse durchgeführt. Hierbei werden mehrmals täglich zirka 2 Liter einer sterilen Dialyselösung über einen Katheter in die Bauchhöhle gefüllt. Das Bauchfell, welches die gesamte Bauchhöhle auskleidet, ist eine semipermeable Membran, über welche der Stoffaustausch vorgenommen werden kann. Die Peritonealdialyse hat für den Patienten einige Vorteile, da dieser sie allein und zuhause anwenden kann. Auch ist das Retentionsniveau von Harnstoff, Kalium und Wasserstoff gleich bleibend. Nachteilig sind insbesondere die Ausbildung einer Stoffwechselstörung (verminderte Kohlenhydrattoleranz), sowie ein durch den permanent in der Bauchhöhle liegenden Katheder gesteigertes Infektionsrisiko.

Es gibt keine allgemeingültigen Parameter, welche die Effektivität der Dialyse beschreiben. Als Entscheidungsgrundlage für die Beurteilung der Therapie dient die Klinik: Bei Einschränkungen des Wohlbefindens, der Leistungsfähigkeit, des Appetits

oder bei Auftreten von Juckreiz, Polyneuropathie und anderen Urämiesymptomen sollte die Dialyseeffektivität gesteigert werden (Daugirdas et al. 2001).

Tabelle 1.30: Zusammenfassung: Chronische Nierenersatztherapie in Deutschland

Summe aller Patienten in chronischer Nierenersatztherapie (Stichtag 31.12.2002)	75.777
davon Kinder und Jugendliche	806
Prävalenz (pro Mio. Einwohner)	918
Gesamtzahl der Dialysepatienten	56.881
davon Hämodialyse (alle Verfahren)	54.184
davon Peritonealdialyse	2.697
Neuaufnahme in chronische Nierenersatztherapie	14.358
davon Hämodialyse	13.425
davon Peritonealdialyse	791
davon Kinder und Jugendliche	82
Wiederbeginn der Dialysebehandlung nach Verlust der Transplantatfunktion	770
davon Kinder und Jugendliche	13
Nierentransplantationen	2.325
davon Kinder und Jugendliche	114
Verstorbene Patienten	10.067

Quelle: Bericht von Quasi Niere gGmbH 2002 (Frei et al. 2003).

Laborparameter, die sich zuverlässig vor dem Auftreten jener klinischen Symptomatik verändern, gibt es nicht, da die so genannten urämischen Toxine weitestgehend unbekannt sind. So gelten Kreatinin und Harnstoff als Parameter für urämische Toxine, ohne selbst toxisch zu sein. Die erzielte Clearance von Harnstoff (MW 60) und Kreatinin (MW 113) wird als repräsentativer Parameter für kleine Toxine verwendet, die von Vitamin B 12 (MW 1.355) für große Moleküle und die von β -2-Mikroglobulin (MW 11.800) für sehr große Moleküle. Letzteres gilt als unabhängiger Risikofaktor für die Mortalität von Hämodialysepatienten (Hauk et al. 2000; Kong et al. 1999).

Die Dialysebehandlung ist noch immer eine Therapie mit erheblichen Nebenwirkungen. Der Bluthochdruck, den die meisten Patienten auch während der Dialysebehandlung erleiden, sowie Fettstoffwechselstörungen können zu einer ausgeprägten Arteriosklerose mit ihren typischen Begleiterscheinungen (Herzinfarkt, Schlaganfall, Durchblutungsstörungen, Herzmuskelschwäche) führen.

Abgesehen davon, dass die Lebenserwartung von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ohnehin deutlich verkürzt ist (Robert-Koch-Institut 2000), kann unter Dialyse-Einfluss eine Verschiebung der Todesursachen hin zu kardiovaskulären Ereignissen beobachtet werden (Frei et al. 2003).

In Anbetracht dieser Tatsachen ist ersichtlich, dass die Dialyse als Organersatztherapie heute noch nicht in der Lage ist, die menschliche Niere zu ersetzen. Auf der anderen Seite muss sie aber eingesetzt werden, da die Zahl der chronisch niereninsuffizienten Patienten immer weiter zunimmt und eine andere Therapie nicht vorhanden und auch nicht in Sicht ist. Um so verwunderlicher ist es, dass es kaum Anstrengungen gibt, das Proteom im Dialysat zu untersuchen und mit dem des Urins zu vergleichen, um schließlich die Dialyse als Nierenersatztherapie verbessern zu können.

Eine Erklärung für diese Tatsache ist es sicherlich, dass es bislang keine etablierte Proteomics-Technologie für Polypeptide der in Frage kommenden Molekulargröße gibt. Dialysatoren werden mit Membranen hergestellt, deren Ausschlussgröße im Bereich von höchstens 10 bis 20 kDa liegen. Die menschliche Niere arbeitet zwar nach einem völlig anderen Prinzip, doch lässt auch sie nur kleine Proteine nahezu ungehindert durch, während größere Proteine wesentlich selektiver behandelt werden. Die klassische Methode der Proteomforschung, die zweidimensionale Gelelektrophorese, kommt aber gerade mit diesen kleinen Proteinen nicht zurecht, da die Wechselwirkungen zwischen den verwendeten stationären Phasen und den Proteinen zu klein werden und damit im niedermolekularen Bereich keine akzeptable Auflösung existiert. Diese Diskrepanz zwischen wissenschaftlicher Notwendigkeit und technischer Machbarkeit erklärt, warum es zwar eine Fülle von Arbeiten über einzelne Dialyse-relevante Polypeptide gibt, aber kaum solche, die sich mit dem vollständigen Proteom beschäftigen. Seit der Entdeckung von β -2-Mikroglobulin als Ursache der Dialyse-Arthropathie (Amyloidose AB) (Gejyo et al. 1985), sind niedermolekulare Proteine (low molecular weight proteins) als distinkte Klasse der urämischen Proteine anerkannt. Inzwischen sind einige andere Polypeptide dieser Gruppe als mögliche urämische Toxine identifiziert worden (Cohen et al. 1998; Horl et al. 1990; Ishimitsu et al. 1994; Makita et al. 1994; Sharma et al. 1997).

Bei der Entfernung von niedermolekularen Proteinen aus dem Blut mittels Hämodialyse handelt es sich um eine Kombination aus Dialyse und Konvektion. Ein entscheidender Faktor, welcher die Effektivität der Dialyse beeinflusst, ist die Bildung einer zweiten Membranschicht aufgrund unspezifischer Absorption von Proteinen an die Membranoberfläche (Clark et al. 2002). Dieser Prozess ist nicht zuletzt von den Materialeigenschaften des Dialysators abhängig (Rockel et al. 1986). Die Möglichkeit, einen Vergleich verschiedener Dialysatoren und Membranen auf Ebene des low molecular weight Proteoms durchzuführen, ist daher Grundvoraussetzung für eine Beurteilung der eingesetzten Verfahren.

2. Material und Methoden

2.1 CE – MS – Technik

2.1.1 Kapillarelektrophorese

Die Kapillarelektrophorese wurde an einem P/ACE MDQ (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) mit „External Adapter“ und verlängerten Kühlmittelschläuchen (Beckman Coulter) durchgeführt. Als Kapillare wurde eine unbehandelte Silikatkapillare von 90 cm Länge und einem Innendurchmesser von 75 µm, sowie einem Außendurchmesser von 360 µm verwendet (Polymicro Technologies, Phoenix, USA). Die Kapillare wurde routinemäßig jede Woche gewechselt. Die Konditionierung der Oberfläche erfolgte mit 1 M NaOH (Merck, Darmstadt, Deutschland) für 30 Minuten und anschließendem Spülen mit H₂O (Merck) für 10 Minuten. Als Trennpuffer diente 30 % Methanol (Merck) mit 0,5 % Ameisensäure (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in HPLC-grade Wasser (Merck). Das pH-unterstützte Stacking der Probe wurde durch eine Injektion von zunächst 1 M Ammoniak (Merck) in H₂O und einer nachgeschalteten Injektion von 2 molarer Ameisensäure (Sigma-Aldrich) erzielt (Neususs et al. 2002). Für die Trennung wurde eine Spannung von + 30 kV am Injektionsende angelegt, welche in einem Stromfluss von ca. 10 - 12 µA resultierte. Die Steuerung der Datenaufzeichnung an dem Massenspektrometer erfolgte mittels Kontakt-Trigger. Alle eingesetzten Puffer wurden für maximal fünf Messungen verwendet. Das verwendete Trennprogramm ist in Tabelle 2.1 zusammengefasst.

Neben der genannten Laufpufferzusammensetzung wurden noch Kombinationen mit Acetonitril und Isopropanol, sowie mit Essigsäure (alle Merck), erprobt. Als Kriterien für die Qualität der Laufpufferzusammensetzung dienten die Stabilität des Systems, sowie die Signalintensität.

Kapillarmodifikationen (Coating) wurden durch Belegung der Kapillarinnenseite mit Polyacrylamid (Cifuentes et al. 1999), Aminopropyltrimethoxysilan (Neiman et al. 2002) und Polyvinylalkohol (Belder et al. 2001) erprobt. Polyacrylamid,

Ammoniumpersulfat, Tetramethylethyldiamin, Polyvinylalkohol und 3-Aminopropyltrimethoxysilan wurden von Sigma-Aldrich, Salzsäure und Toluol von Merck bezogen.

Tabelle 2.1: Aufbau des verwendeten CE-Trennprogramms

Nr.	Zeit	Aktion
1	0 min	Spülen der Kapillare mit H ₂ O für 1 min bei 50 psi
2	1 min	Spülen der Kapillare mit Trennpuffer für 3 min bei 30 psi
3	4 min	Injektion Ammoniak für 7 Sekunden bei 1psi
4	4 min	Injektion der Probe für 20 Sekunden bei 1 psi
5	4 min	Injektion Ameisensäure für 7 Sekunden bei 1 psi
6	5 min	Trennung mit Trennpuffer, Spannung +30kV, kein Druck
7	5,5 min	Kontakt 0: MS in Messmodus
8	15 min	Kontakt 1: MS in Datenaufzeichnungsmodus
9	45 min	Stufenweiser Druckaufbau bis 0,5 psi; 0,1 psi / 2 min.
10	75 min	Kontakt 1 aus: Datenaufzeichnung beenden
11	75 min	Kontakt 0 aus: Messmodus beenden
12	75 min	Spannung aus, Druck aus
13	75 min	Spülen mit H ₂ O für 2 min
14	77 min	Trennprogramm Ende

Globale Parameter: Kapillartemperatur 35°C, Probenlagerung 5°C.

* Die angegebene Injektionsdauer von 20 Sekunden wurde wenn notwendig variiert.

2.1.2 Massenspektrometrie

Zur massenspektrometrischen Signaldetektion wurde eine Mariner Biospectrometry Workstation (Perseptive Biosystems, Farmington, USA) verwendet. Die Massenkalkulation erfolgte täglich mit Hilfe des weiter unten beschriebenen Standardgemisches. Ein Tuning der ESI-, Transfer- und TOF-Parameter erfolgte einmal pro Woche unter gleicher Berücksichtigung von Auflösung und Sensitivität.

Die von der CE kommenden Triggersignale wurden zur Steuerung der Datenaufzeichnung und der MS-Methode verwendet. Signal 0 steuerte den Messmodus (open: Nebulizer an, Spray Tip Potential aus; closed: Nebulizer aus, Spray Tip Potential an). Signal 1 steuerte die Datenaufzeichnung (open: data acquisition aus; closed: data acquisition an). Tabelle 2.2 stellt optimierte Messparameter zusammen.

2.1.3 Kopplungstechnik

Die Kopplung zwischen Kapillarelektrophorese und Massenspektrometer erfolgte über ein ESI-MS-Sprayer Kit (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Die

Spannung an der Stahlkapillare wurde durch das Massenspektrometer kontrolliert. Die Stellung der Kapillare und des Sprayers wurden durch die wöchentliche Tuning-Prozedur optimiert. Als Sheath-Flow diente 30 % Methanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) mit 0,5 % Ameisensäure (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in HPLC-grade Wasser (Merck). Der Sheath-Flow wurde über eine 1,0 ml Spritze (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) und die im Mariner integrierte Kolbenspritzenpumpe mit einer Flussrate von 0,5 ml/min zugeführt. Als Nebulizer Gas diente Stickstoff aus hauseigener Versorgung, welches aber nur während der Spülung und der Injektion eingeschaltet war. Während der Trennung und Datenaufzeichnung wurde das Nebulizer Gas automatisch ausgeschaltet.

Tabelle 2.2: Zusammenstellung optimierter MS-Parameter (ABI Mariner).

<u>Mariner System State</u>			
Ion Polarity	positiv	Auxillary Gas	off
Curtain Gas	on	Nebulizer Gas	off (1)
<u>Source Settings</u>			
Spray Tip Potential	3.300 V (2)		
<u>API Interface Settings</u>			
Nozzle Potential	220 V	Skimmer 1 Potential	9,0 V
Quadrupole DC Potential	7,0 V	Deflection Voltage	0,1 V
Einzel Lens Potential	-37,5 V	Quadrupole RF Voltage	880 V
Quadrupole Temperature	140 °C	Nozzle Temperature	150 °C
<u>Analyzer Settings</u>			
Push Pulse Potential	510 V	Pull Pulse Potential	175 V
Pull Bias Potential	1,0 V	Acceleration Potential	4.000 V
Reflector Potential	1.550 V	Detector Voltage	2.140 V (3)
<u>Spectrum Acquisition Settings</u>			
Seconds per Spectrum	3,0	Ion Count Treshold	0,0
First Mass	400,0	Last Mass	2.500,0
Accumulate Spectra	off	Standby at End of Acq.	off

Anmerkungen: Mittels zweier Kontakt-Trigger wurden die MS-Methode, sowie die Datenaufzeichnung durch das CE-Programm gesteuert. Die MS-Methode wechselte dabei zwischen einem Messmodus und einem Spül- und Injektionsmodus. Die angegebenen Daten beziehen sich auf den Messmodus. Änderungen im Spül-Modus waren: (1) Nebulizer Gas: on, (2) Spray Tip Potential: off. (3) Die Detektorspannung wurde in Abhängigkeit der Signale der Standardmischung angepasst.

2.1.4 MALDI MS/MS – Untersuchungen

Zwecks Identifizierung einzelner Proteine wurden die Trennungen wie oben beschrieben innerhalb der Kapillarelektrophorese durchgeführt. Am MS-seitigen Ende der Kapillare wurde der gesamte Lauf in Schritten zu 15 Sekunden mit Hilfe

eines ProBot-Spotters (LC packings / Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA) auf ein AnchorChip Target (Bruker Daltronik, Bremen, Deutschland) gespottet. Sheath-Flow war 1 mg/ml alpha-Cyano-Zimtsäure in 50 % Acetonitril und 0,5 % Ameisensäure (alle Chemikalien von Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland).

Anschließend wurden die Spots mit einer 6:3:1 Mischung aus Ethanol : Aceton : 0,1 % Trifluoressigsäure umkristallisiert.

In einer ersten Messung wurden die MALDI Targets an einem Utraflex TOF/TOF (Bruker Daltronics) zunächst im MS-Mode (Reflektormode, 25 kV Beschleunigungsspannung) vermessen. Die gesuchten Massen wurden anschließend innerhalb der Spots lokalisiert und diese dann im Laufe einer zweiten Messung im „LIFT-Mode“ fragmentiert (PSD oder CID). Die erzeugten Fragmentspektren wurden schließlich mittels Datenbanksoftware (Mascot, Matrix Science, London, Großbritannien) mit den in dort vorhandenen Proteinen abgeglichen und soweit möglich identifiziert.

2.1.5 Zusammensetzung der Standardlösung

Zur Entwicklung, Etablierung und regelmäßigen Kontrolle wurde ein Gemisch aus 3 Proteinen und 4 Polypeptiden erstellt. Die Zusammensetzung der Standardlösung ist in Tabelle 2.3 aufgeführt.

Die eingesetzten Peptide und Proteine wurden in Stammlösungen von jeweils 10 mg/ml angesetzt und in Chargen zu 1 ml und einer Konzentration von jeweils 10 pmol/ μ l zusammen pipettiert. Der Standardansatz wurde anschließend zu jeweils 50 μ l aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Anschließend wurden die Aliquots in einer Christ RVC 2-18 / Alpha 1-2 (Christ, Osterode, Deutschland) Gefriertrocknungsanlage mit einer RZ 5 Vakuumpumpe (Vauubrand, Wertheim, Deutschland) lyophilisiert. Die Standardlösungen wurden bis zur Verwendung bei +4°C im Dunkeln gelagert.

Die Resuspendierung der Standards erfolgte unmittelbar vor der Verwendung in je 50 μ l H₂O (LiChrosolv, Merck, Darmstadt, Deutschland). Die resuspendierte Standardlösung wurde nach spätestens 24 Stunden verworfen.

Tabelle 2.3: Zusammensetzung der Standardlösung

<u>Protein / Peptid</u>	<u>Lösungsmittel</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Masse</u> (monoisotopisch)	<u>Pipettier-</u> <u>volumen</u> (aus 10 mg/ml)
Lysozym	H ₂ O	Sigma- Aldrich, L7651	14.303 Da	14,30 µl
Ribonuclease	H ₂ O	Sigma- Aldrich, R4875	13.681 Da	13,68 µl
Aprotinin	H ₂ O	Sigma- Aldrich, A1153	6.513 Da	6,51 µl
REV (REVQSKIGYGRQIIS)	DMSO	-	1.733 Da	1,73 µl
KINCON (TGSLPYSHIGSRDQIIFMVG R)	DMSO	-	2.333 Da	2,33 µl
ELM (ELMTGELPYSHINNRDQIIF MVGR)	DMSO	-	2.832 Da	2,83 µl
GIVLY (GIVLYELMTGELPYSHIN)	DMSO	-	2.048 Da	2,05 µl
H ₂ O, LiChrosolv		Merck		
Verwendetes Wasser: Merck LiChrosolv (Merck Darmstadt, Deutschland)				
Verwendetes DMSO: Dimethylsulfoxid, ACS Reagenz (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)				

2.2 Datenaufzeichnung und –prozessierung

2.2.1 Datenaufzeichnung

Die Datenaufzeichnung erfolgte mittels der Gerätesoftware „Mariner Control Panel Version 4“ (Perseptive Biosystems, Farmington, USA) über einen Messbereich von 400 bis 2.500 Masse / Ladung. Die Spektrenakkumulationszeit betrug 3 Sekunden pro Spektrum. Aufgezeichnet wurden der vollständige Trennlauf ab Minute 10 der Trennung bis zum Ende. Die so erzeugten Rohdaten-Files hatten eine Größe von etwa 100 bis 500 Megabytes pro Messung und wurden automatisiert auf ein Serversystem verschoben. Die Rohdaten-Files wurden in weiterer Folge nicht mehr verändert.

2.2.2 Auswertung der Messungen

Die Auswertungen der einzelnen Messungen (Rohdaten), sowie die dreidimensionale Visualisierung erfolgte mit Hilfe des Programms *mosaiquesVisu* (*biomosaiques software*, Hannover, Deutschland), welches parallel zu dieser Arbeit entwickelt wurde. Anhand der dreidimensionalen Darstellung erfolgte zunächst eine erste Überprüfung des Messergebnisses (Spray-Einbrüche, Kapillarverstopfungen, etc.). Danach wurden die Spektren ausgewertet und die Massen dekonvolviert. Das Programm verwendet sowohl eine Isotopenerkennung, wie auch eine Erkennung konjugierter Massen zur Berechnung der Polypeptidmassen. Die CE-Zeiten wurden automatisch anhand einer zuvor erstellten Referenzliste normiert. Aus der resultierenden Polypeptidliste wurden alle Einträge herausgefiltert, die nur im Ladungszustand $z=1$ gefunden werden konnten oder eine Masse von weniger als 800 Da aufwiesen. Die so ermittelten Polypeptidlisten wurden für jede Messung zur weiteren Bearbeitung als Textfile abgespeichert.

2.2.3 Datenbanken und nachfolgende Bearbeitung

Die durch die Auswertung der Messungen erzielten Polypeptidlisten wurden für jede Studie in eigens entwickelte Datenbanken auf Grundlage der Software *Microsoft Access* (Microsoft, Redmond, WA, USA) abgespeichert. Nach dem Import der Daten (Proben-Identifizierung, Messungs-Identifizierung, Polypeptid-Masse, CE-Migrationszeit, Amplitude) wurden identische Polypeptide zwischen den einzelnen Messungen gesucht und diesen ein Identifizierungsschlüssel zugewiesen. Polypeptide wurden dann als identisch eingestuft, wenn die Massenabweichung 0,05 % und die Abweichung der CE-Migrationszeit 5 Minuten nicht überstieg.

Nach erfolgreichem Abgleich der Messungen in der Datenbank und der Zuordnung von Identifizierungsschlüsseln zu den Polypeptiden erfolgte entweder ein Export der vollständigen Daten in andere Programme oder ein Import der gesamten Datenmenge in die Software *Excel* (Microsoft) zur weiteren Auswertung.

2.3 Proben

2.3.1 Urinproben zur Untersuchung der diabetischen Nephropathie

Urinproben wurden in verschiedenen Arztpraxen im Raum Hannover mit Schwerpunkt Diabetologie mit Einverständnis der Patienten gesammelt. Es wurde Spontanurin von Patienten mit eindeutig diagnostiziertem Diabetes des Typs I oder II nach Verwerfen des ersten Urindrittels aufgefangen und sofort bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren. Neben dem Alter und dem Geschlecht der Patienten wurden wichtige Vorerkrankungen, sowie der aktuelle Blutdruck, Größe und Gewicht bestimmt. Patienten mit dekompensierten Herzerkrankungen oder chronischen Entzündungskrankheiten wurden nicht eingeschlossen. Der Altersdurchschnitt der Diabetiker des Typs II betrug 62 Jahre. Alle hatten seit mindestens 3 Jahren diagnostizierte Diabetes mellitus. Der Altersdurchschnitt der Typ I Patienten betrug 15 Jahre.

Parallel zur Probenpräparation wurden aus Aliquots der Probe photometrisch der Gesamtproteingehalt mittels Uptima BCA-Assay (Interchim, Montluçon, Frankreich) und die Kreatinin-Konzentration durch Creatinin Merckotest (Merck, Darmstadt, Deutschland) nach den jeweiligen Anweisungen der Hersteller bestimmt. Die Messungen erfolgten in Plastibrand halbmikro Einmalküvetten (Brand, Wertheim, Deutschland) in einem Jenway Genova Photometer (Jenway, Felsted, Dunmow, Essex, Großbritannien). Der pH-Wert, Glukose, Leukozyten, Eiweiß, Ketone, Urobilinogen, Bilirubin, Blut und Haemoglobin in der Probe wurden semiquantitativ mittels Combur-9 Teststreifen (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) überprüft. Proben mit anormalen Werten wurden ausgeschlossen.

Zur Kompensation der Varianz des Proteingehaltes in Spontanurinproben, wurde die gemessene Albuminkonzentration (Gesamtprotein) auf die Kreatinin-Konzentration normiert (Albumin/Kreatinin-Wert). Für die folgende Proteomuster-Identifizierung wurden die Urinproben in Gruppen unterschiedlicher Nierenschädigungsstufen je nach Albumin zu Kreatinin Quotienten eingeteilt.

Weiterhin wurden 23 Proben (24-Stunden-Sammelurin) von Patienten mit klinisch manifestierter diabetischer Nephropathie und stark erhöhter Proteinausscheidung eingesetzt.

2.3.2 Urinproben anderer Nierenerkrankungen

Zehn Urinproben von Patienten mit fokal-segmentaler Glomerulosklerose (FSGS), 18 Urinproben von Patienten mit membranöser Glomerulopathie (MNGN) und 15 Urinproben von Patienten mit Minimal-changes-Glomerulopathie (MCD) wurden in der Medizinischen Hochschule Hannover, Abteilung Nephrologie mit Einverständnis der Patienten gesammelt. Alle nephrologischen Diagnosen beruhten auf Biopsien. Die Proben wurden sofort nach Erhalt bei -20°C eingefroren und erst kurz vor der Präparation aufgetaut.

2.3.3 Urinproben von Kontrollpatienten

Urinproben (Spontanurin) gesunder Probanden wurden nach Aufklärung und erfolgtem Einverständnis der Spender durch den betriebsärztlichen Dienst der Medizinischen Hochschule Hannover gesammelt. Es wurden nur die Proben solcher Probanden verwendet, bei denen keine gesundheitlichen Einschränkungen oder eine Schwangerschaft festgestellt werden konnte. Der Altersdurchschnitt der Spender lag bei 34,0 Jahren.

Die Proben wurden sofort nach Erhalt bei -20°C eingefroren und erst kurz vor der Probenpräparation aufgetaut.

Spontanurinproben als Kontrollproben für Diabetes des Typs I wurden durch das Kinderkrankenhaus „Auf der Bult“, Hannover, gesammelt und sofort bei -20°C eingefroren. Der Altersdurchschnitt der Spender lag bei 14,1 Jahren.

2.3.4 Urinproben von Patienten nach Stammzelltransplantation

Urinproben (Spontanurin) von 40 Patienten wurden bis zum Tag 100 nach der Transplantation an der Medizinischen Hochschule Hannover, der Universität Regensburg und der Universität München gesammelt. 35 der Patienten (26 AML, 4 ALL, 1 CML, 1 NHL, 1 MDS, 1 Lymphom, 1 multiples Myelom) wurden allogene und 5 weitere (1 AML, 2 multiple Myelome, 1 MDS) autolog transplantiert. Die Urinproben wurden vor der Konditionierung und im folgenden soweit möglich zwei Mal pro Woche gesammelt und sofort bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C eingefroren.

Die Konditionierung erfolgte unterschiedlich mit klassischer Dosis oder dosisreduziert.

2.3.5 Dialysatproben

Proben von Dialysaten wurden bei der Behandlung von Patienten an zwei verschiedenen Dialysemembranen (high-flux und low-flux) in der Abteilung Nephrologie der Medizinischen Hochschule Hannover gewonnen. Die Probennahme erfolgte nach Abschluss der Behandlung aus dem zuvor gut gemischten Gesamtdialysat. Die entnommenen Aliquots wurden sofort bei -20°C eingefroren.

2.3.6 Plasmaproben

Plasmaproben von Dialysepatienten wurden nach der Dialysebehandlung gewonnen. Zur Vermeidung der Koagulation wurden die Patienten während der Dialyse mit Heparin behandelt. Dreizehn der untersuchten Spender hatten keine und vierzehn eine positiv diagnostizierte Arteriosklerose. Die korpuskulären Blutbestandteile wurden abzentrifugiert und die Überstände sofort bei -20°C eingefroren.

2.4 Probenpräparation

2.4.1 Präparation von Urinproben

Urinproben wurden unmittelbar vor der Präparation bei Raumtemperatur aufgetaut, gut gemischt und bei $13.000 \times g$ und 4°C für 10 Minuten in einer Hereaus Biofuge (Kendro, Osterode, Deutschland) abzentrifugiert. Zwei Milliliter des Überstandes wurden auf eine 2,8 ml Amprep Ethyl C2 Säule appliziert (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, Großbritannien), die zuvor nach Herstellerangaben konditioniert worden war. Nach Waschen der Säule mit 0,5 % Ameisensäure (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in HPLC-grade Wasser (Roth, Karlsruhe,

Deutschland) wurden die Polypeptide mit Hilfe von 50 % Acetonitril (Sigma-Aldrich) und 0,5 % Ameisensäure in 49,5 % HPLC-grade Wasser eluiert.

Die Eluate wurden über Nacht in einer Christ RVC 2-18 / Alpha 1-2 (Christ, Osterode, Deutschland) Gefriertrocknungsanlage mit einer RZ 5 Vakuumpumpe (Vaubrand, Wertheim, Deutschland) lyophilisiert. Die getrockneten Proben wurden bis zur Messung bei +4°C im Dunkeln gelagert.

2.4.2 Präparation von Dialysatproben

Dialysatproben wurden unmittelbar vor der Präparation bei Raumtemperatur aufgetaut. Aliquots von 2 ml wurden durch Zugabe von 25 %igem Ammoniak (Merck, Darmstadt, Deutschland) auf pH 10 eingestellt und für 10 Minuten bei 13.000 x g und 4°C in einer Hereaus Biofuge (Kendro, Osterode, Deutschland) zentrifugiert. Der Überstand wurde auf 0,2 ml Bettvolumen DEAE-Sepharose FF (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, Großbritannien) in einer 1 ml Einwegsäule (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) aufgetragen. Equilibration des Materials erfolgte mit 20 Bettvolumina und das Waschen mit 10 Bettvolumina 1 %igem Ammoniaks (v/v). Die Elution erfolgte mit 1 % Ameisensäure (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) und 30 % Methanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) in HPLC-grade Wasser (Roth, Karlsruhe, Deutschland). Die Eluate wurden über Nacht in einer Christ RVC 2-18 / Alpha 1-2 (Christ, Osterode, Deutschland) Gefriertrocknungsanlage mit einer RZ 5 Vakuumpumpe (Vaubrand, Wertheim, Deutschland) lyophilisiert. Die getrockneten Proben wurden bis zur Messung bei +4°C im Dunkeln gelagert.

2.4.3 Präparation von Plasmaproben

Plasmaproben wurden unmittelbar vor der Präparation bei Raumtemperatur aufgetaut. Aliquots von 500 µl wurden mit 2 ml einer Lösung aus 4 M Harnstoff (Merck, Darmstadt, Deutschland), 0,1 M NaCl (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) und 0,0125 % Ammoniak (Merck, Darmstadt, Deutschland) in HPLC-grade Wasser (Roth, Karlsruhe, Deutschland) verdünnt. Die Probe wurde in einer Hereaus Megafuge (Kendro, Osterode, Deutschland) bei 4°C und 3.000 x g durch eine Centrisart I (Sartorius, Göttingen, Deutschland) Ultrafiltrationseinheit zentrifugiert, bis 2 ml Filtratvolumen den Filter passiert hatten. Die molekulare Ausschlussgröße der Ultrafiltrationseinheit betrug 20.000 Dalton.

Das Filtrat wurde anschließend auf eine 2,8 ml Amprep Ethyl C2 Säule appliziert (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, Großbritannien), die zuvor nach Herstellerangaben konditioniert worden war. Nach Waschen der Säule mit 0,5 % Ameisensäure (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in HPLC-grade Wasser (Roth, Karlsruhe, Deutschland) wurden die Polypeptide mit Hilfe von 50 % Acetonitril (Sigma-Aldrich) und 0,5 % Ameisensäure in 49,5 % HPLC-grade Wasser eluiert.

Die Eluate wurden über Nacht in einer Christ RVC 2-18 / Alpha 1-2 (Christ, Osterode, Deutschland) Gefriertrocknungsanlage mit einer RZ 5 Vakuumpumpe (Vaubrand, Wertheim, Deutschland) lyophilisiert. Die getrockneten Proben wurden bis zur Messung bei +4°C im Dunkeln gelagert.

2.5 Proteom-Muster-Generierung und –Auswertung

2.5.1 Diabetische Nephropathie und andere Nierenerkrankungen

Zur Definition der Proteommuster für „Nephritis“, „diabetische Nephropathie“, „FSGS“, „MNGN“, „MCD“, „Diabetes Typ I“, „Diabetes Typ II“, sowie der benötigten differentialdiagnostischen Proteommuster wurden die Ergebnisse der Messungen von 439 Urinproben in einer Datenbank zusammengefasst (Tabelle 2.4). Insgesamt wurden dabei 516.341 detektierte Polypeptide betrachtet und zu 13.289 verschiedenen Polypeptiden abgeglichen.

Tabelle 2.4: Zusammenstellung der Datenbank zur Proteomanalytik von Nierenerkrankungen

<u>Gruppe</u>	<u>Kriterium</u>	<u>Anzahl</u>
Kontrolle	Gesunde Probanden / Erwachsene	85
Kontrolle/Kinder	Gesunde Probanden / Kinder	9
D1P0	Typ-I-Diabetiker mit normalen Albumin/Kreatinin-Werten (<30 µg/mg)	28
D1P1	Typ-I-Diabetiker mit erhöhten Albumin/Kreatinin-Werten (30-100 µg/mg)	11
D1P2	Typ-I-Diabetiker mit stark erhöhten Albumin/Kreatinin-Werten (>100 µg/mg)	2
D2P0	Typ-II-Diabetiker mit normalen Albumin/Kreatinin-Werten (<30 µg/mg)	202
D2P1	Typ-II-Diabetiker mit erhöhten Albumin/Kreatinin-Werten (30-100 µg/mg)	13
D2P2	Typ-II-Diabetiker mit stark erhöhten Albumin/Kreatinin-Werten (>100 µg/mg)	22
D2P3	Typ-II-Diabetiker mit nachgewiesener Nephropathie (24h-Urin)	23
FSGS	Biopsie nachgewiesene FSGS	10
MNGN	Biopsie nachgewiesene MNGN	18
MCD	Biopsie nachgewiesene MCD	15

Die abgeglichenen Muster wurden anschließend in eine Microsoft Excel Tabelle importiert, in der die Frequenz mit der ein bestimmtes Polypeptid innerhalb einer Gruppe vorhanden ist, sowie die mittlere Amplitude dieses Polypeptides berechnet wurden.

Als erster Datenreduktionsschritt wurden alle Polypeptide entfernt, die in keiner der betrachteten Gruppen nicht mit einer Frequenz von wenigstens 50 % vorgekommen sind. Dabei ist lediglich die Gruppe „D1P2“ aufgrund der besonders geringen Fallzahl nicht eingeschlossen worden. Nach diesem Datenreduktionsschritt verblieben 1.741 verschiedene Polypeptide, die näher darauf untersucht wurden, ob sie deutliche Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen zeigen. Als Unterschied wurde eine möglichst deutliche Veränderung in der Frequenz zwischen den Gruppen „krank“ und „gesund“ im Sinne des untersuchten Musters oder eine deutliche Veränderung der mittleren Amplitude (>10fach erhöht) betrachtet. Tabelle 2.5 zeigt die für die Findung der einzelnen Muster betrachteten Gruppen und ihrer jeweilige Zuordnung zu der „krank“ (+) oder „gesund“ (-) Kategorie.

Tabelle 2.5: Einteilung der Kategorien zur Proteomanalyse von Nephropathien.

<u>Proteommuster</u>	D1	D2	N	D2N	D2N diff	FSG	FSG diff	MNG	MNG diff	MCD	MCD diff
<u>Gruppe</u>											
Kontrolle		-	-	-		-		-		-	
Kontrolle/Kinder	-		-								
D1P0	+										
D1P1	+										
D1P2	+		+								
D2P0		+									
D2P1		+									
D2P2		+	+	+	+		-		-		-
D2P3		+	+	+	+		-		-		-
FSGS			+		-	+	+		-		-
MNGN			+		-		-	+	+		-
MCD			+		-		-		-	+	+

Untersuchte Proteommuster: Diabetes Typ-I (D1), Diabetes Typ-II (D2), Nephritis allgemein (N), diabetische Nephropathie (D2N), diabetische Nephropathie differentiell (D2N diff), FSGS (FSG), FSGS differentiell (FSG diff), MNGN (MNG, MNGN differentiell (MNG), MCD (MCD) und MCD differentiell (MCD diff).

Polypeptide, die als diskriminierende Marker zwischen zwei Kategorien ausgewählt wurden, wurden mit einem Faktor bewertet, der die Trennfähigkeit bewertet. Dieser wurde berechnet nach:

$$F_{\text{Diskriminierung}} = f(\text{krank}) - f(\text{gesund})$$

wobei f die Frequenz angibt, mit der das jeweilige Polypeptid in der betrachteten Kategorie aufgetreten ist. Wurde ein Polypeptid aufgrund eines Amplitudenunterschiedes ausgewählt, so wurde der Faktor F auf 0,5 bzw. -0,5 festgelegt.

Zur Überprüfung der ausgewählten Marker wurde ein einfacher Mustererkennungs-Algorithmus verwendet. Dazu wurden die Polypeptide in einzelnen Proben gesucht und deren Diskriminierungsfaktoren aufsummiert. Wurde ein Polypeptid gefunden, so wurde der zugehörige Faktor addiert, wurde ein Polypeptid nicht gefunden, so wurde der Faktor subtrahiert. Das Ergebnis wurde als prozentuale Übereinstimmung mit dem möglichen Referenzbereich angegeben.

Die diagnostische Sensitivität wurde berechnet nach:

$$\text{Sensitivität} = \text{Zahl der richtig positiven Diagnosen} / \text{Zahl der Kranken},$$

und die diagnostische Spezifität nach:

$$\text{Spezifität} = \text{Zahl der richtig negativen Diagnosen} / \text{Zahl der Gesunden}.$$

2.5.2 Nachweis von Arteriosklerose in Plasma

Die Ergebnisse von insgesamt 27 gemessenen Plasmaproben sind in einer Datenbank miteinander verglichen worden. 14 der Proben stammten von Patienten, bei denen eine Arteriosklerose positiv diagnostiziert worden war, die anderen 13 wurden in dieser Beziehung als gesund (Kontrollen) betrachtet.

Polypeptide wurden danach ausgewählt, ob sie häufiger in den Proben der Erkrankten, der Kontrollen oder in beiden Gruppen gleich regelmäßig gefunden werden konnten. Die mittlere Amplitude wurde nur sekundär betrachtet um das Ergebnis zu verifizieren.

2.5.3 Vergleich verschiedener Dialysate

Die Ergebnisse aus 15 Analysen von Proben einer low-flux Dialyse und aus 8 Analysen von Proben einer high-flux Dialyse wurden ausgewertet. Die gefundenen Polypeptide wurden nur aufgrund ihrer Frequenz in den beiden betrachteten Gruppen charakterisiert, da ein Vergleich der Amplituden aufgrund technischer und klinischer Verfahrensparameter zu unsicher erschien. Die abgeglichenen Polypeptide wurden als „HF-typisch“ klassifiziert, wenn $f(\text{HF}) > 0,5$ und $f(\text{LF}) < 0,5$, als „LF-typisch“, wenn $f(\text{HF}) < 0,5$ und $f(\text{LF}) > 0,5$, als „common“, wenn $f(\text{HF}) > 0,5$ und $f(\text{LF}) > 0,5$ und sonst als „unspezifisch“.

2.5.4 Zeitlicher Verlauf von GvH Reaktionen

In einer Datenbank wurden alle Proben von Patienten mit diagnostizierter GvHD zusammengefasst, die am oder höchstens 10 Tage nach dem Zeitpunkt der Diagnose gewonnen worden waren. Zusätzlich wurden zufällig ausgewählte Proben von Patienten ohne Komplikationen als Kontrollgruppe in gleicher Größe verwendet. Die Definition des Proteom-Musters erfolgte mit Hilfe der Software *MosaCluster* (biomosaiques software, Hannover, Deutschland), die Support Vektor Machines (SVM) zur Klassifizierung verwendet. Die Kontrolle des gefundenen Musters erfolgte durch vollständige Kreuzvalidierung. Anschließend wurden die definierten Marker auf ihre Veränderung im zeitlichen Verlauf der untersuchten Proben von Patienten mit und ohne diagnostizierter GvHD untersucht.

3. Ergebnisse

3.1 CE – MS – Technik

3.1.1 Aufbau und Etablierung eines Kapillarelektrophorese – Elektrospray – Time-Of-Flight-Massenspektrometrie – Systems

Für die online-Kopplung von Kapillarelektrophorese und Massenspektrometer konnte im Rahmen dieser Arbeit ein System etabliert werden, welches die kontinuierliche Bearbeitung von bis zu 20 Proben ohne Unterbrechung zulässt. Die Anzahl der Messungen ohne Benutzereingriff wird nur durch die verfügbare Anzahl an Pufferplätzen in der CE, sowie durch das vorhandene Volumen an Sheath-Flow begrenzt.

Als grundlegende Voraussetzung stand zunächst nur fest, dass die Lösung über eine CE – ESI – TOF – Kombination gefunden werden sollte. Daneben wurde zunächst eine hohe Sensitivität angestrebt, was aber im weiteren Verlauf dadurch relativiert wurde, dass das System eine möglichst gute Robustheit auch bei unterschiedlichsten Probeneigenschaften aufweisen sollte.

Da das Ziel in der Erfassung des vollständigen Proteoms der Proben lag, musste die Proteintrennung in einem Puffersystem mit extremem pH-Wert erfolgen, um alle Analyten mit einer gleichgerichteten Nettoladung zu versehen und Wanderung in die Gegenrichtung, wie auch Präzipitation am isoelektrischen Punkt zu verhindern. Gleichzeitig musste aufgrund der online-Kopplung zum Massenspektrometer auf Salze und Detergenzien weitestgehend verzichtet werden. Aus diesen Überlegungen heraus wurde eine einfache Zusammensetzung der mobilen Phase im Bereich von pH 2 entwickelt und optimiert. Der Einsatz eines Trennsystems im basischen pH-Bereich unter Verwendung eines Ammoniumacetat-Puffers (pH 10) führte zu keinem Erfolg, da die Ionisierungseffizienz im dadurch notwendigen Negativ-Ionen-Modus deutlich schlechter gewesen ist. Der Versuch, den pH-Wert des Puffers mit Hilfe eines stark sauren Sheath-Flows zu modifizieren und damit die Nettoladung der Analyten in den positiven Bereich zu verschieben war ebenfalls nicht erfolgreich.

Vermutlich liegt dies darin begründet, dass die Zeit bis zur Evaporation für eine vollständige Durchmischung der Flüssigkeiten nicht ausreicht.

Bei der Verwendung eines Trennsystems mit einem pH-Wert um etwa 2 kann davon ausgegangen werden, dass alle in der Probe vorhandenen Polypeptide eine negative Nettoladung aufweisen. Die CE-seitige, bzw. injektionsseitige Elektrode muss daher als Anode betrieben werden, während das MS-seitige Ende als Kathode dient.

Als Grundkomponenten für den Trennpuffer wurden unterschiedliche Kombinationen aus Wasser, Methanol, Isopropanol und Acetonitril verwendet, während die Einstellung des pH-Wertes mittels Ameisensäure und Essigsäure erfolgte.

Die besten Erfolge konnten mit einem Gemisch von 30 % Methanol in H₂O und 0,5 % Ameisensäure erzielt werden. Der Einsatz von Acetonitril erbrachte keinerlei Vorteile, so dass darauf verzichtet wurde. Die Zugabe von Isopropanol im Sheath-Flow konnte zwar die Ionisierungseffizienz etwas steigern, das Elektrospray wurde aber instabiler. Ähnlich verhielt es sich bei einer Variation des Methanol-Anteils im Laufmittel. Ein Anteil von etwa 20 % zeigte sich als notwendiges Minimum zur Erzielung einer zufrieden stellenden Ionisierungseffizienz. Mit einem höheren Anteil verdampft das Lösungsmittel bei der Ionisierung deutlich schneller, so dass das Spray instabiler wird. Ein Anteil von mehr als 50 % erbrachte keine Verbesserung mehr.

Der bei 0,5 %iger Ameisensäure vorliegende pH-Wert von ca. 2,2 reicht aus, um die vorhandenen Polypeptide mit einem Überschuss an positiver Ladung zu versehen und damit zur Kathode (ESI-Interface) wandern zu lassen. Gleichzeitig ist der pH-Wert auch niedrig genug, um die Silikat-Schicht der Kapillare, deren pK_a-Wert bei 6 bis 7 liegt, nach $-\text{SiO}^- + \text{H}^+ \rightleftharpoons -\text{SiOH}$ mit positiver Ladung abzusättigen und den elektroosmotischen Effekt so zu unterdrücken. Der Einsatz von Ameisensäure ist gegenüber dem von Essigsäure vorzuziehen, da letztere bei gleichem pH-Wert in einer höheren Molarität vorliegen muss. Dies resultiert bei gleicher Trennungsspannung in einem deutlich größeren Strom. Da sich aber zeigte, dass der Strom zur Aufrechterhaltung eines stabilen Sprays auf unter 20 µA begrenzt werden musste (andernfalls verbrannte das Lösungsmittel bei der Ionisierung), wäre bei der Verwendung von Essigsäure nur eine geringere Spannung möglich.

Um die Trenneigenschaften des verwendeten Systems zu verbessern, wurden verschiedene Modifikationen der Kapillare untersucht, die durch eine Kontrolle des EOFs zu einer Erhöhung der theoretischen Böden beitragen sollten. Sowohl durch ein Coating mit Polyvinylalkohol (Belder et al. 2001), mit Polyacrylamid (Cifuentes et al. 1999; Strege et al. 1993), wie auch mit Aminopropyltrimethoxysilan (Neiman et al.

2002) konnte diese Zielsetzung auch kurzfristig erreicht werden. Es zeigten sich aber bereits vom ersten Lauf an Signale im Massenspektrometer, die durch eine Elution der verwendeten Materialien hervorgerufen wurden. Nach wenigen Proben nahmen die Peakbreiten wieder deutlich zu. Die untersuchten Coatings zeigten alle eine zu geringe Stabilität, um der geforderten Robustheit des Systems zur Messung vieler Proben gerecht zu werden.

Der größte Einfluss auf die Sensitivität des Systems konnte durch die Optimierung der Spray- und Massenspektrometer-Parameter erreicht werden. Der verwendete Sheath-Flow-Volumenstrom wurde so gering wie möglich gehalten, so dass das Spray eben noch stabil war. Die Parameter der Spray-, Interface- und TOF-Bereiche wurden jeweils sowohl im Hinblick auf Sensitivität, wie auch auf Auflösung optimiert, bis die in Tabelle 2.2 genannten Einstellungen vorlagen.

Das verwendete System ist in Abbildung 3.1 schematisch dargestellt. Die Steuerung des Systems erfolgt mittels Kontakt-Trigger des MS-Programms durch das CE-Programm. Während des initialisierenden Einspülens der Kapillare mit Trennpuffer, der Injektion der Probe und dem abschließenden Reinigungsspülen wird die ESI-Spitze potentialfrei gehalten und mit Nebulizer-Gas umspült.

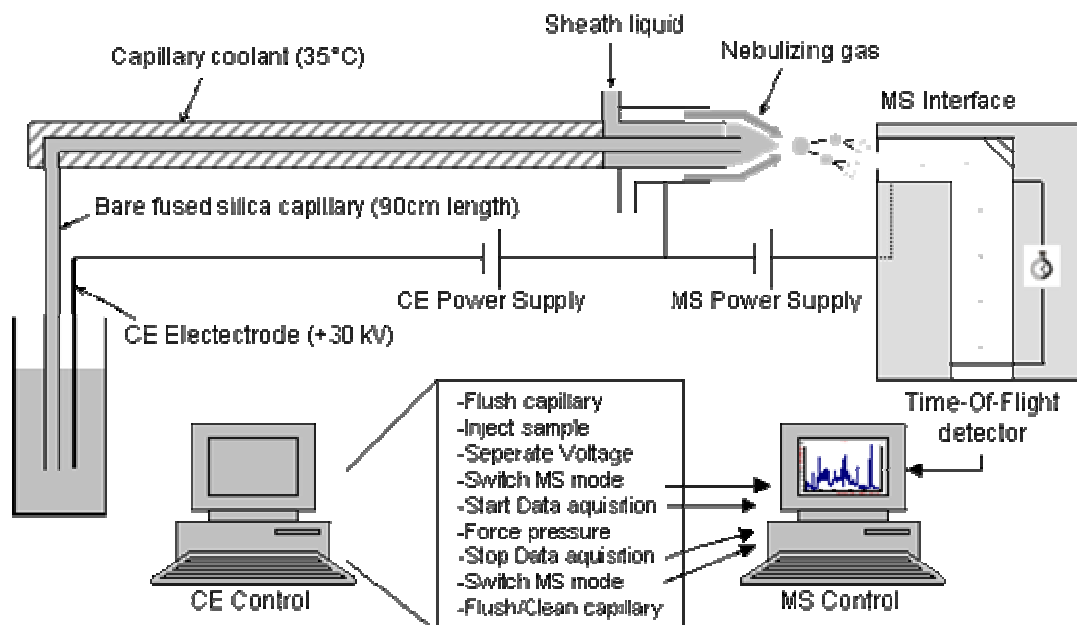


Abbildung 3.1 Aufbau des verwendeten CE – ESI – MS – Systems.

Die Steuerung des Systems erfolgte über zwei getrennte Rechnersysteme. Der CE-Leitrechner führt alle notwendigen Spül-, Injektions- und Trennschritte durch. Nach Anlegen der Trennungsspannung wird ein Signal an den MS-Rechner gegeben, der daraufhin das Nebulizer-Gas ausschaltet. Mit einem zweiten Signal wird die Datenaufzeichnung gestartet und später gestoppt.

So wird einerseits das Interface von austretender Flüssigkeit befreit, andererseits werden elektrokinetische Effekte während der Probeninjektion unterbunden, so dass diese rein pneumatisch erfolgen kann.

Sofort nach Anlegen der Trennspannung von +30 kV am Injektionsende wird hingegen das Nebulizer-Gas abgestellt und die ESI-Spitze auf ein Potential von ca. 3.500 V gesetzt. Die danach über die Kapillarlänge von 90 cm zur Verfügung stehende Spannung von etwa 26,5 kV reicht für die gewünschte Trennung aus und erzeugt gleichzeitig ein stabiles Elektrospray, welches auch ohne pneumatische Unterstützung durch Nebulizer-Gas über die Lauflänge aufrecht erhalten werden kann. Die Datenaufzeichnung wird in diesem System zeitabhängig über einen zweiten Trigger-Kontakt gesteuert.

Die Spannung über die Kapillare zeigte ein Optimum bei dem maximal möglichen Wert von +30 kV. (Abb. 3.2 a-c). Zwar kann durch eine Herabsetzung der Trennspannung die Auflösung zwischen zwei Substanzen deutlich verbessert werden, die benötigte Zeit für einen Lauf wird aber stark erhöht.

Ein ähnlicher Einfluss kann bei der Variation der Temperatur während der Trennung beobachtet werden. Je niedriger die verwendete Temperatur ist, um so größer werden die beobachteten Migrationszeiten (Abb. 3.2 c-e). Bei der Berechnung der Proteinmassen aus komplexen Proben hat sich gezeigt, dass eine höhere Signalintensität für die Dekonvolution entschieden wichtiger ist, als eine perfekte Auflösung der einzelnen Analyten. Die im verwendeten Setup benutzten Parameter von 35 °C bei einer effektiven Trennspannung von ca. 26,5 kV bilden daher einen für den Einsatz bei der Untersuchung komplexer Proben erzielten Kompromiss zwischen Auflösung, Nachweisgrenze und Laufdauer.

Das verwendete pH-unterstützte Probenstacking führt zwar zu einer um einige Minuten verzögerten Elution der Analytenmoleküle, erzielt aber im Peptidbereich eine schärfere Peakform (Abb. 3.2 (f), Pfeile) und trägt damit zu einer gleich bleibenden Qualität der Messungen bei. Auch kann durch einem der Trennung vorgeschalteten Stacking das Injektionsvolumen im weiten Umfang variiert werden. In den hier beschriebenen Versuchen konnte die Kapillare mit bis zu 550 nl Probe (Injektionsdauer 99 Sekunden bei 1 psi Druck) ohne Auflösungsverlust beladen werden.

Die Peakbreite auf halber Peakhöhe betrug 0,2 bis 0,4 Minuten. Nur wenige Substanzen eluierten verschmiert von der Kapillare. Da dieser Effekt gegen Ende des Trennvorgangs deutlich zunimmt, wurde das CE-Trennprogramm dahingehend optimiert, dass die Trennung zunächst ohne Druck beginnt und nach 40 Minuten ein Druck von 0,5 psi in Richtung des Detektors stufenweise aufgebaut wird.

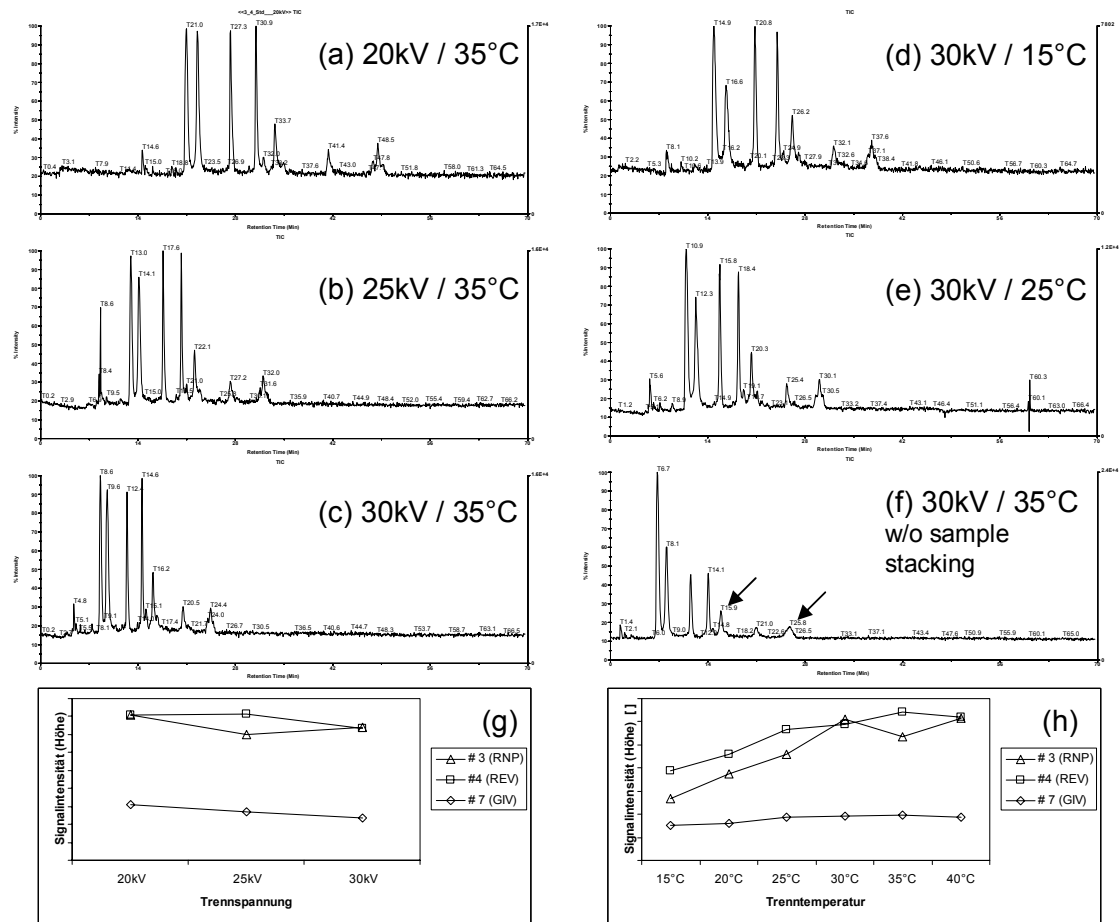


Abbildung 3.2 Optimierung der Spannungs- und Temperaturparameter. Bilder a-c zeigen das Verhalten einer Standardmischung bei unterschiedlichen Trennungsspannungen. Eine höhere Spannung führt zu kürzeren Migrationszeiten. Die Signalintensität wird dadurch aber kaum beeinflusst (Bild g). Einen ähnlichen Einfluss hat die Temperatur auf die Trennung (Bilder c-e und h). Das Ziel einer kurzen Laufdauer mit hoher Signalintensität kann durch eine erhöhte Temperatur erreicht werden. Das eingesetzte Stacking macht sich insbesondere im Bereich kleiner Polypeptide bemerkbar (Bilder c und f).

Zur Überprüfung der Nachweis- und der Bestimmungsgrenze des Verfahrens ist eine Mischung von 7 Polypeptiden zwischen 1.730 und 14.300 Dalton in verschiedenen Konzentrationen in die CE injiziert, durch das Verfahren getrennt und detektiert worden. Abbildung 3.3 zeigt in halblogarithmischer Darstellung die dabei ermittelten Amplituden über den jeweiligen Polypeptidmengen. Es ist zu erkennen, dass bis zu etwa 500 Femtomol ein zuverlässiger und über den betrachteten Bereich auch konzentrationsabhängiger Nachweis aller Polypeptide erfolgt. Bei geringeren Analytmengen bis 100 Femtomol nimmt die ermittelte Amplitude für kleine Polypeptide schneller ab und größere werden teilweise gar nicht mehr erkannt. Dennoch kann aus einer Extrapolation dieser Messwerte geschlossen werden, dass die Nachweisgrenze für kleine Polypeptide bis etwa 3 kDa im unteren Femtomolbereich liegt. Ein zuverlässiger und reproduzierbarer Nachweis über den gesamten zu

erfassenden Polypeptidbereich ist allerdings erst ab etwa 500 Femtomol oder $5 \cdot 10^{-13}$ Mol möglich (Bestimmungsgrenze).

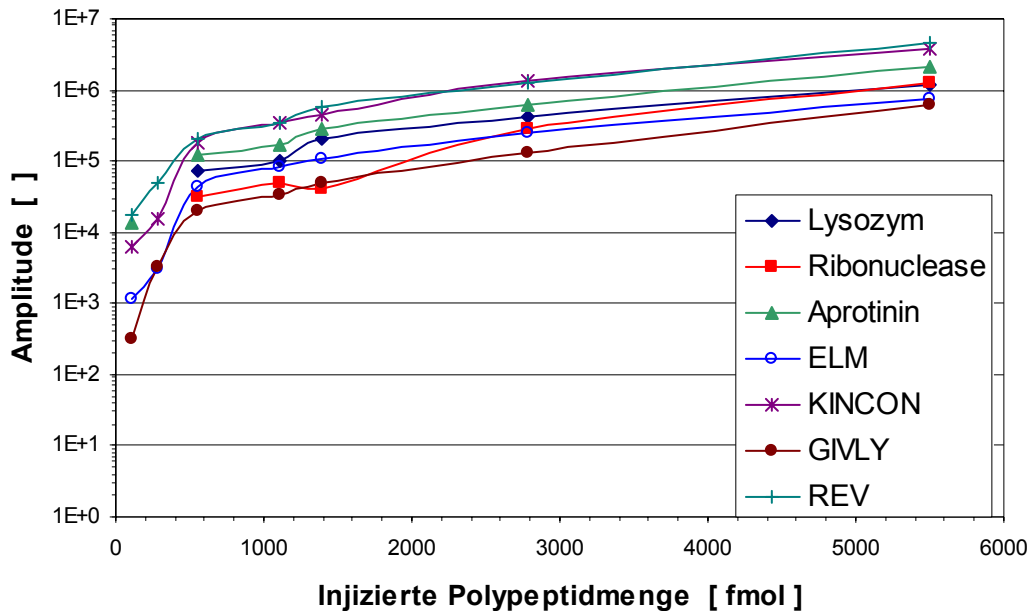


Abbildung 3.3 : Nachweis einzelner Polypeptide in Abhängigkeit von der injizierten Menge.
 Lysozym (14.303 Da), Ribonuclease (13.681 Da), Aprotinin (6.513 Da), ELM (2.832 Da), KINCON (2.333 Da), GIVLY (2.048 Da), REV (1.733 Da).

Die Reproduzierbarkeit der verwendeten Messtechnik, sowie der nachfolgenden Auswertung ist anhand einer 10 Mal in Folge gemessenen Urinprobe untersucht worden. Dabei konnten im Mittel 767 Polypeptide detektiert werden (726-815). Insgesamt 504 Polypeptide (66 %) wurden reproduzierbar in mindestens 7 der Messungen wieder erkannt. Die Migrationszeiten der verschiedenen Analyten zeigten dabei eine deutliche Varianz von durchschnittlich 2,34 Minuten (0,52-8,37). Die errechneten Massen schwankten hingegen im Mittel nur um 0,29 % $\Delta m/m$ (0 % - 1 %).

Insgesamt wurden in diesen 10 Messungen über 2.000 verschiedene Polypeptide ermittelt. Bei der Mehrzahl dieser Signale handelt es sich aber um solche, die nur in wenigen der Messungen vorhanden waren. Dabei konnte ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Reproduzierbarkeit eines Signals und dessen Amplitude beobachtet werden.

3.1.2 Prozessierung der erzeugten Daten

Die weitere Bearbeitung der aufgezeichneten Daten erfolgte wie in den Abbildungen 3.4 und 3.5 dargestellt. Abbildung 3.4 zeigt die Generierung der Polypeptidliste einer Probe anhand der bereits zuvor eingesetzten Mischung von 7 Polypeptiden zwischen 1,7 und 14,3 Kilodalton. Zunächst wird der vollständige Trennvorgang an der Kapillarelektrophorese durch das Massenspektrometers aufgezeichnet, was sich in Form des Gesamtionensignals (TIC) (Abb. 3.4 A) darstellt. Dieses Signal setzt sich aus Einzelspektren von jeweils 400 bis 2.500 Dalton/Ladung zusammen, welche alle 3 Sekunden aufgezeichnet werden (Abb. 3.4 Spektren 1 bis 5). Die parallel zu dieser Arbeit entwickelten Software „MosaiquesVisu“ überführt letztere zunächst in eine dreidimensionale Signalkarte (Abb. 3.4 B) und dekonvolviert die detektierten Ionen-signale in die „echten“ Polypeptidmassen (Abb. 3.4 C). Die eingesetzte Software verwendet bei die Berechnung der Massen einerseits einen Erkennungsalgorithmus für die Isotopenspur niedrig geladener kleiner Peptide, wie sie in der Abbildung 3.4 (Bilder 4 und 5) für ein drei- bzw. vierfach geladenes Peptid dargestellt ist. Darüber hinaus wird aber auch ein Clusterverfahren zur Berechnung der konjugierten Massen bei nicht mehr klar aufgelösten Signalen verwendet. Zusammen mit der Tatsache, dass auch die Konsistenz der zeitlich aufeinander folgenden Spektren berücksichtigt wird (3D-Karte), sind die verwendeten Algorithmen in der Lage, auch Signale von nicht eindeutig getrennten Polypeptiden richtig zuzuordnen (Abbildung 3.4, Peak 1/2). Als Resultat erzeugt die eingesetzte Software eine Liste der durch ihre CE-Migrationszeit und ihre Masse gekennzeichneten Polypeptide (Abb. 3.4 D) und ordnet diesen noch jeweils ihre aus den Einzelsignalen berechnete Amplitude sowie ihr Signal-Rausch-Verhältnis zu. Polypeptide, welche rechnerisch auf Modifikationen durch Oxidation, Natrium- oder Kaliumaddukten beruhen, sind in dieser Liste bereits entfernt und die Amplituden den jeweiligen Muttermassen zugeordnet worden.

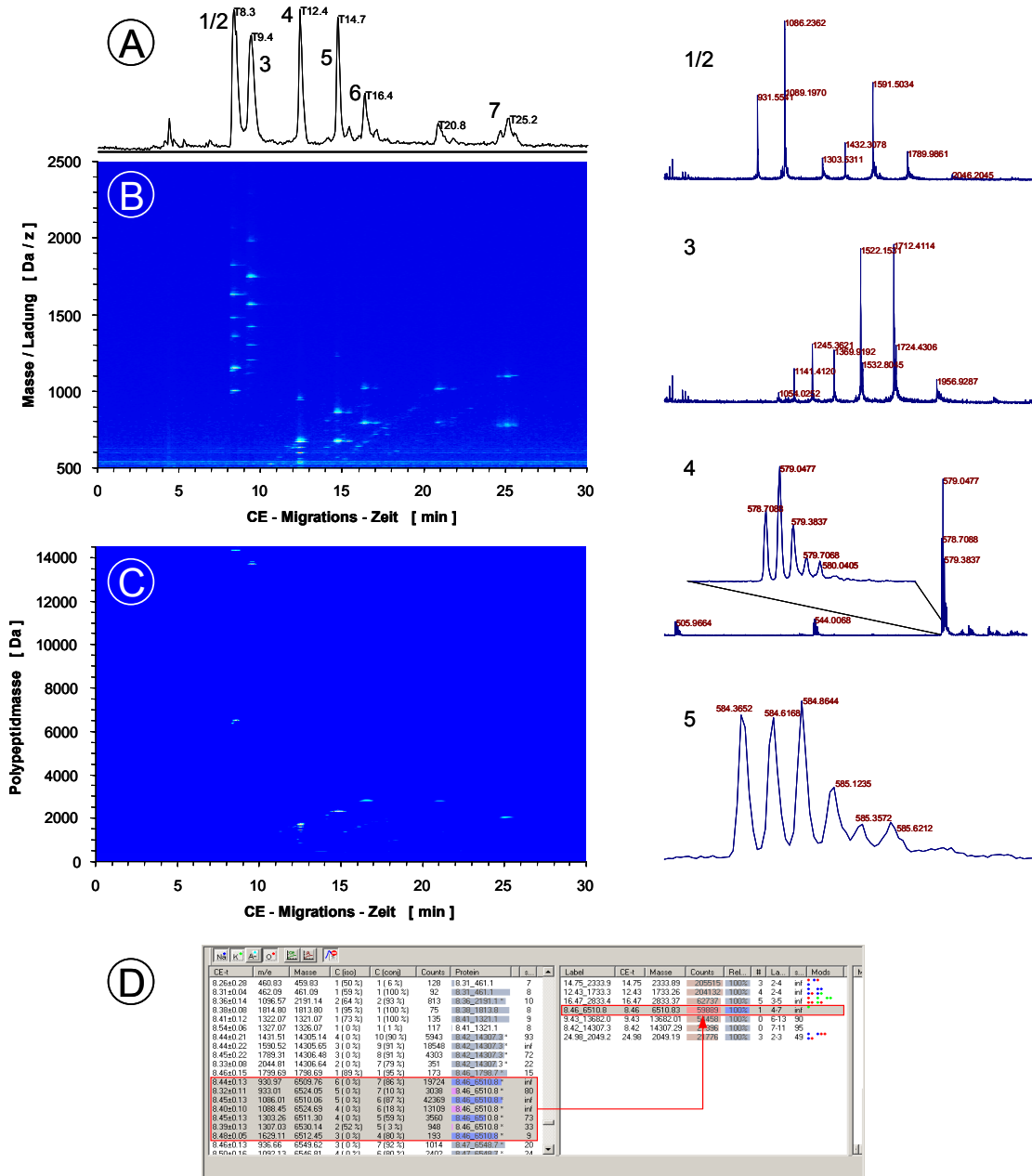


Abbildung 3.4 Prozessierung einer Probe am Beispiel des Standardgemisches. (A) und 1-5: Nach der Trennung in der CE erzeugen die einzelnen Polypeptide ein Gesamtionensignal, dass aus zeitlich aufeinander folgenden Spektren zusammengesetzt ist. (B) Diese Signale werden in der Software „MosaiquesVisu“ als dreidimensionale Karte dargestellt und gefiltert. (C) Das Resultat ist eine dreidimensionale Karte der dekonvolvierten Proteine, die (D) in Form einer annotierten Liste exportiert wird. Verwendet wurden: 1) Aprotinin (6.513 Da), 2) Lysozym (14.303 Da), 3) Ribonuclease (13.681 Da), 4) REV (1.733 Da), 5) KINCON (2.333 Da), 6) ELM (2.832 Da), 7) GIVLY (2.048 Da).

Abbildung 3.5 zeigt dasselbe Vorgehen anhand einer komplexen Urinprobe. Eine Zuordnung einer detektierten Masse/Ladung zu einer Polypeptidmasse innerhalb eines Einzelspektrums ist hier kaum noch möglich, wie der Rohdatenplot und die dargestellten Spektren zeigen (Abb. 3.5 A). Die verwendete Software ist dennoch in der

Lage aus diesen komplizierten Ionensignaturen Polypeptide entweder aufgrund zutreffender Isotopenmuster oder aber durch genau übereinstimmende Konjugationen zu ermitteln und in Form einer exportierbaren Liste zur Verfügung zu stellen (Abb. 3.5 B).

Auf diese Weise wird jede Probe unabhängig voneinander gemessen und prozessiert. Da die CE-Migrationszeiten von Lauf zu Lauf und insbesondere in Abhängigkeit der jeweiligen Gesamtproteinmenge einer deutlichen Schwankungsbreite unterliegen, werden die Zeiten mit Hilfe einer „Masterliste“ normiert. Ähnlich wird mit den Amplitudenwerten verfahren, da das zu jedem Zeitpunkt aufgezeichnete Signal von einer Reihe teilweise nicht kontrollierbarer Faktoren abhängig ist. Dazu zählen die Detektorleistung, die Ionisierungseffizienz, das Resuspendierungsvolumen der Probe, das Injektionsvolumen, die Probenpräparation aber auch – im Falle der untersuchten Urine – die Filtrationsleistung der jeweiligen Niere. Die errechneten Gesamtamplituden der Polypeptidsignale werden daher auf je 1 Million Teile Gesamtsignal (ppm) normiert. Dieser Ansatz kann dann als richtig angesehen werden, wenn davon ausgegangen wird, dass zwar das Gesamtsignal stark variiert, ein einzelnes Polypeptidsignal aber im Verhältnis zum Gesamtsignal immer etwa gleich bleibt und nur beim Vorliegen von pathologischen Veränderungen der Probe verändert exprimiert wird. Vorversuche mit verschiedenen Behandlungen derselben Probe haben gezeigt, dass dieser Weg der Normierung zu reproduzierbaren Amplitudenwerten führt.

In der weiteren Folge wird dann ausschließlich mit den Listen der detektierten Polypeptiden gearbeitet, die jeweils durch ihre Masse (in Dalton) und ihre standardisierte Migrationszeit (in Minuten) definiert sind. Mit Hilfe einer Datenbank werden die Polypeptide verschiedener Proben jeweils in Gruppen zusammengefasst und untereinander abgeglichen (Abb. 3.5 C). Aus den so entstehenden synthetischen „Bildern“ der zu vergleichenden Probengruppen werden nun die Polypeptide herausgesucht, die entweder im Hinblick auf ihre Frequenz oder ihre Amplitude zwischen den Gruppen in einem statistisch relevanten Maße unterschiedlich sind.

3.1.3 Proteomuntersuchung von Körperflüssigkeiten mittels CE-MS

Aufgrund der strengen Anforderungen, die die CE-MS-Technik an eine Probe stellt, und ihrer jeweiligen spezifischen Eigenschaften, müssen Proben verschiedenen Ursprungs mit sehr unterschiedlichen Mitteln behandelt werden, um eine zuverlässige und reproduzierbare Analyse zu gewährleisten. Ionisierbare Substanzen nicht peptidischen Ursprungs können zwar auf der Ebene der Datenprozessierung herausgefiltert werden, da diese in der Regel nur im einfach geladenen Zustand vorliegen und sich so von Polypeptiden unterscheiden, beeinflussen aber die Trennung wie auch die Ionisierungseffizienz in einem erheblichen Maße.

Die hier verwendeten Protokolle sind daher dahingehend ausgewählt, dass die in der Originalprobe vorhanden Polypeptide zwar soweit möglich vollständig erfasst werden können, auf jeden Fall aber störende Substanzen weitestgehend eliminiert sind.

Blut stellt zweifelsohne die wohl wichtigste Körperflüssigkeit in der medizinischen Diagnostik dar. Im Rahmen der Proteindiagnostik ist das Blut bzw. sein von korpuskulären Bestandteilen befreiter Teil, das Plasma, auch eine der einfachsten Probenquellen. Die chemischen und physikalischen Eigenschaften des Plasmas können in der Regel als konstant betrachtet werden und auch die Zusammensetzung der Plasmaproteine variiert im wesentlichen nur bei denjenigen Proteinen, die lediglich in geringen Konzentrationen vorliegen und weniger in den „high-abundant“ Proteinen. Doch gerade diese sind es, die viele Untersuchungsmethoden, so auch die CE-MS-Technik negativ beeinflussen. Die vorhandenen Konzentrationsunterschiede sind so erheblich (mehrere Zehnerpotenzen), dass die interessierenden Proteine vollständig überdeckt werden. Abbildung 3.6 zeigt verschiedene Präparationsmethoden für Serum- oder Plasmaproben. Bild a zeigt den Versuch, die 5 prominentesten Proteine (Albumin, IgG, Antitrypsin, Transferrin, Haptoglobin) mittels Affinitätschromatographie aus einer Serumprobe zu entfernen. Tatsächlich bleiben deutliche Spuren dieser 5 Proteine in der Probe zurück und erzeugen immer noch klar stärkere Signale als alle anderen Polypeptide. In Bild b wird eine Serumprobe nach Vorreinigung mittels Ionenaustauschchromatographie (DEAE-Sepharose) gezeigt. Eine Trennung zwischen den prominenten Serumbestandteilen und kleineren Peptiden (Kasten) konnte dadurch erreicht werden, dass die Trennungsspannung umgedreht und so eine Bewegung in Richtung des Injektionsendes der Kapillare erzeugt wurde. Diese Trennrichtung wurde durch einen injektionsseitigen Druck überlagert, so dass die effektive Bewegung wieder in Richtung des MS

vollzogen wird. Ohne diesen Trick eluierten alle Bestandteile nahezu gleichzeitig von der CE-Säule. Bild c zeigt schließlich eine Trennung von Plasmaproteinen nach vorheriger Abtrennung größerer Proteine mittels Ultrafiltration. In dem gezeigten Beispiel wurde ein 30 kDa Filter verwendet. Detektiert werden können danach Polypeptide bis zu einer Molekulargröße von etwa 15 kDa, größere Proteine sind nur noch in Spuren vorhanden (Pfeil). Es sei erwähnt, dass von 5 Ultrafiltrationseinheiten verschiedener Hersteller nur einer ein zufrieden stellendes Ergebnis erzielte. Das erreichbare Resultat scheint eher eine Funktion des Materials und der Verarbeitung als der nominellen Ausschlussgröße zu sein.

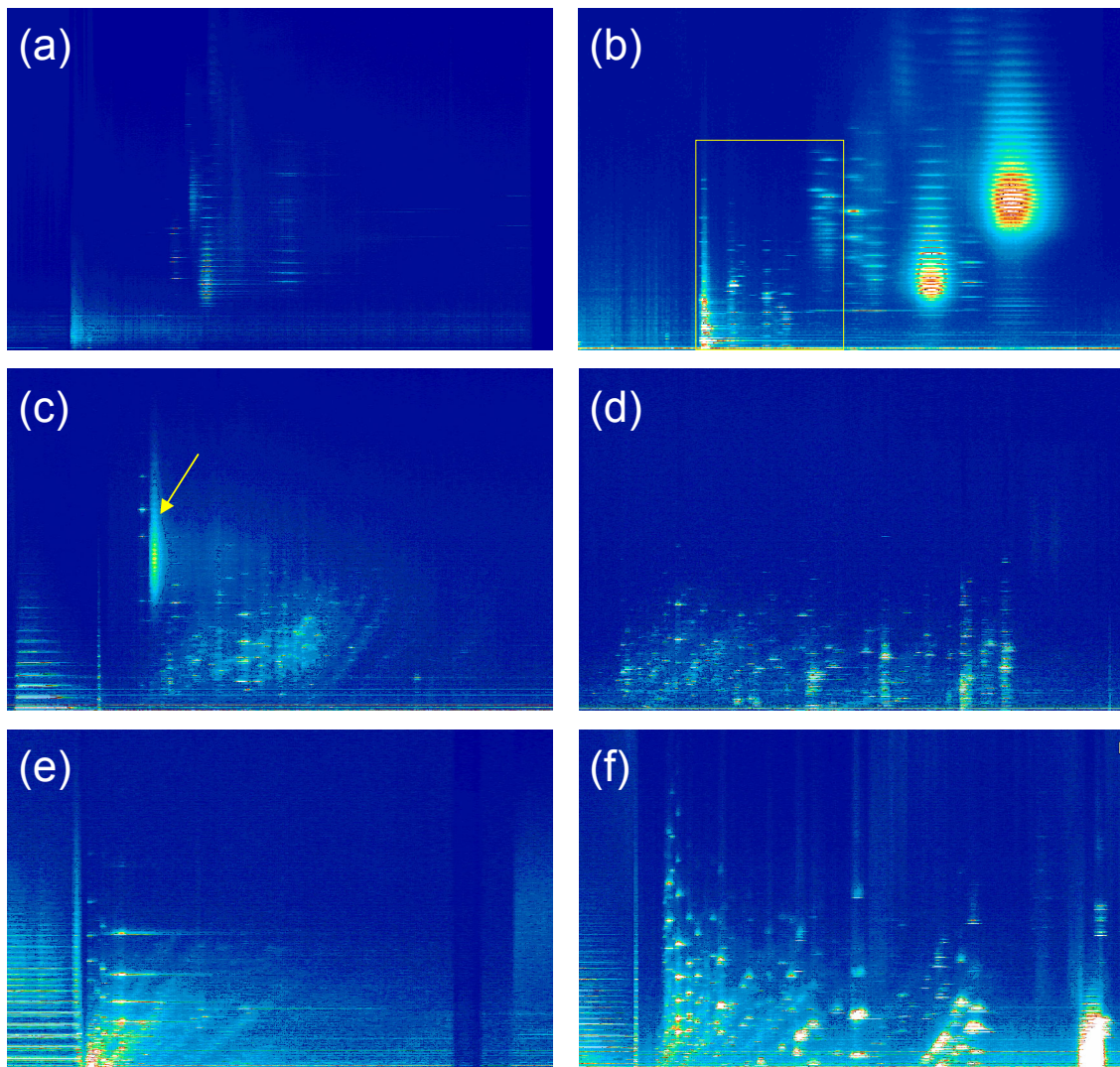


Abbildung 3.6: CE-MS Ergebnisse verschiedener Präparationsmethoden für Plasma und Serum.

(a) vorherige Abtrennung prominenter Proteine durch Multi-Affinitäts-HPLC; (b) Vorbehandlung mittels Ionenaustauschchromatographie bei einer umgedrehten Trennungsspannung; (c) Ultrafiltration und reversed-phase-Chromatographie; (d) RAM – ADS/C18 – Chromatographie; (e-f) Identische Probe als sofort präparierte Plasmaprobe (e) und als Serum nach zweistündiger Koagulationszeit (f).

Eine Variante der Ultrafiltration ist in Bild d gezeigt. Hier ist eine Serumprobe zu sehen, die zuvor nur mittels eines restricted-access-materials (RAM, ADS C-18) behandelt worden ist. Das erfasste Bild ist sehr sauber und peptidreich. Negativ ist anzumerken, dass effektiv nur Peptide bis etwa 9 kDa beobachtet werden können und der notwendige Waschschrift auf der HPLC-Säule sehr viel Zeit benötigt.

In den Bildern e und f ist eine Besonderheit der Untersuchung von Blutproteinen dargestellt. Bild e zeigt eine sofort nach der Entnahme präparierte Plasmaprobe. Die selbe Probe ist in Bild f als Serumprobe nach 2 Stunden Koagulationszeit dargestellt. Die hier zu beobachtende Fülle an Polypeptiden ist vermutlich in erster Linie auf enzymatische Degradation zurückzuführen.

Aufgrund der in Abbildung 3.6 gezeigten Ergebnisse kann die in Bild c gezeigte Präparation mittels Ultrafiltration und reversed-phase-Chromatographie als ein guter Kompromiss für die Untersuchung von Plasma- oder Serumproben angesehen werden. Die Nachweisgrenze wird zwar auf Proteine bis etwa 15 kDa eingeschränkt, dafür können aber über diesen Bereich reproduzierbare Präparations- und Messergebnisse erzielt werden.

Urin wird durch Filtration und Rückresorption direkt aus dem Blut gewonnen und gleicht in seinem Informationsreichtum daher dem des Serums. Die sehr stark variierende Leistung verschiedener Nieren stellt jedoch für die Proteomuntersuchung eine große Herausforderung dar, da Urine sich nicht nur in Bezug auf die Proteinkonzentration, sondern auch in Bezug auf deren Molekulargröße stark unterscheiden. Auch die Tatsache, dass Urin eine wässrige Lösung ist und die darin enthaltenen Proteine somit auch wasserlöslich sind, ist nicht unbedingt eine Erleichterung, wie Abbildung 3.7 (a) zeigt, denn der Körper entledigt sich auf dem gleichen Wege auch aller wasserlöslichen Salze, welche eine direkte Messung unmöglich machen. Abbildung 3.7 (b) zeigt eine Urinprobe nach der Entsalzung an einer PD-10 Säule. Die Bereiche mit einer großen Anzahl einfach geladener Stör-Ionen sind in beiden Bildern durch die gelben Pfeile hervorgehoben. In Bild b tritt bereits eine größere Anzahl detektierbarer Polypeptide hervor, jedoch wird die Messung noch immer deutlich von den als einfach geladene Ionen detektierten Verunreinigungen beeinflusst. Bild c schließlich zeigt dieselbe Probe nach einer Reinigung an einem C-2-reversed-phase Medium. Die hier gezeigte Probe weist praktisch keine interferierenden Substanzen mehr auf und kann mit hoher Reproduzierbarkeit analysiert werden. Die gewonnene Reinheit geht allerdings auf Kosten von einigen Signalen, die im Vergleich zu Bild b nicht mehr vorhanden sind.

Die hier vorgeschlagene Präparationsmethode für Urin entfernt ionische Verunreinigungen und auch größere Proteine, wie sie in Urinproben gesunder Probanden in geringen Mengen vorhanden sind, äußerst zuverlässig. Nierenfunktionsstörungen drücken sich aber nicht zuletzt durch das Vorhandensein von großen Albuminkonzentrationen im Urin aus. Wie Bild d zeigt, kann die hier vorgestellte Präparationsmethode aber auch solche Proben behandeln, da das vorhandene Albumin zu einem Großteil im Zuge des reversed-phase-Schrittes entfernt wird. Die verbleibende Restkonzentration an Albumin kann durch die Trenntechnik und die nachfolgende Prozessierung, insbesondere der Normierung der CE-Migrationszeiten, verarbeitet werden.

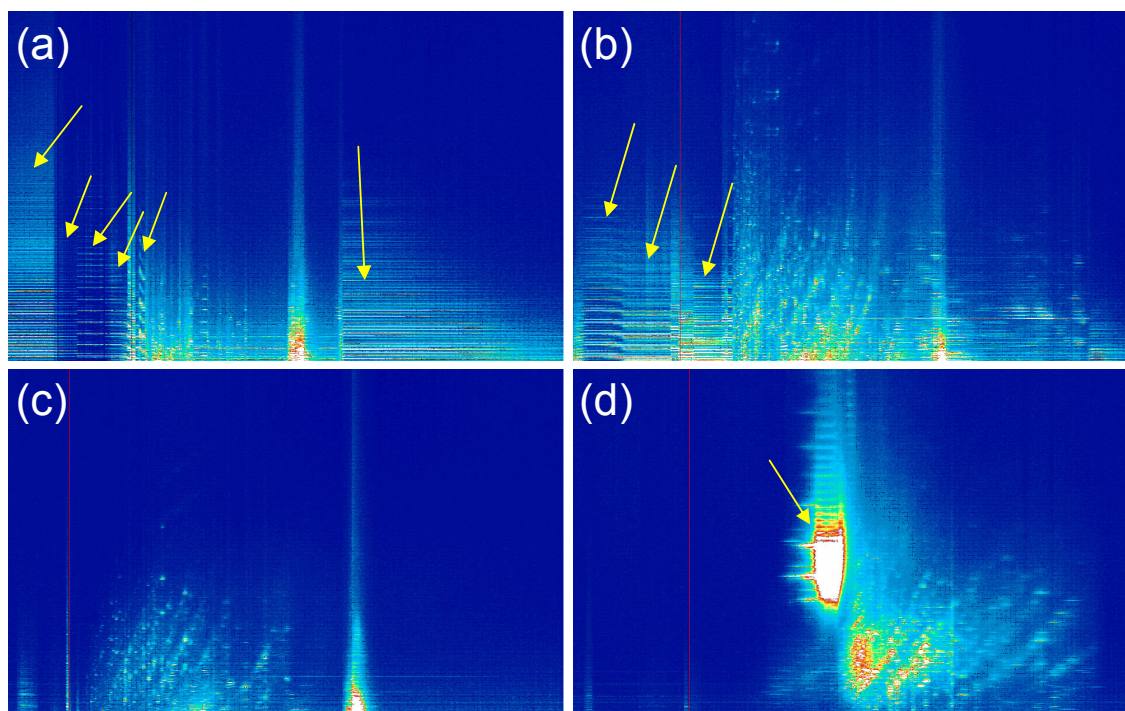


Abbildung 3.7: CE-MS Ergebnisse verschiedener Präparationsmethoden für Urin.

(a) Direkte Messung einer durch Lyophilisation aufkonzentrierten Urinprobe; (b) Entfernung von Teilen der störenden Salze durch Größenausschlusschromatographie.

Die gelben Pfeile in beiden Bildern weisen auf die Messung beeinflussende Ionen nicht peptidischen Ursprungs hin.

(c-d) Vorreinigung der Probe mittels C-2 reversed-phase bei einem gesunden Probanden (c) und einer Albuminurie (d).

Dialysat ist ein Sammelbegriff für verschiedene Flüssigkeiten, die im Zuge einer Nierenersatztherapie gewonnen werden. Da das Prinzip der Dialyse auf einem Konzentrationsunterschied auf beiden Seiten einer semipermeablen Membran beruht, sind Dialysate meist sehr gering konzentriert. Aus diesem Grund ist eine Aufkonzentrierung der vorhandenen Polypeptide in den meisten Fällen notwendig.

Abbildung 3.8 (a) zeigt ein Peritonealdialysat, konzentriert an einem DEAE-Anionenaustauscher. Das Ergebnis eines wesentlich eleganteren und überdies noch ergiebigeren Verfahrens zeigt Abbildung 3.8 (d). Hier wurden 50 ml eines F10-Haemofiltrates per HPLC an einem restricted-access-material (ADS C-18) aufkonzentriert und vorgereinigt. Es ist zu erkennen, dass eine ausgesprochen ergiebige Proteinausbeute bei guter Reinheit erzielt werden konnte. Die nominelle Ausschlussgröße des verwendeten Materials ist mit 15 kDa angegeben, die tatsächliche Ausschlussgröße liegt bei etwa 9 kDa.

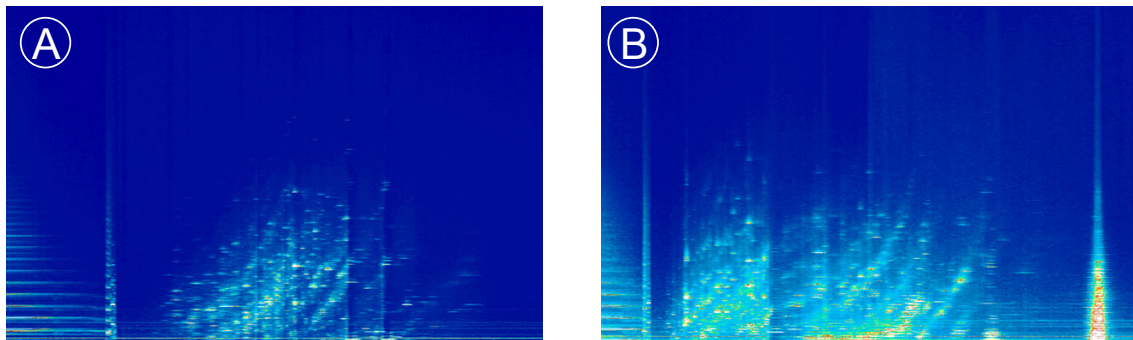


Abbildung 3.8: CE-MS Ergebnisse verschiedener Präparationsmethoden für Dialysat.

(A) Peritonealdialysat, konzentriert und gereinigt an DEAE;
(B) Hämofiltrat, aufkonzentriert an ADS C-18 RAM.

Die hier dargestellten Präparationsmethoden dienen dem Zweck, unterschiedliche Probenmaterialien der Proteomuntersuchung mittels CE-MS zugänglich zu machen. Auf den folgenden Seiten werden Studien beschrieben, die mit Hilfe der hier beschriebenen Technologie durchgeführt wurden. Dabei wurden bewusst Untersuchungen gewählt, die sich jeweils mit einer der beschriebenen Probenquellen – Urin, Plasma, Dialysat – beschäftigen, um die Eignung der Technologie für die genannten Körperflüssigkeiten zu zeigen. An einem vierten Beispiel wird schließlich gezeigt, dass die hier verwendete Technologie auch bei der Untersuchung zeitlich kritischer Krankheitsprozesse angewendet werden kann, da Präparation, Messung und Auswertung innerhalb einer kurzen Zeitspanne durchgeführt werden können. Das umfangreichste Projekt hat sich dabei mit der Früherkennung der diabetischen Nephropathie und ihrer Abgrenzung zu anderen Nephropathien beschäftigt. Die Relevanz dieser Untersuchung beruht dabei nicht nur auf der epidemiologischen Verbreitung dieser Erkrankung, sondern auch auf der Tatsache, dass die Eignung des Urins als Probenmaterial gezeigt wird.

3.2 Untersuchungen zur Diagnose der diabetischen Nephropathie und anderer Nierenerkrankungen anhand von Urinproben

3.2.1 Markerdefinitionen

Innerhalb der hier gezeigten Untersuchungen sind Urinproben von Patienten mit verschiedenen Nierenerkrankungen untersucht worden. Da erwartet werden kann, dass unterschiedliche Grunderkrankungen der Niere auch zu unterschiedlichen Proteinmustern im Harn führen, sollte das mittels Kapillarelektrophorese und Massenspektrometrie erfasste Bild in der Lage sein, diese wiederzugeben. Abbildung 3.9 zeigt einige typische Beispiele von Rohdatenplots der gemessenen Urinproben.

In Abbildung 3.9 Teilbild A ist eine typische Kontrollprobe dargestellt. Es ist ein gleichmäßiges Muster an m/z -Signalen relativ kleiner (bis etwa 15 kDa großer) Polypeptide zu erkennen. Größere Polypeptide, wie sie in einer solchen Urinprobe sicherlich auch vorhanden sind, wurden durch die Probenvorbereitungsprozedur entfernt.

Ein ganz ähnliches Bild zeigt die Urinprobe eines Diabetikers ohne erhöhte Proteinausscheidung, wie sie in Teilbild B dargestellt ist. Mit steigender Urin-Protein-Fracht, erscheinen in dem Rohdatenplot deutliche Anzeichen verschiedener größerer Proteine, die aufgrund ihrer dekonvolutierten Masse als Albumin, Immunglobulin – light-chain und Transferrin identifiziert werden können (Teilbild C).

Sehr große durch die Niere ausgeschiedene Proteinmengen zeigen sich schließlich durch einen extrem großen „Albuminfleck“ wie dieser in Teilbild D anhand einer typischen FSGS-Probe zu sehen ist.

Teilbild E zeigt ein typisches Beispiel einer MNGN-Probe. Diese zeichnet sich durch eine große Anzahl relativ großer Proteine aus, ohne dass diese die Messung wie in (D) dominieren. Das typische Bild einer MCD-Probe zeigt hingegen kaum Unterschiede zu dem eines gesunden Probanden (Teilbild F).

In Zuge der hier vorgestellten Untersuchungen sind 439 Urinproben mittels CE-MS gemessen und analysiert worden. Da das Primärziel dieser Arbeit eine möglichst frühzeitige Identifikation der diabetischen Nephropathie ist, sind die untersuchten

Diabetiker in verschiedene Untergruppen, je nach dem vorliegenden Stadium der Nierenschädigung eingeteilt. Als deren Maß ist der vorhandene Albumin / Kreatinin Quotient verwendet worden, der es erlaubt, die ausgeschiedene Albuminmenge im Spontanurinen auf einen zeitunabhängigen Wert zu normieren. Abbildung 3.10 zeigt die Beziehung zwischen den A/K-Quotienten und den Urin-Albumin-Werten der untersuchten Proben der Diabetiker des Typs II.

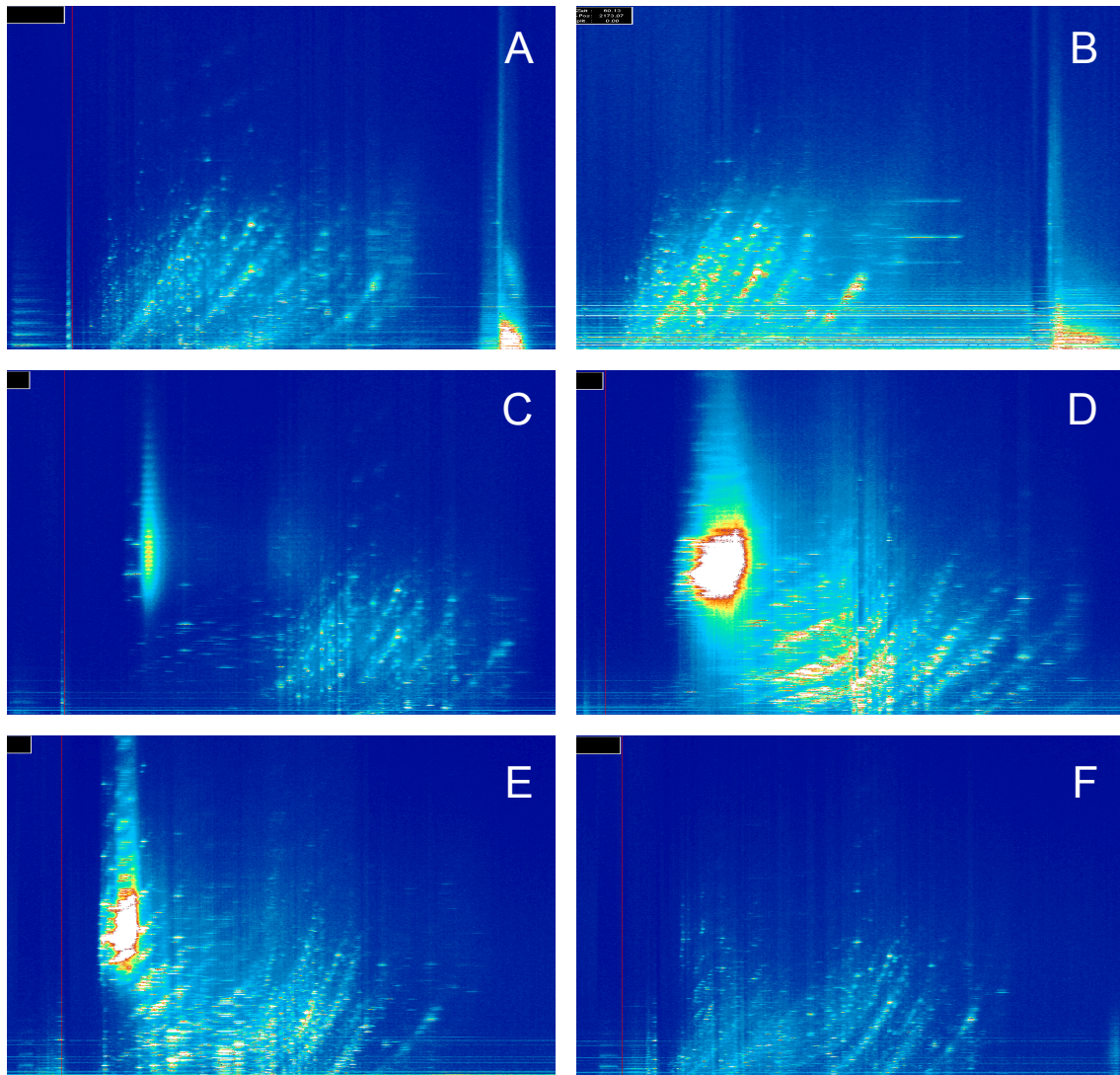


Abbildung 3.9: Typische Rohdatenplots verschiedener Proben.
(A) Kontrollprobe – Nr. 73, (B) Diabetiker ohne Albuminurie – Nr. 326, (C) Diabetiker mit erhöhter Albumin-Ausscheidung in der Probe – Nr. 188, (D) FSGS-Probe, (E) MNGN-Probe, (F) MCD-Probe

Es ist zu erkennen, dass beide Werte recht gut miteinander korrelieren. In den eingefügten Rohdatenplots ist beispielhaft gezeigt, wie sich der in den Proben vorhandene Albuminspiegel in den Spektren darstellt. In den meisten Fällen steigt die Größe und Intensität des „Albuminlecks“ (gelbe Pfeile) parallel zu der

gemessenen Konzentration an (Teilbilder a-d). Dies ist jedoch nicht immer der Fall (Teilbild e) und stellt keine zwingende Notwendigkeit dar.

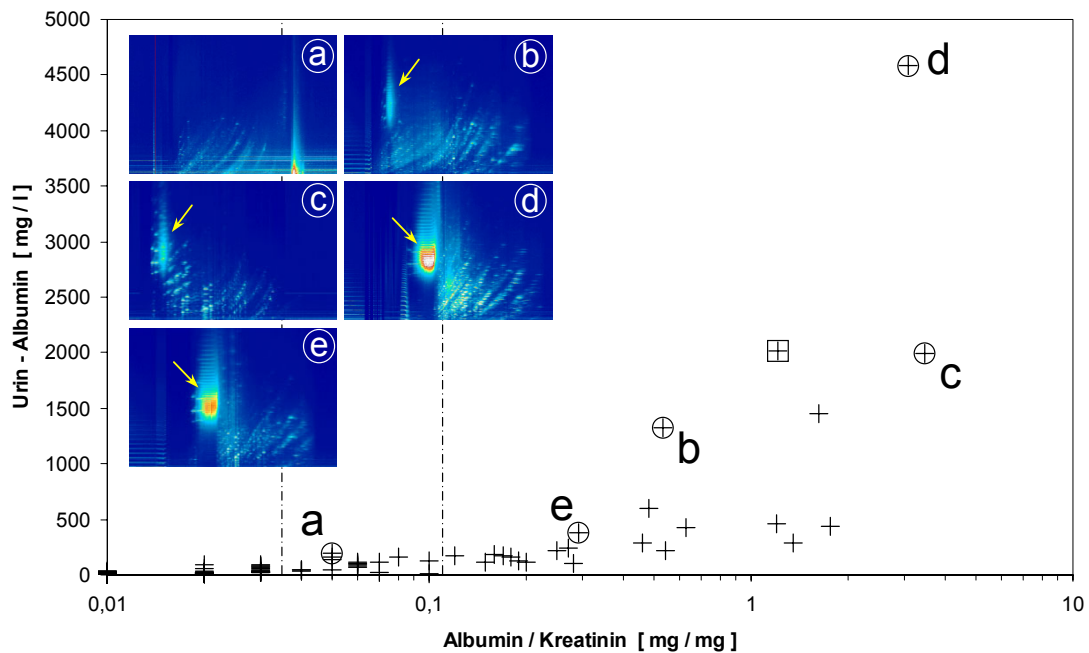


Abbildung 3.10: Zusammenhang zwischen den Albuminwerten und dem Albumin/Kreatinin-Quotienten im Urin der untersuchten Typ II Diabetiker (Gruppen D2P0, D2P1 und D2P2). Die Strichpunktlinien zeigen die verwendeten Gruppengrenzen an. Es ist ein deutlicher Zusammenhang zwischen beiden Parametern zu erkennen, der sich jedoch nicht unbedingt in den erfassten Rohdatenplots niederschlägt, wie Ausschnitt (e) zeigt. Die mit einem Kasten umrandete Probe ist bereits in Abb. 3.7 (d) dargestellt worden.

Nach der individuellen Messung der einzelnen Proben und ihrer Auswertung und Dekonvolution sind die gefundenen Polypeptide anhand ihrer Masse und ihrer (normierten) CE-Migrationszeit miteinander abgeglichen worden. Im Mittel wurden in den 439 Proben etwa 1.000 Polypeptide detektiert. Die gefundene Anzahl variierte zwischen 171 und 1.975 Polypeptiden, wobei 85 % aller Proben zwischen 500 und 1500 detektierbare Polypeptide aufwiesen (Abb. 3.11). Insgesamt wurden durch die Normierung und den nachfolgenden Abgleich der Messungen in der Datenbank 438.998 detektierte Polypeptide in 13.289 Klassen eingeteilt. Unter einer Klasse wird in diesem Zusammenhang die Gruppe aller detektierten Polypeptide aus verschiedenen Proben verstanden, die aufgrund ihrer Molekulargröße und ihrer Migrationszeit als identisch angesehen werden können.

Da die große Anzahl an Polypeptiden und Klassen in dieser Form nicht zu bearbeiten ist, wurden in einem ersten Datenreduktionsschritt alle Klassen entfernt, für die keine der untersuchten Gruppen eine Frequenz von mindestens 50 % aufgewiesen haben. Danach verblieben noch 2.741 Klassen verschiedener Polypeptide.

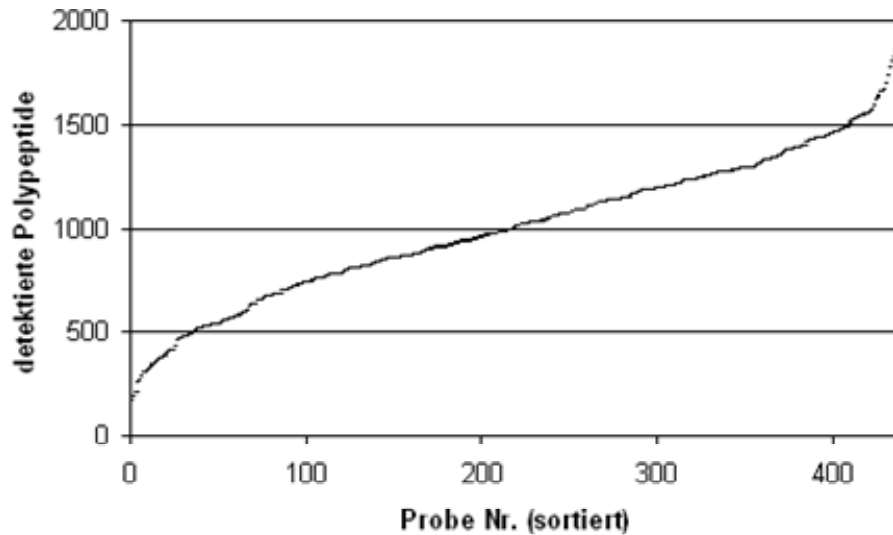


Abbildung 3.11: Anzahl gefundener Polypeptide in den 439 untersuchten Urinproben.
85 % aller Proben enthalten zwischen 500 und 1500 verschiedene Polypeptide.

Werden alle untersuchten Proben betrachtet, so können 58 Polypeptide gefunden werden, die in wenigstens 75 % aller Proben vorhanden sind. Diese als „common polypeptides“ deklarierten Polypeptide sind in Tabelle 3.12 zusammengefasst.

Basierend auf der Verteilung innerhalb der Gruppen können verschiedene typische Muster für die untersuchten Krankheiten aufgestellt werden. Ein idealer Kandidat für die Diagnose eines Gesundheitszustandes innerhalb der hier durchgeführten Pattern-Diagnostik, muss dabei nicht zwangsläufig in vollständiger Weise zwischen zwei Zuständen differenzieren. Vielmehr soll erst durch die Kombination einer ganzen Gruppe von Markern der Gesundheitszustand beschrieben werden. Da grundsätzlich sowohl die Frequenz mit der ein Polypeptid in den Gruppen vorhanden ist, die Amplitude dieses Polypeptides oder auch die Veränderung zwischen verschiedenen Gruppen ausschlaggebend für dessen Eignung als Marker sein kann, müssen all diese Aspekte jeweils gemeinsam und für jedes untersuchte Polypeptid individuell betrachtet werden.

3.2 Ergebnisse der Untersuchungen zur diabetischen Nephropathie

Tabelle 3.12: „Common Polypeptides“ im Urin
(Auftreten in mindestens 75 % aller Proben)

Identifikation			Gesamt	Kontrollen	Diabetes Typ I			Diabetes Typ II			andere Nephritis							
ID	Masse [kDa]	Zeit [min]	Typ	Σ n (439)	%	Erw. (85)	Kind. (9)	D1P0 (28)	D1P1 (11)	D1P2 (2)	D2P0 (202)	D2P1 (13)	D2P2 (23)	D2P3 (23)	FSGS	MNGN (10)	MCD (18)	(15)
404	1,19	38,2	Comn	429	98%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	87%	91%	80%	89%	93%	
744	1,68	34,5	Comn	424	97%	93%	100%	89%	82%	100%	99%	92%	100%	100%	100%	100%	100%	
1094	2,41	33,1	Comn	405	92%	98%	100%	82%	55%	50%	91%	100%	91%	100%	100%	100%	100%	
1241	2,8	36,9	Comn	404	92%	96%	100%	89%	91%	50%	96%	100%	78%	70%	80%	83%	87%	
916	2,01	32,3	Comn	403	92%	98%	100%	96%	100%	100%	89%	92%	100%	91%	70%	78%	93%	
3962	1,24	49,9	Comn	396	90%	98%	100%	93%	82%	50%	91%	92%	70%	65%	100%	89%	100%	
7461	1,45	41,9	Comn	396	90%	96%	100%	71%	82%	100%	90%	100%	91%	87%	90%	83%	100%	
3976	1,26	45,4	Comn	393	90%	96%	100%	96%	73%	0%	90%	92%	65%	78%	90%	94%	100%	
1199	2,68	34,5	Comn	392	89%	94%	100%	96%	91%	100%	94%	77%	83%	57%	60%	67%	100%	
4155	1,49	41,4	Comn	388	88%	99%	100%	89%	82%	100%	85%	85%	78%	87%	90%	89%	93%	
793	1,77	36,6	Comn	387	88%	85%	78%	68%	82%	50%	90%	100%	91%	87%	100%	100%	100%	
4570	2,2	45,4	Comn	376	86%	91%	100%	89%	100%	100%	86%	100%	65%	61%	90%	72%	93%	
1426	3,39	35,9	Comn	376	86%	95%	89%	93%	82%	50%	91%	77%	74%	35%	80%	72%	73%	
4117	1,44	41,6	Comn	374	85%	92%	89%	79%	55%	100%	83%	85%	83%	91%	90%	89%	100%	
4190	1,54	50	Comn	374	85%	96%	89%	93%	73%	100%	88%	77%	52%	43%	80%	89%	100%	
7294	1,25	41,1	Comn	373	85%	92%	89%	68%	73%	100%	89%	100%	78%	48%	70%	78%	100%	
439	1,24	40,8	Comn	372	85%	94%	100%	86%	64%	100%	84%	77%	74%	74%	90%	78%	93%	
405	1,2	51	Comn	368	84%	91%	100%	82%	73%	100%	89%	77%	52%	52%	90%	78%	87%	
8441	3,46	43,9	Comn	368	84%	94%	100%	75%	82%	100%	86%	92%	70%	61%	80%	61%	87%	
3942	1,22	48,2	Comn	366	83%	84%	100%	82%	82%	100%	87%	77%	48%	87%	90%	67%	93%	
4144	1,47	41,9	Comn	363	83%	95%	78%	75%	82%	100%	85%	69%	70%	65%	70%	67%	80%	
4557	2,17	40,2	Comn	362	82%	93%	100%	89%	73%	100%	84%	77%	65%	43%	90%	67%	93%	
942	2,06	27,8	Comn	360	82%	81%	78%	96%	91%	100%	76%	85%	87%	83%	100%	94%	93%	
4206	1,56	51,2	Comn	360	82%	95%	89%	82%	82%	0%	85%	85%	30%	39%	90%	94%	100%	
7560	1,58	36,2	Comn	360	82%	89%	100%	89%	82%	100%	86%	92%	74%	35%	40%	61%	87%	
1675	4,35	27,7	Comn	359	82%	84%	100%	96%	82%	100%	79%	62%	78%	91%	60%	89%	80%	
4168	1,51	53	Comn	359	82%	93%	89%	82%	73%	100%	86%	77%	43%	35%	70%	89%	100%	
765	1,72	28,3	Comn	358	82%	60%	100%	89%	82%	100%	81%	92%	100%	100%	100%	100%	87%	
3985	1,27	40,4	Comn	357	81%	93%	100%	79%	91%	100%	77%	69%	70%	74%	90%	78%	100%	
93	0,88	26,1	Comn	355	81%	87%	89%	89%	36%	50%	92%	100%	65%	43%	50%	17%	80%	
1205	2,7	32,3	Comn	355	81%	85%	78%	93%	82%	50%	81%	77%	83%	65%	70%	61%	93%	
613	1,47	35,3	Comn	352	80%	82%	56%	75%	82%	100%	82%	92%	78%	65%	60%	89%	87%	
826	1,83	28,6	Comn	352	80%	65%	89%	86%	91%	100%	79%	92%	96%	83%	100%	100%	87%	
1453	3,48	43,2	Comn	352	80%	79%	100%	71%	73%	100%	90%	92%	83%	61%	60%	22%	60%	
4124	1,45	49,4	Comn	352	80%	93%	100%	96%	100%	50%	82%	54%	61%	39%	80%	50%	80%	
593	1,44	39,3	Comn	349	79%	92%	89%	96%	82%	50%	74%	100%	61%	83%	60%	61%	87%	
4902	3	47,5	Comn	349	79%	79%	89%	57%	55%	50%	90%	100%	70%	35%	70%	72%	87%	
2074	6,19	39,4	Comn	349	79%	95%	44%	50%	27%	0%	84%	77%	78%	74%	60%	78%	80%	
1551	3,84	24,8	Comn	348	79%	82%	100%	54%	45%	100%	88%	69%	78%	78%	50%	39%	80%	
5064	3,5	43,9	Comn	348	79%	91%	33%	57%	64%	100%	79%	92%	87%	70%	90%	78%	87%	
4442	1,95	38,7	Comn	347	79%	80%	100%	71%	73%	0%	81%	77%	70%	70%	80%	72%	100%	
7770	1,91	38,4	Comn	346	79%	85%	100%	43%	64%	50%	83%	92%	78%	52%	70%	78%	93%	
7230	1,18	51,8	Comn	345	79%	87%	67%	79%	64%	50%	81%	69%	43%	61%	90%	78%	100%	
777	1,74	29	Comn	344	78%	67%	100%	89%	82%	100%	71%	100%	91%	100%	100%	100%	87%	
4661	2,39	36,6	Comn	344	78%	82%	89%	29%	45%	50%	80%	92%	74%	91%	100%	89%	93%	
96	0,88	35,7	Comn	342	78%	88%	89%	89%	82%	100%	75%	54%	65%	87%	60%	94%	47%	
7393	1,37	53,9	Comn	342	78%	89%	100%	64%	73%	50%	80%	69%	48%	48%	90%	78%	93%	
7469	1,46	51,3	Comn	342	78%	99%	100%	86%	82%	50%	79%	77%	35%	35%	80%	44%	87%	
1250	2,83	35,2	Comn	340	77%	99%	100%	100%	100%	100%	78%	62%	43%	35%	40%	39%	73%	
7534	1,55	53,4	Comn	340	77%	93%	89%	64%	64%	100%	83%	62%	35%	26%	80%	83%	93%	
15070	2,28	44,1	Comn	339	77%	85%	89%	68%	64%	100%	73%	85%	78%	70%	90%	83%	93%	
10426	1,52	55	Comn	338	77%	89%	100%	68%	45%	0%	80%	69%	43%	43%	90%	83%	100%	
950	2,08	25,4	Comn	337	77%	69%	100%	89%	73%	100%	69%	85%	87%	96%	100%	100%	93%	
4109	1,42	52,3	Comn	337	77%	92%	89%	89%	82%	0%	80%	54%	35%	26%	80%	72%	87%	
1587	3,99	29,7	Comn	333	76%	92%	100%	71%	73%	50%	82%	69%	48%	48%	40%	33%	73%	
1219	2,74	31,2	Comn	331	75%	79%	67%	68%	73%	50%	70%	77%	78%	96%	90%	100%	73%	
1193	2,66	35,4	Comn	331	75%	86%	89%	75%	36%	50%	75%	62%	61%	83%	80%	61%	87%	
1432	3,41	36,8	Comn	330	75%	88%	100%	96%	91%	50%	84%	77%	43%	17%	20%	11%	67%	

Erläuterungen: Die Zahlen geben das Auftreten (Frequenz) der einzelnen Polypeptide, die durch Masse und CE-Zeit definiert sind, wieder. Aufgeführt sind alle Polypeptide, die in insgesamt mehr als 75% aller Proben vorhanden sind. Die Zahlen in der Kopfzeile geben die Gesamtzahl der Proben in der jeweiligen Gruppe wieder. Die aufgeführten zwei Patienten in der Gruppe D1P2 sind für eine Klassifizierung viel zu wenig, fallen hier aber nicht ins Gewicht.

Marker des Krankheitszustandes Diabetes (Typ II)

Für die Herausarbeitung der Marker für Diabetes wurden die vier Gruppen mit Diabetikern des Typs II mit beiden Gruppen der Kontrollpatienten verglichen. Im Rahmen der hier untersuchten Proben konnten dabei keine Polypeptide identifiziert werden, die in Frequenz oder Amplitude in den Gruppen der Diabetiker in relevanter Weise zunehmen. Die Polypeptide, die im Vergleich am stärksten zunehmen, sind gleichzeitig auch in den anderen, nicht verwendeten Gruppen verstärkt vorhanden. Hingegen können 46 Kandidaten beobachtet werden, die mehr als 40 % seltener in den Patienten vorkommen als in den Kontrollgruppen. 31 dieser Polypeptide können aufgrund ihres Verteilungsmusters als brauchbare Marker für den Zustand „Diabetes Typ II“ betrachtet werden (Tabelle 3.13). Das resultierende Muster dieser Marker ist in Abbildung 3.14 dargestellt. Abbildung 3.15 schließlich zeigt exemplarisch die Frequenz mit der eines dieser Polypeptide in den betrachteten Gruppen auftritt. Es ist zu erkennen, dass dieses Polypeptid mit einer Masse von 1.134,63 Da und einer CE-Migrationszeit von 35,9 Minuten in praktisch allen Proben gefunden werden konnte. Lediglich die Proben der betrachteten Diabetiker des Typs II zeigen ein vermindertes Auftreten dieses Proteins. Die Gruppe D1P2 kann hier vernachlässigt werden, da die betrachtete Anzahl an Patienten zu gering ist.

Tabelle 3.13: Markerpeptide für Diabetes Typ II im Urin.

ID	Identifikation			Gesamt Σ n (439)	%	Kontrollen		Diabetes Typ I			Diabetes Typ II			andere Nephritis			
	Masse [kDa]	Zeit [min]	Typ			Erw. (85)	Kind. (9)	D1P0 (28)	D1P1 (11)	D1P2 (2)	D2P0 (202)	D2P1 (13)	D2P2 (23)	D2P3 (23)	FSGS (10)	MNGN (18)	MCD (15)
11133	2,74	41	D2-	153	35%	69%	56%	4%	18%	0%	34%	15%	13%	0%	40%	28%	27%
4481	2,02	39,4	D2-	117	27%	59%	56%	14%	0%	0%	19%	15%	26%	9%	40%	22%	13%
7408	1,38	54,3	D2-	163	37%	65%	67%	39%	27%	0%	28%	15%	4%	22%	50%	56%	60%
3934	1,21	50,5	D2-	189	43%	69%	78%	68%	55%	0%	33%	23%	13%	22%	40%	50%	53%
13701	3,11	40,4	D2-	198	45%	73%	89%	61%	27%	50%	33%	31%	30%	43%	70%	50%	27%
5012	3,33	41,3	D2-	116	26%	58%	56%	21%	0%	50%	19%	15%	9%	0%	20%	11%	60%
1074	2,36	33,8	D2-	217	49%	76%	67%	68%	27%	50%	33%	23%	35%	48%	70%	89%	73%
13083	1,89	58,1	D2-	214	49%	78%	89%	71%	55%	50%	42%	15%	26%	13%	40%	28%	53%
3919	1,19	49,5	D2-	244	56%	86%	67%	75%	64%	50%	45%	31%	30%	35%	30%	56%	93%
12675	1,35	39,4	D2-	193	44%	74%	67%	64%	55%	100%	32%	23%	9%	35%	40%	39%	60%
4368	1,82	42,3	D2-	154	35%	69%	56%	32%	36%	50%	27%	8%	17%	13%	40%	33%	20%
6942	0,92	47,3	D2-	129	29%	54%	89%	54%	27%	50%	15%	15%	0%	9%	40%	61%	40%
3853	1,12	50,6	D2-	168	38%	71%	78%	46%	45%	0%	29%	15%	22%	26%	30%	28%	27%
3855	1,13	49,8	D2-	203	46%	74%	78%	64%	27%	0%	31%	31%	17%	39%	70%	72%	87%
1395	3,28	35,8	D2-	258	59%	96%	67%	68%	36%	50%	57%	23%	22%	13%	50%	28%	60%
11634	4,1	36,7	D2-	109	25%	61%	67%	4%	0%	50%	18%	15%	17%	4%	20%	6%	20%
4075	1,38	43,1	D2-	206	47%	76%	100%	71%	55%	100%	35%	38%	39%	9%	20%	39%	53%
4096	1,41	51,8	D2-	241	55%	85%	100%	71%	55%	50%	43%	31%	43%	17%	50%	72%	73%
4097	1,41	51	D2-	259	59%	91%	89%	68%	73%	50%	47%	46%	39%	26%	70%	72%	73%
3910	1,18	49,3	D2-	126	29%	62%	33%	75%	36%	50%	12%	23%	4%	13%	10%	39%	27%
4533	2,12	39,4	D2-	163	37%	67%	56%	57%	36%	50%	17%	15%	13%	35%	70%	78%	73%
8525	3,72	43,7	D2-	145	33%	69%	56%	29%	45%	50%	23%	31%	4%	0%	30%	17%	67%
1411	3,34	34,4	D2-	152	35%	71%	56%	61%	36%	0%	22%	0%	22%	13%	30%	22%	40%
1164	2,59	28,5	D2-	192	44%	79%	100%	64%	45%	0%	36%	15%	13%	9%	40%	11%	53%
1390	3,27	31,4	D2-	203	46%	85%	56%	82%	73%	50%	36%	23%	13%	13%	20%	11%	60%
198	0,98	33,7	D2-	157	36%	78%	33%	43%	27%	0%	24%	31%	13%	9%	20%	39%	40%
375	1,16	48,3	D2-	242	55%	89%	89%	79%	55%	0%	42%	31%	22%	22%	60%	67%	87%
10882	2,23	39,5	D2-	140	32%	73%	56%	29%	27%	50%	22%	0%	9%	0%	40%	6%	60%
1186	2,64	28,5	D2-	188	43%	82%	67%	79%	45%	50%	29%	8%	26%	13%	40%	11%	60%
4784	2,69	43,1	D2-	156	36%	75%	67%	61%	36%	0%	19%	23%	17%	13%	40%	22%	60%
351	1,13	35,9	D2-	252	57%	92%	100%	89%	100%	50%	34%	15%	35%	43%	90%	94%	93%

Erläuterungen: Der Typ D2- beschreibt diejenigen Polypeptide, die im Fall der Diabetiker des Typs II reduziert auftreten.

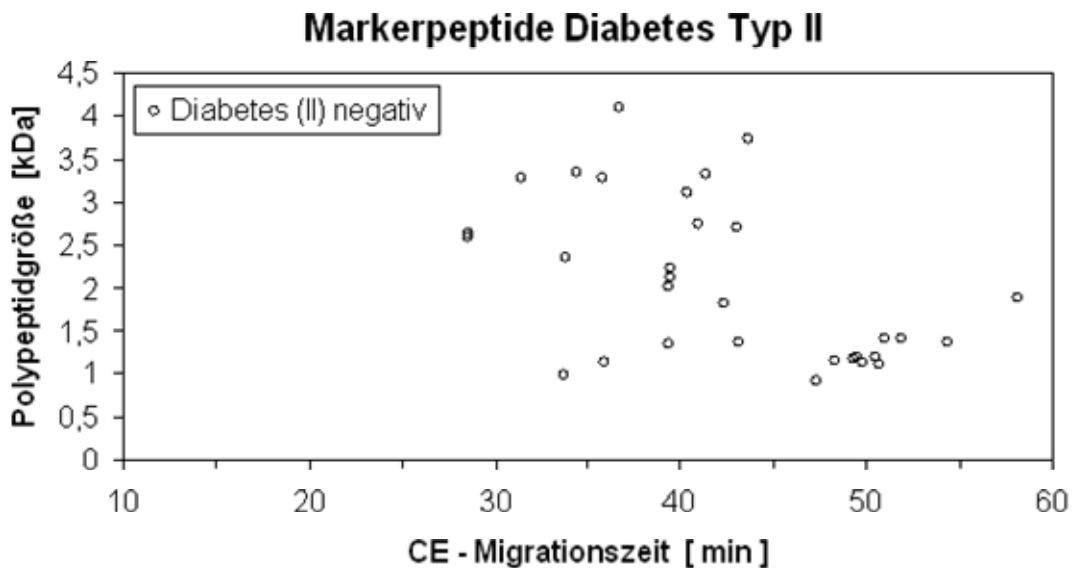


Abbildung 3.14: Markerpeptide für Diabetes Typ II im Urin.
 Jeder Kreis zeigt die Lage eines als Polypeptides an, welches aufgrund seines Auftretens in den betrachteten Gruppen als „untypisch“ für Diabetes Typ II eingeschätzt wurde, also in derartigen Proben fehlt („Diabetes (II) negativ“).

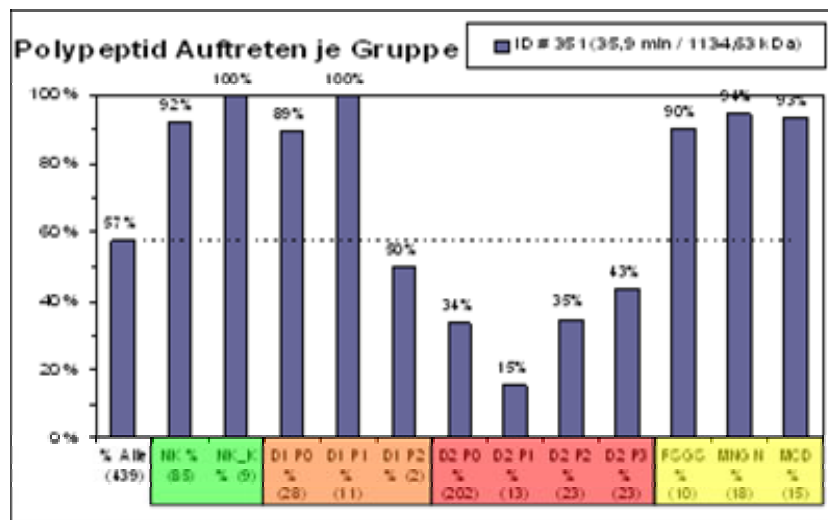


Abbildung 3.15: Verteilungsmuster eines Polypeptides innerhalb der betrachteten Gruppen.
 Die Säulen zeigen das Auftreten des Polypeptides # 351 (1134,63 Da / 35,9 min) innerhalb der einzelnen Patientengruppen. In allen Diabetiker Typ II Gruppen ist das Vorkommen des Polypeptides deutlich vermindert.

Marker des Krankheitszustandes Diabetes (Typ I)

Aufgrund der Tatsache, dass der Typ I Diabetes durch andere Ursachen bedingt ist, ist er in dieser Untersuchung auch getrennt von dem Typ II behandelt worden. Da die Anzahl der zur Verfügung stehenden Proben jedoch sehr gering gewesen ist, sollen

als Markerpeptide nur diejenigen verwendet werden, die eindeutige Änderungen zwischen den Gruppen zeigen.

Auch bei Typ I Diabetes können erheblich mehr vermindert auftretende Markerpeptide beobachtet werden als solche, die mit verstärkter Häufigkeit vorkommen. Die vorgegebene Mindestvoraussetzung von 40 % Frequenz-Differenz erzielen 40 positiv und 231 negativ veränderte Polypeptide. Nach Betrachtung der einzelnen Verteilungsmuster verbleiben allerdings nur 4 positive und 7 negative, die unter Berücksichtigung der geringen Anzahl an Proben und ihrem Verhalten in den anderen Gruppen als Markerpeptide dienen können. Das resultierende Muster ist in Abbildung 3.17 dargestellt. Tabelle 3.16 fasst die Frequenzen innerhalb der untersuchten Gruppen zusammen. Von den ausgewählten Polypeptiden ist nur eines auch in der Gruppe der Diabetes Typ II definierenden zu finden.

Tabelle 3.16: Markerpeptide für Diabetes Typ I im Urin.

ID	Identifikation		Typ	Gesamt		Kontrollen		Diabetes Typ I			Diabetes Typ II				andere Nephritis		
	Masse [kDa]	Zeit [min]		Σ n (439)	%	Erw. (85)	Kind. (9)	D1P0 (28)	D1P1 (11)	D1P2 (2)	D2P0 (202)	D2P1 (13)	D2P2 (23)	D2P3 (23)	FSGS (10)	MNGN (18)	MCD (15)
42	0,83	25,6	D1+	69	16%	8%	0%	64%	45%	100%	6%	23%	4%	43%	40%	22%	13%
4246	1,62	38,8	D1+	114	26%	35%	11%	71%	45%	50%	17%	8%	30%	13%	20%	28%	33%
144	0,93	24,4	D1+	49	11%	11%	0%	64%	27%	0%	6%	0%	4%	9%	10%	0%	13%
512	1,33	36,5	D1+	47	11%	11%	0%	61%	36%	0%	5%	0%	4%	13%	20%	0%	0%
4851	2,86	39,8	D1-	126	29%	31%	56%	11%	9%	0%	24%	23%	26%	39%	20%	78%	60%
2071	6,17	38,8	D1-	324	74%	89%	89%	46%	27%	0%	81%	85%	70%	43%	40%	44%	73%
7770	1,91	38,4	D1-	346	79%	85%	100%	43%	64%	50%	83%	92%	78%	52%	70%	78%	93%
4843	2,84	37	D1-	219	50%	52%	67%	11%	9%	50%	58%	54%	57%	39%	40%	39%	47%
4661	2,39	36,6	D1-	344	78%	82%	89%	29%	45%	50%	80%	92%	74%	91%	100%	89%	93%
11634	4,1	36,7	D1-	109	25%	61%	67%	4%	0%	50%	18%	15%	17%	4%	20%	6%	20%
7642	1,7	45,8	D1-	237	54%	52%	100%	29%	18%	100%	54%	69%	52%	39%	70%	67%	87%

Erläuterungen: Der Typ D1+ beschreibt diejenigen Polypeptide, die im Fall der Diabetiker des Typs II vermehrt auftreten. Polypeptide des Typs D1- treten hingegen vermindert auf.

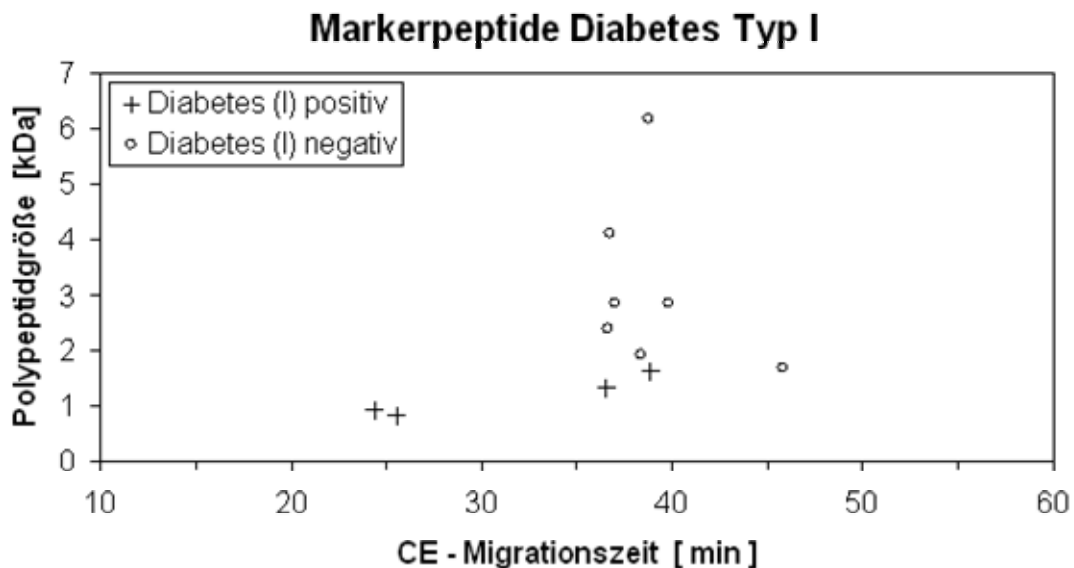


Abbildung 3.17: Muster der Marker-Polypeptide für Diabetes Typ I im Urin.

Die bei den Diabetikern des Typs I häufiger auftretenden Polypeptide (D1+) sind durch ein „+“, die seltener auftretenden durch einen Kreis „o“ dargestellt.

Marker der diabetischen Nephropathie (Typ II)

Polypeptide können dann als Marker für die (diabetische) Nephropathie dienen, wenn sie in Frequenz oder Amplitude in den Gruppen der eindeutigen Krankheitszustände (D2P2 und D2P3) im Gegensatz zu den in dieser Beziehung als gesund eingestuften Gruppen (Kontrolle und D2P0) deutlich erhöht oder verringert sind. Ein weiterer Hinweis auf das Vorhandensein eines Markers liegt dann vor, wenn er sich im Vergleich der Gruppen Kontrolle→D2P0→D2P1→D2P2→D2P3 logisch verhält, das heißt konsequent ansteigt oder abfällt. Der Vergleich mit den anderen Typen der Nephropathie zeigt, ob es sich bei dem gefundenen Marker um einen für die diabetische Nephropathie typischen oder um einen allgemeinen Nephritis-Marker handelt.

Bei der Untersuchung der vorliegenden Proben im Bezug auf die Polypeptidhäufigkeit können eine Reihe von möglichen Markerpeptiden beobachtet werden, welche erkennbar verstärkt oder reduziert vorliegen. Das Verhältnis zwischen den untersuchten Gruppen ist in beiden Richtungen relativ groß (bis + 73 %, bzw. bis - 64 %) und die auch gleichmäßig verteilt. Das gesetzte Kriterium von wenigstens 40 % Gruppendifferenz erfüllen 88 bzw. 60 Polypeptide. Aus diesen sind nach individueller Betrachtung der Verteilungsmuster 46 positive (D2N+) und 30 negative (D2N-) ausgewählt worden, die in Tabelle 3.18 dargestellt sind. Neben denjenigen Polypeptiden, die aufgrund der Frequenz ihres Auftretens als Marker definiert werden, können auch solche gefunden werden, die zwar regelmäßig in fast allen Proben vorhanden sind, im Bezug auf ihre Amplitude aber deutlichen Veränderungen unterliegen. Aus diesen konnten 6 im Krankheitsfall mit erhöhter Amplitude auftretende (D2NA+), und 5 mit verminderter Amplitude auftretende (D2NA-) Marker ermittelt werden.

In vielen Fällen korreliert die beobachtete Veränderung der Häufigkeit des Auftretens, also der Frequenz innerhalb einer betrachteten Gruppe, mit einer Veränderung der mittleren Amplitude. Treten Signale mit hoher Amplitude auf, werden diese auch in den meisten Proben gefunden. Sinkt hingegen die Signalintensität, so fallen viele dieser Signale unter die Detektionsgrenze, so dass auch die berechnete Frequenz abfällt. Aus diesem Grund kann für die meisten der ermittelten Marker auch eine „Grenzamplitude“ festgelegt werden, die zusätzlich zu der Frage des Auftretens zwischen den Gruppen diskriminiert. Die Einbeziehung einer solchen Trennvariablen verbessert die Aussagekraft des Peptidmusters, da nah an der Nachweisgrenze liegende Signale nicht weiter berücksichtigt werden. Die verwendeten Nachweisgrenzen sind in der Tabelle 3.18 aufgeführt.

Tabelle 3.18: Marker „Diabetische Nephropathie“ im Urin. (Fortsetzung)

ID	Identifikation			Nachweis F	Gr.- Amp.	Kontrollen		Diabetes Typ I			Diabetes Typ II			andere Nephritis			
	Masse [kDa]	Zeit [min]	Typ			Erw.	Kind.	D1P0 (28)	D1P1 (11)	D1P2 (2)	D2P0 (202)	D2P1 (13)	D2P2 (23)	D2P3 (23)	FSGS (10)	MNGN (18)	MCD (15)
3981	1,26	49,4	D2N-	-0,55	500	91%	89%	61%	45%	50%	80%	69%	39%	17%	70%	67%	87%
7534	1,55	53,4	D2N-	-0,55	2000	93%	89%	64%	64%	100%	83%	62%	35%	26%	80%	83%	93%
7558	1,58	54,6	D2N-	-0,59	500	85%	100%	50%	45%	0%	73%	54%	22%	13%	80%	28%	60%
7634	1,69	54,9	D2N-	-0,60	300	69%	89%	75%	55%	50%	74%	46%	17%	9%	60%	50%	73%
4266	1,65	54,8	D2N-	-0,61	1000	91%	100%	68%	64%	50%	79%	62%	17%	26%	60%	72%	100%
7623	1,67	55,5	D2N-	-0,64	500	81%	100%	71%	45%	0%	75%	85%	17%	9%	70%	50%	87%
1225	2,75	25,6	D2NA+	0,5	20000	27%	56%	25%	18%	50%	60%	77%	91%	91%	80%	94%	67%
2646	10,1	18,7	D2NA+	0,5	10000	19%	44%	7%	27%	100%	54%	77%	70%	91%	90%	100%	87%
826	1,83	28,6	D2NA+	0,5	10000	65%	89%	86%	91%	100%	79%	92%	96%	83%	100%	100%	87%
1016	2,23	28	D2NA+	0,5	5000	53%	100%	64%	91%	100%	67%	92%	96%	100%	100%	94%	87%
786	1,75	27,6	D2NA+	0,5	1500	53%	78%	50%	73%	50%	66%	92%	91%	100%	90%	100%	73%
555	1,39	28	D2NA+	0,5	2000	38%	89%	68%	64%	100%	73%	100%	96%	100%	80%	100%	80%
404	1,19	38,2	D2NA-	-0,5	1000	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	87%	91%	80%	89%	93%
935	2,05	31	D2NA-	-0,5	1000	92%	56%	96%	91%	50%	64%	69%	48%	48%	40%	61%	87%
3985	1,27	40,4	D2NA-	-0,5	1000	93%	100%	79%	91%	100%	77%	69%	70%	74%	90%	78%	100%
8441	3,46	43,9	D2NA-	-0,5	2000	94%	100%	75%	82%	100%	86%	92%	70%	61%	80%	61%	87%
7461	1,45	41,9	D2NA-	-0,5	4000	96%	100%	71%	82%	100%	90%	100%	91%	87%	90%	83%	100%

Erläuterungen: Typen: Marker positiv für diabetische Nephropathie wenn vorhanden (D2N+), negativ wenn vorhanden (D2N-), positiv wenn oberhalb der Amplitudengrenze (D2NA+), negativ wenn oberhalb der Amplitudengrenze (D2NA-). Die Amplitudengrenzen (Gr.-Amp.) sind soweit möglich für jeden Marker angegeben, um die Nachweissicherheit zu erhöhen. Der Faktor „F“ drückt die Unterschiede zwischen den betrachteten Gruppen aus. Im Fall der reinen Amplitudenentscheidungen ist F auf 0,5 bzw. -0,5 gesetzt worden.

Das aus diesen Markern resultierende und in weiterer Folge für die Klassifizierung unbekannter Proben anzuwendende Muster ist in Abbildung 3.19 (oben) dargestellt. Weiterhin zeigt Abbildung 3.19 beispielhaft die Frequenzen und mittleren Amplituden dreier Polypeptide aus Tabelle 3.18 (I-III).

Das in Abbildung 3.19 unter (I) gezeigte Polypeptid (# 695, M = 1,6 kDa, t = 28,9 min) ist bei den gesunden Kontrollpatienten nur in etwa 10 % aller Fälle zu finden. Diabetiker ohne erhöhte Proteinausscheidung zeigen dieses in 19 % aller Fälle. Die mittlere Amplitude liegt bei diesen Gruppen zwischen 80 und 160. Mit steigender Proteinurie steigen sowohl die Häufigkeit, wie auch die Amplitude mit der dieses Peptid detektiert werden kann (D2P1: 62 %, 520 – D2P2: 78 %, 691 – D2P3: 100 %, 551). Das gezeigte Polypeptid kann daher als Marker für die diabetische Nephropathie angesehen werden. Die Amplitudengrenze ist auf 400 festgelegt worden und der Diskriminierungsfaktor beträgt +0,73. Bei der Betrachtung der anderen Nephropathie-Gruppen (FSGS, MNGN, MCD) wird ersichtlich, dass das gezeigte Polypeptid dort ebenfalls deutlich verstärkt auftritt. Es handelt sich daher hierbei eher um einen allgemeinen Nephritis-Marker, als um einen spezifischen Marker für die diabetische Nephropathie.

Markerpeptide (diabetische) Nephropathie

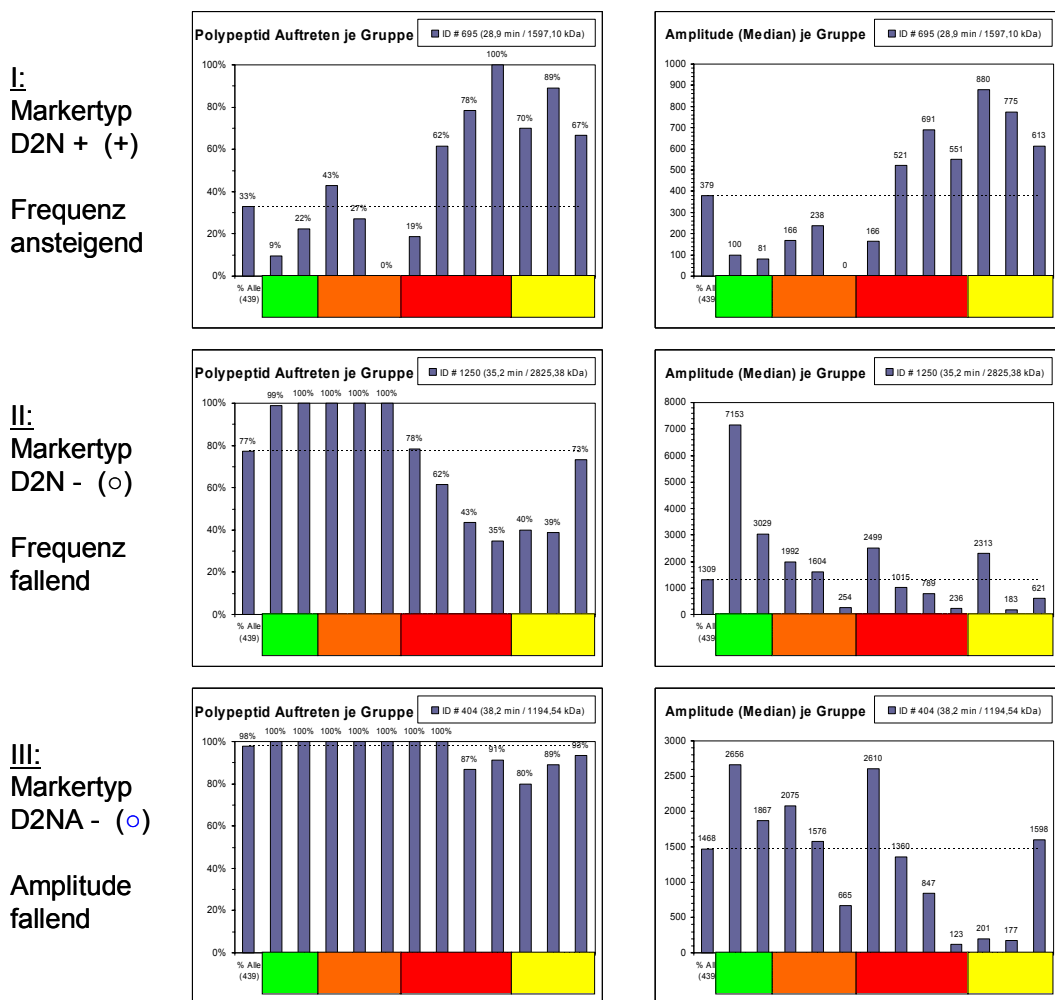
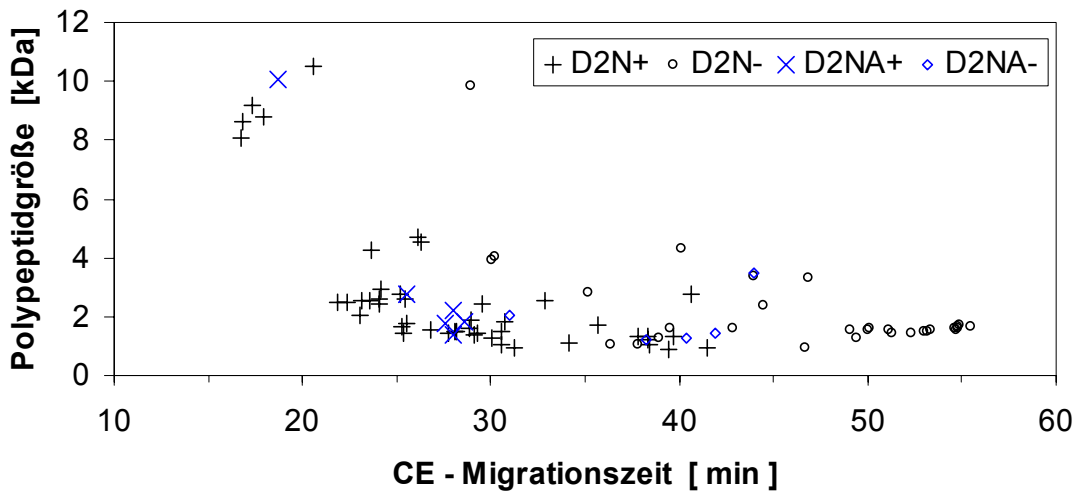


Abbildung 3.19: Muster der Marker-Polypeptide für die diabetische Nephropathie (Typ II).

Die bei den Patienten mit diabetischer Nephropathie häufiger auftretenden Polypeptide (D2N+) sind durch ein schwarzes Plus „+“ und die seltener auftretenden (D2N-) durch einen schwarzen Kreis „o“ symbolisiert. Die blauen Symbole zeigen Polypeptide, welche in ihrer Amplitude deutlich erhöht (D2NA+, „x“) oder verringert (D2NA-, „o“) sind. Die Säulendiagramme I – III zeigen die Frequenzen (links) und mittleren Amplituden (rechts) dreier ausgewählter Polypeptide innerhalb der Gruppen. Dabei ist (I) häufiger und (II) seltener im Krankheitsfall zu finden. Beispiel (III) zeigt ein im Krankheitsfall mit reduzierter Amplitude auftretendes Polypeptid.

Bei dem unter (II) gezeigten Marker (# 1250, M = 2,83 kDa, t = 35,2 min) handelt es sich um Polypeptid, welches sich genau umgekehrt verhält. Es konnte in dem Urin fast aller Kontrollpatienten detektiert werden, sinkt aber in Frequenz und Amplitude mit zunehmender renaler Schädigung. Die Amplitudengrenze für dieses Polypeptid ist auf 1000 und der Diskriminierungsfaktor definitionsgemäß auf -0,45 festgelegt worden.

Das Peptid unter (III) schließlich konnte, wie die linke Säulengruppe zeigt, in fast allen der untersuchten Proben beobachtet werden. Erst die Einbeziehung der ermittelten Amplituden zeigt, dass es sich bei diesem Polypeptid (# 404, M = 1,19 kDa, t = 38,2 min) um einen brauchbaren Marker handelt. Während die mittlere Amplitude innerhalb der Gruppe D2P0 mit 2600 noch auf dem selben Niveau befindet, wie bei den Kontrollpatienten, nimmt diese über D2P1 (1360) und D2P2 (847) bis D2P3 (123) schnell ab. Als Grenzamplitude ist in diesem Fall der Wert 1000 verwendet und der Diskriminierungsfaktor ist auf 0,5 festgelegt worden.

Das in Abbildung 3.19 dargestellte Muster der diskriminatorischen Polypeptide zeigt eine auffällige Besonderheit in der Verteilung der gefundenen Marker. Diejenigen, die im Krankheitsfall verstärkt bzw. neu auftreten („+“) sind vermehrt im vorderen Teil der Abbildung mit kurzen Migrationszeiten zu finden. Auch handelt es sich bei vielen dieser Marker um relativ große Polypeptide von bis zu 11 kDa. Solche, die in geringerem Maße auftreten, sind hingegen verstärkt im hinteren Teil der Abbildung mit langen Migrationszeiten zu finden.

Marker „Nephritis allgemein“

Bei fast allen der gefundenen Marker ist im positiven Fall kein Unterschied zu den Gruppen der anderen nephritischen Erkrankungen zu erkennen. Es scheint sich im Wesentlichen um allgemeine Marker für Nierenschädigungen zu handeln. Dies wird um so deutlicher, wenn die drei anderen betrachteten Nierenerkrankungen mit berücksichtigt werden. Von den 50 deutlichsten positiven Polypeptid-Markern sind 42 in der Liste der Marker für die diabetische Nephropathie vorhanden. Das in Tabelle 3.20 und Abbildung 3.21 gezeigte Muster für ein allgemeines Nephritis-Pattern gleicht daher auch deutlich dem der diabetischen Nephropathie.

3.2 Ergebnisse der Untersuchungen zur diabetischen Nephropathie

Tabelle 3.20: Marker „Nephropathie“ im Urin

ID	Identifikation		Typ	Nachweis		Kontrollen		Diabetes Typ I			Diabetes Typ II			andere Nephritis			
	Masse kDa	Zeit min		F	Gr.- Amp.	Erw. (85)	Kind. (9)	D1P0 (28)	D1P1 (11)	D1P2 (2)	D2P0 (202)	D2P1 (13)	D2P2 (23)	D2P3 (23)	FSGS (10)	MNGN (18)	MCD (15)
3987	1,27	44	Nep-	-0,54		74%	89%	79%	36%	50%	52%	62%	43%	9%	30%	6%	13%
1351	3,14	37,4	Nep-	-0,54		82%	78%	68%	18%	0%	50%	31%	17%	26%	40%	6%	67%
3841	1,11	48,9	Nep-	-0,54		61%	0%	25%	18%	0%	7%	15%	4%	0%	10%	6%	20%
4933	3,09	44,4	Nep-	-0,55		89%	100%	61%	36%	50%	50%	62%	22%	4%	50%	50%	73%
10882	2,23	39,5	Nep-	-0,55		73%	56%	29%	27%	50%	22%	0%	9%	0%	40%	6%	60%
198	0,98	33,7	Nep-	-0,55		78%	33%	43%	27%	0%	24%	31%	13%	9%	20%	39%	40%
1186	2,64	28,5	Nep-	-0,55		82%	67%	79%	45%	50%	29%	8%	26%	13%	40%	11%	60%
1600 *	4,04	30,2	Nep-	-0,55		84%	100%	64%	55%	50%	65%	31%	22%	26%	40%	11%	53%
7580	1,61	55	Nep-	-0,56		86%	100%	46%	45%	0%	54%	77%	22%	17%	50%	22%	60%
1432 *	3,41	36,8	Nep-	-0,57		88%	100%	96%	91%	50%	84%	77%	43%	17%	20%	11%	67%
3871	1,14	36,9	Nep-	-0,57		74%	100%	36%	18%	0%	47%	54%	26%	13%	10%	11%	20%
1164	2,59	28,5	Nep-	-0,57		79%	100%	64%	45%	0%	36%	15%	13%	9%	40%	11%	53%
4847 *	2,85	37,3	Nep-	-0,60		78%	89%	43%	73%	100%	55%	38%	13%	4%	30%	11%	47%
1312	3,01	30,9	Nep-	-0,61		82%	67%	68%	82%	100%	41%	8%	17%	0%	30%	22%	53%
1373	3,21	33,5	Nep-	-0,61		93%	100%	68%	64%	50%	57%	15%	26%	4%	30%	39%	73%
3773 *	1,05	37,8	Nep-	-0,62		85%	78%	86%	91%	0%	55%	38%	30%	4%	40%	6%	47%
1372	3,21	26,3	Nep-	-0,63		78%	33%	14%	9%	0%	55%	31%	0%	9%	40%	6%	40%
1390	3,27	31,4	Nep-	-0,63		85%	56%	82%	73%	50%	36%	23%	13%	13%	20%	11%	60%
1395 *	3,28	35,8	Nep-	-0,66		96%	67%	68%	36%	50%	57%	23%	22%	13%	50%	28%	60%
695 *	1,6	28,9	Nep+	0,74		9%	22%	43%	27%	0%	19%	62%	78%	100%	70%	89%	67%
1758 *	4,71	26,1	Nep+	0,72		4%	22%	0%	9%	50%	15%	46%	61%	96%	70%	94%	47%
1140 *	2,52	23,6	Nep+	0,70		15%	22%	21%	9%	50%	30%	85%	87%	100%	70%	89%	67%
677 *	1,57	26,8	Nep+	0,70		19%	22%	25%	27%	50%	28%	85%	78%	100%	100%	100%	67%
634 *	1,5	30,6	Nep+	0,70		20%	78%	39%	45%	100%	46%	85%	87%	100%	80%	100%	73%
1147 *	2,54	23,1	Nep+	0,68		12%	22%	25%	45%	50%	34%	69%	78%	96%	60%	89%	60%
838	1,85	29,7	Nep+	0,66		25%	78%	61%	64%	100%	59%	92%	96%	100%	80%	94%	73%
1128 *	2,49	22,3	Nep+	0,65		18%	11%	29%	36%	50%	35%	54%	83%	87%	80%	100%	60%
932 *	2,04	23,1	Nep+	0,65		24%	56%	29%	55%	100%	38%	69%	74%	91%	100%	100%	87%
4042 *	1,34	38,3	Nep+	0,65		14%	0%	11%	36%	0%	12%	23%	61%	96%	80%	94%	60%
728 *	1,65	25,3	Nep+	0,64		18%	11%	25%	27%	100%	23%	54%	70%	91%	80%	94%	73%
1648 *	4,24	23,7	Nep+	0,64		19%	44%	18%	55%	100%	39%	77%	65%	96%	80%	100%	73%
612 *	1,47	28,2	Nep+	0,64		7%	22%	36%	18%	0%	10%	54%	57%	78%	60%	94%	60%
1117 *	2,47	21,8	Nep+	0,64		8%	56%	25%	18%	50%	21%	54%	65%	78%	80%	83%	53%
2698 *	10,5	20,6	Nep+	0,61		9%	44%	0%	36%	100%	40%	62%	57%	87%	60%	72%	73%
348 *	1,13	34,2	Nep+	0,61		14%	56%	14%	27%	0%	26%	38%	74%	78%	80%	89%	53%
480 *	1,29	30,1	Nep+	0,61		15%	11%	50%	36%	100%	13%	38%	52%	91%	80%	100%	60%
4722 *	2,54	37,8	Nep+	0,61		15%	11%	11%	18%	0%	9%	38%	52%	87%	90%	94%	67%
4442	1,95	38,7	NepA-	-0,50	1000	80%	100%	71%	73%	0%	81%	77%	70%	70%	80%	72%	100%
7461 *	1,45	41,9	NepA-	-0,50	5000	96%	100%	71%	82%	100%	90%	100%	91%	87%	90%	83%	100%
3942 *	1,22	48,2	NepA-	-0,50	3000	84%	100%	82%	82%	100%	87%	77%	48%	87%	90%	67%	93%
7770	1,91	38,4	NepA-	-0,50	20000	85%	100%	43%	64%	50%	83%	92%	78%	52%	70%	78%	93%
3985 *	1,27	40,4	NepA-	-0,50	1000	93%	100%	79%	91%	100%	77%	69%	70%	74%	90%	78%	100%
10426	1,52	55	NepA-	-0,50	3000	89%	100%	68%	45%	0%	80%	69%	43%	43%	90%	83%	100%
8441 *	3,46	43,9	NepA-	-0,50	3000	94%	100%	75%	82%	100%	86%	92%	70%	61%	80%	61%	87%
1250 *	2,83	35,2	NepA-	-0,50	1500	99%	100%	100%	100%	100%	78%	62%	43%	35%	40%	39%	73%
2646 *	10,1	18,7	NepA+	0,50	10000	19%	44%	7%	27%	100%	54%	77%	70%	91%	90%	100%	87%
2485 *	8,77	17,9	NepA+	0,50	7500	26%	78%	14%	36%	100%	57%	85%	96%	91%	80%	100%	93%
1225 *	2,75	25,6	NepA+	0,50	20000	27%	56%	25%	18%	50%	60%	77%	91%	91%	80%	94%	67%
1101 *	2,43	24,1	NepA+	0,50	5000	38%	33%	61%	45%	100%	52%	92%	87%	100%	90%	100%	73%
687 *	1,58	28,1	NepA+	0,50	2500	47%	67%	68%	64%	100%	65%	100%	96%	100%	80%	100%	87%
1016 *	2,23	28	NepA+	0,50	7500	53%	100%	64%	91%	100%	67%	92%	96%	100%	100%	94%	87%
755 *	1,7	28,8	NepA+	0,50	4000	53%	56%	50%	55%	100%	65%	100%	96%	100%	90%	100%	80%
765 *	1,72	28,3	NepA+	0,50	10000	60%	100%	89%	82%	100%	81%	92%	100%	100%	100%	100%	87%
826 *	1,83	28,6	NepA+	0,50	10000	65%	89%	86%	91%	100%	79%	92%	96%	83%	100%	100%	87%
950 *	2,08	25,4	NepA+	0,50	7500	69%	100%	89%	73%	100%	69%	85%	87%	96%	100%	100%	93%

Erläuterungen: Typen: Marker positiv für Nephropathie wenn vorhanden (Nep+), negativ wenn vorhanden (Nep-), positiv wenn oberhalb der Amplitudengrenze (NepA+), negativ wenn oberhalb der Amplitudengrenze (NepA-). Ein Stern hinter der Identifikationsnummer zeigt an, dass das genannte Polypeptid auch in der Liste „Marker diabetische Nephropathie“ aufgeführt ist.

Differenzielle Marker der diabetischen Nephropathie

Da es aufgrund unterschiedlicher Behandlungsmöglichkeiten sinnvoll ist, die Diagnose „Nephropathie“ genauer definieren zu können, wäre es wünschenswert ein Diagnosemuster zu finden, welches zwischen den verschiedenen Arten der Nieren-

schädigungen – hier FSGS, MNGN, MCD und diabetische Nephropathie – differenzieren kann.

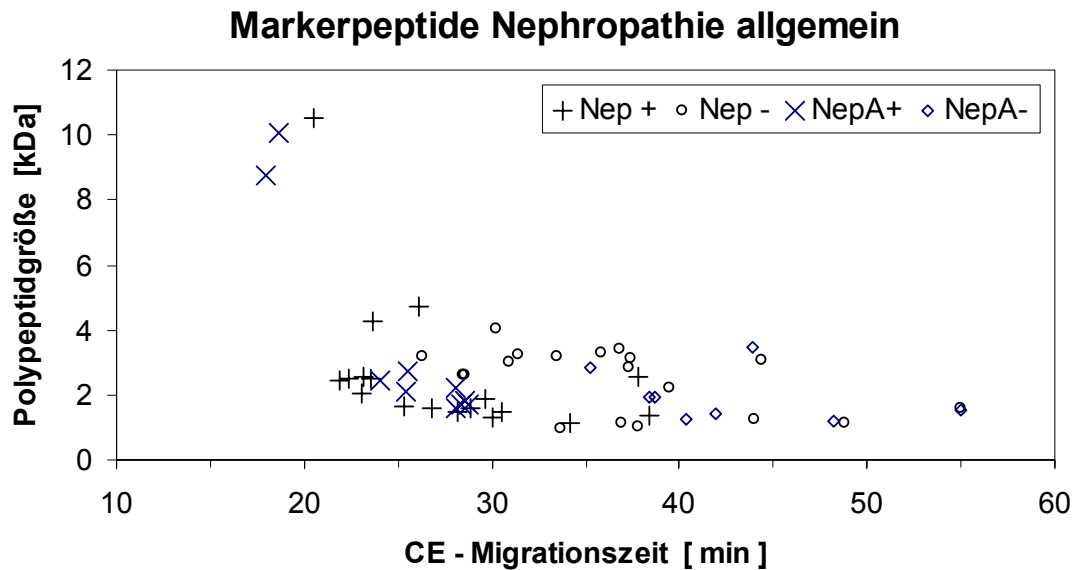


Abbildung 3.21: Muster der Marker-Polypeptide einer allgemeinen (undifferenzierten) Nephritis.
 Dabei bedeuten: „+“ Polypeptide, die im Krankheitsfall häufiger auftreten und „o“ solche, die seltener auftreten. „x“ Amplitude ist deutlich erhöht und „◇“ erniedrigt.

Da, wie oben gezeigt, die unabhängig von einander erstellten Muster der einzelnen Krankheitsformen sehr ähnlich sind, wurden weitere Markerlisten im Sinne von differenzialdiagnostischen Markern erstellt, bei deren Auswahl zunächst nach einem möglichst deutlichen Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen gesucht und erst in zweiter Linie darauf geachtet wurde, dass sich der Marker auch noch von dem Zustand „gesund“ unterscheidet.

Tabelle 3.22: „differentielle Marker der diabetischen Nephropathie“ im Urin.

ID	Identifikation		Nachweis		Kontrollen		Diabetes Typ I			Diabetes Typ II			andere Nephritis				
	Masse	Zeit	F	Gr.-	Erw.	Kind.	D1P0	D1P1	D1P2	D2P0	D2P1	D2P2	D2P3	FSGS	MNGN	MCD	
	kDa	min		Amp.	(85)	(9)	(28)	(11)	(2)	(202)	(13)	(23)	(23)	(10)	(18)	(15)	
789	1,76	26,6	dDN+	0,38	2000	29%	89%	57%	64%	100%	63%	92%	87%	96%	50%	67%	40%
1287 *	2,94	24,2	dDN+	0,36	1000	16%	22%	25%	36%	100%	37%	69%	78%	100%	50%	56%	53%
1178 *	2,62	25,4	dDN+	0,34	3000	12%	11%	29%	27%	0%	26%	46%	83%	87%	40%	56%	53%
1238 *	2,79	25,2	dDN+	0,29	3000	21%	78%	46%	36%	100%	45%	69%	91%	91%	60%	67%	60%
858	1,89	31,4	dDN+	0,28	500	18%	33%	36%	27%	100%	43%	46%	57%	87%	70%	39%	33%
7534 *	1,55	53,4	dDN-	-0,56	500	93%	89%	64%	64%	100%	83%	62%	35%	26%	80%	83%	93%
4266 *	1,65	54,8	dDN-	-0,57	500	91%	100%	68%	64%	50%	79%	62%	17%	26%	60%	72%	100%
3926	1,2	45,6	dDN-	-0,60	300	58%	67%	93%	55%	0%	51%	46%	13%	52%	80%	94%	100%
4206 *	1,56	51,2	dDN-	-0,61	1000	95%	89%	82%	82%	0%	85%	85%	30%	39%	90%	94%	100%
1775	4,79	21,5	dDNA+	-0,50	4000	9%	22%	11%	27%	100%	10%	15%	4%	22%	30%	22%	33%
1648 **	4,24	23,7	dDNA+	-0,50	10000	19%	44%	18%	55%	100%	39%	77%	65%	96%	80%	100%	73%
1758 **	4,71	26,1	dDNA+	-0,50	8000	4%	22%	0%	9%	50%	15%	46%	61%	96%	70%	94%	47%
777	1,74	29	dDNA+	-0,50	3000	67%	100%	89%	82%	100%	71%	100%	91%	100%	100%	100%	87%

Erläuterungen: Typen: Marker zugunsten einer diabetischen Nephropathie wenn vorhanden (dDN+), negativ wenn vorhanden (dDN-), positiv wenn oberhalb der Amplitudengrenze (dDN+), negativ wenn oberhalb der Amplitudengrenze (dDN-). Ein Stern hinter der Identifikationsnummer zeigt an, dass das genannte Polypeptid auch in der Liste „Marker diabetische Nephropathie“ aufgeführt ist. Zwei Sterne bedeuten, dass das Polypeptid zusätzlich noch in der Tabelle „Marker Nephropathie allgemein“ aufgeführt ist.

3.2 Ergebnisse der Untersuchungen zur diabetischen Nephropathie

Für die Differenzierung in Richtung der diabetischen Nephropathie im Unterschied zu FSGS, MCD und MNGN können danach 13 Polypeptide herangezogen werden, die sich sowohl von den anderen Krankheitstypen, wie auch von den Kontrollpatienten unterscheiden (Tabelle 3.22).

Marker der FSGS

Beim Vergleich der Polypeptidverteilungen zwischen den 10 untersuchten FSGS-Proben und den Kontrollproben fällt auf, dass es eine Häufung von generell vorhandenen Polypeptiden („common“, Tabelle 3.12) gibt, welche im Krankheitsfalle deutlich geringer oder vermehrt exprimiert werden. Die folgende Tabelle 3.23 mit ausgewählten Markerpeptiden enthält dementsprechend eine Vielzahl an solchen „common polypeptides“, die nach Beurteilung der gemessenen Amplitude verwendet werden.

Tabelle 3.23: Marker „FSGS“ im Urin

ID	Identifikation		Nachweis		Kontrollen		Diabetes Typ I			Diabetes Typ II				andere Nephritis				
	Masse kDa	Zeit min	Typ	F	Gr.-Amp.	Erw. (85)	Kind. (9)	D1P0 (28)	D1P1 (11)	D1P2 (2)	D2P0 (202)	D2P1 (13)	D2P2 (23)	D2P3 (23)	FSGS (10)	MNGN (18)	MCD (15)	
213	0,99	33,4	FSG+	0,89		11%	0%	21%	18%	100%	7%	8%	9%	39%	100%	78%	67%	
3514	0,83	24,2	FSG+	0,83		7%	11%	18%	45%	50%	16%	31%	26%	70%	90%	72%	47%	
398	1,19	30,3	FSG+	0,82		18%	67%	61%	18%	100%	43%	46%	43%	78%	100%	89%	60%	
2646	10,1	18,7	FSG+	0,71	10000	19%	44%	7%	27%	100%	54%	77%	70%	91%	90%	100%	87%	
1417	3,36	30,5	FSG+	0,69	300	21%	33%	39%	9%	0%	32%	38%	48%	78%	90%	72%	47%	
4042	1,34	38,3	FSG+	0,66	500	14%	0%	11%	36%	0%	12%	23%	61%	96%	80%	94%	60%	
728	1,65	25,3	FSG+	0,62	500	18%	11%	25%	27%	100%	23%	54%	70%	91%	80%	94%	73%	
1093	2,41	29,5	FSG+	0,62	500	28%	22%	39%	45%	50%	38%	62%	87%	91%	90%	94%	73%	
4075	1,38	43,1	FSG-	-0,56	200	76%	100%	71%	55%	100%	35%	38%	39%	9%	20%	39%	53%	
1228	2,76	31,2	FSG-	-0,59	500	79%	89%	71%	64%	50%	51%	38%	35%	22%	20%	17%	40%	
1250 *	2,83	35,2	FSG-	-0,59	4000	99%	100%	100%	100%	100%	78%	62%	43%	35%	40%	39%	73%	
3871	1,14	36,9	FSG-	-0,64	300	74%	100%	100%	36%	18%	0%	47%	54%	26%	13%	10%	11%	20%
1432 *	3,41	36,8	FSG-	-0,68	1500	88%	100%	96%	91%	50%	84%	77%	43%	17%	20%	11%	67%	
4861	2,89	38,5	FSG-	-0,69	200	69%	56%	43%	45%	50%	43%	38%	17%	17%	0%	50%	33%	
1431	3,4	31,7	FSG-	-0,87	500	87%	78%	68%	36%	0%	71%	69%	30%	39%	0%	28%	67%	
950 *	2,08	25,4	FSGA+	0,50	10000	69%	100%	89%	73%	100%	69%	85%	87%	96%	100%	100%	93%	
826 *	1,83	28,6	FSGA+	0,50	10000	65%	89%	86%	91%	100%	79%	92%	96%	83%	100%	100%	87%	
765 *	1,72	28,3	FSGA+	0,50	10000	60%	100%	89%	82%	100%	81%	92%	100%	100%	100%	100%	87%	
1016	2,23	28	FSGA+	0,50	7500	53%	100%	64%	91%	100%	67%	92%	96%	100%	100%	94%	87%	
2485	8,77	17,9	FSGA+	0,50	5000	26%	78%	14%	36%	100%	57%	85%	96%	91%	80%	100%	93%	
1628	4,15	23,2	FSGA+	0,50	5000	25%	44%	29%	55%	100%	33%	85%	52%	91%	80%	94%	67%	
1101	2,43	24,1	FSGA+	0,50	3000	38%	33%	61%	45%	100%	52%	92%	87%	100%	90%	100%	73%	
327	1,11	29,5	FSGA+	0,50	4000	28%	44%	57%	64%	100%	34%	69%	70%	100%	80%	94%	87%	
2540	9,21	22,4	FSGA+	0,50	3500	7%	0%	0%	9%	100%	8%	15%	17%	43%	50%	56%	20%	
4117 *	1,44	41,6	FSGA-	-0,50	1000	92%	89%	79%	55%	100%	83%	85%	83%	91%	90%	89%	100%	
7294 *	1,25	41,1	FSGA-	-0,50	1000	92%	89%	68%	73%	100%	89%	100%	78%	48%	70%	78%	100%	
744 *	1,68	34,5	FSGA-	-0,50	2000	93%	100%	89%	82%	100%	99%	92%	100%	100%	100%	100%	100%	
3985 *	1,27	40,4	FSGA-	-0,50	1000	93%	100%	79%	91%	100%	77%	69%	70%	74%	90%	78%	100%	
4442 *	1,95	38,7	FSGA-	-0,50	1000	80%	100%	71%	73%	0%	81%	77%	70%	70%	80%	72%	100%	
10426 *	1,52	55	FSGA-	-0,50	1000	89%	100%	68%	45%	0%	80%	69%	43%	43%	90%	83%	100%	
3942 *	1,22	48,2	FSGA-	-0,50	1000	84%	100%	82%	82%	100%	87%	77%	48%	87%	90%	67%	93%	
8441 *	3,46	43,9	FSGA-	-0,50	1000	94%	100%	75%	82%	100%	86%	92%	70%	61%	80%	61%	87%	
7461 *	1,45	41,9	FSGA-	-0,50	2000	96%	100%	71%	82%	100%	90%	100%	91%	87%	90%	83%	100%	
7770 *	1,91	38,4	FSGA-	-0,50	10000	85%	100%	43%	64%	50%	83%	92%	78%	52%	70%	78%	93%	

Erläuterungen: Typen: Marker zugunsten einer FSGS wenn vorhanden (FSG+), negativ wenn vorhanden (FSG-), positiv wenn oberhalb der Amplitudengrenze (FSGA+), negativ wenn oberhalb der Amplitudengrenze (FSGA-). Ein Stern hinter der ID bezeichnet solche Polypeptide die in den meisten Proben vorhanden sind (common polypeptides, Tabelle 3.12).

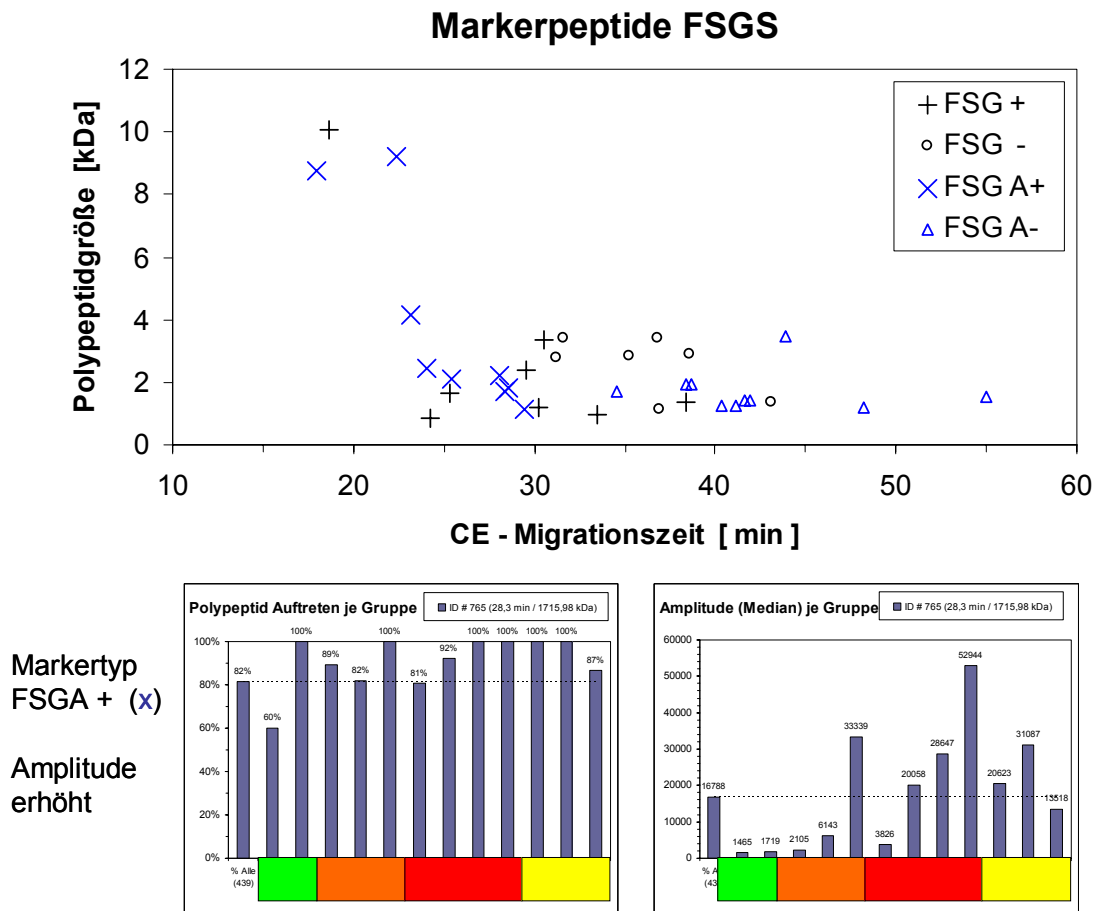


Abbildung 3.24: Muster der Marker-Polypeptide einer FSGS (oben). Dabei bedeuten: „+“ Polypeptide, die im Krankheitsfall häufiger auftreten und „o“ solche, die seltener auftreten. „x“ Amplitude ist deutlich erhöht und „Δ“ erniedrigt. Die Diagramme unten zeigen die relative Häufigkeit eines Polypeptides in den untersuchten Gruppen, sowie die dazu gehörende mittlere Amplitude (rechts).

Abbildung 3.24 zeigt neben dem resultierenden Muster eines der genannten Polypeptide (# 765, M = 1,72 kDa, t = 28,3 min). Dieses, in 82 % aller untersuchten Proben auftretende Polypeptid, zeigt bei den FSGS-Proben im Vergleich zu den Kontrollen eine deutlich erhöhte Amplitude. Die Tatsache, dass dieses Verhalten auch innerhalb der anderen Gruppen mit renaler Schädigung zu erkennen ist, unterstreicht die Notwendigkeit zusätzliche differentialdiagnostische Marker zu definieren.

Differentielle Marker der FSGS zu anderen Nierenerkrankungen erwiesen sich als schwierig zu finden. In den meisten Fällen überschneiden sich die Ausprägungen der Polypeptide mit einer oder mehrerer anderer Nephropathie. Viele rechnerisch gute Kandidaten konnten nicht berücksichtigt werden, da sie nicht logische Verteilungsmuster zeigten und möglicherweise durch die geringe Anzahl an Proben

3.2 Ergebnisse der Untersuchungen zur diabetischen Nephropathie

in der Gruppe der FSGS Patienten zurückzuführen sind. Die gefundenen positiven Marker sind ebenfalls kritisch zu beurteilen, da sie alle nahe an der Nachweisgrenze des Systems gefunden worden sind.

Tabelle 3.25: „differentielle Marker FSGS“ im Urin

ID	Identifikation		Nachweis		Kontrollen		Diabetes Typ I			Diabetes Typ II			andere Nephritis				
	Masse kDa	Zeit min	F	Gr.- Amp.	Erw. (85)	Kind. (9)	D1P0 (28)	D1P1 (11)	D1P2 (2)	D2P0 (202)	D2P1 (13)	D2P2 (23)	D2P3 (23)	FSGS (10)	MNGN (18)	MCD (15)	
403	1,19	30,8	dFSG+	0,61	14%	0%	43%	27%	0%	7%	8%	26%	35%	90%	22%	33%	
7589	1,62	41,3	dFSG+	0,58	9%	33%	32%	36%	0%	15%	15%	22%	9%	80%	56%	0%	
213	0,99	33,4	dFSG+	0,56	11%	0%	21%	18%	100%	7%	8%	9%	39%	100%	78%	67%	
7334	1,29	56	dFSG+	0,55	16%	33%	7%	0%	50%	19%	15%	13%	22%	80%	44%	27%	
745	1,68	25,9	dFSG+	0,51	12%	33%	46%	27%	0%	23%	15%	17%	48%	90%	56%	40%	
7344	1,31	32,6	dFSG+	0,47	4%	11%	7%	18%	0%	2%	8%	9%	0%	50%	0%	0%	
6932	0,92	34,9	dFSG+	0,47	4%	0%	14%	0%	0%	2%	0%	9%	26%	70%	50%	7%	
4071	1,37	43,8	dFSG+	0,46	50	9%	22%	46%	18%	0%	9%	8%	17%	35%	80%	44%	47%
7787	1,94	42	dFSG+	0,43	27%	11%	4%	9%	50%	20%	23%	30%	48%	90%	67%	47%	
4314	1,73	50,9	dFSG-	-0,30	56%	44%	54%	36%	50%	38%	38%	35%	26%	0%	33%	27%	
801	1,78	28,4	dFSG-	-0,32	500	26%	33%	36%	27%	100%	46%	85%	83%	100%	50%	83%	53%
1561	3,88	24,1	dFSG-	-0,34	7%	11%	25%	9%	0%	14%	15%	39%	52%	10%	56%	27%	
1431	3,4	31,7	dFSG-	-0,39	87%	78%	68%	36%	0%	71%	69%	30%	39%	0%	28%	67%	
327	1,11	29,5	dFSGA+	0,50	4000	28%	44%	57%	64%	100%	34%	69%	70%	100%	80%	94%	87%
1628	4,15	23,2	dFSGA+	0,50	7500	25%	44%	29%	55%	100%	33%	85%	52%	91%	80%	94%	67%
279	1,06	30,6	dFSGA+	0,50	3000	32%	22%	54%	64%	100%	22%	54%	57%	96%	70%	89%	73%
8441	3,46	43,9	dFSGA-	-0,50	600	94%	100%	75%	82%	100%	86%	92%	70%	61%	80%	61%	87%
744	1,68	34,5	dFSGA-	-0,50	1500	93%	100%	89%	82%	100%	99%	92%	100%	100%	100%	100%	100%
555	1,39	28	dFSGA-	-0,50	2000	38%	89%	68%	64%	100%	73%	100%	96%	100%	80%	100%	80%
1101	2,43	24,1	dFSGA-	-0,50	7000	38%	33%	61%	45%	100%	52%	92%	87%	100%	90%	100%	73%
765	1,72	28,3	dFSGA-	-0,50	25000	60%	100%	89%	82%	100%	81%	92%	100%	100%	100%	100%	87%
826	1,83	28,6	dFSGA-	-0,50	20000	65%	89%	86%	91%	100%	79%	92%	96%	83%	100%	100%	87%
2646	10,1	18,7	dFSGA-	-0,50	40000	19%	44%	7%	27%	100%	54%	77%	70%	91%	90%	100%	87%
1225	2,75	25,6	dFSGA-	-0,50	5000	27%	56%	25%	18%	50%	60%	77%	91%	91%	80%	94%	67%

Erläuterungen: Typen: Marker zugunsten einer FSGS wenn vorhanden (dFSG+), negativ wenn vorhanden (dFSG-), positiv wenn oberhalb der Amplitudengrenze (dFSGA+), negativ wenn oberhalb der Amplitudengrenze (dFSGA-).

Marker der MNGN

Im Gegensatz zu den untersuchten FSGS Proben können für die MNGN-Fälle im Vergleich zu den Kontrollen deutlich unterschiedlich ausgeprägte Polypeptide gefunden werden. Tabelle 3.26 umfasst 34 Polypeptide die sich im Hinblick auf Vorkommen und / oder Amplitude von den Kontrollen unterscheiden. Diese Liste könnte noch um einiges erweitert werden, was aber aufgrund der Deutlichkeit der Unterschiede nicht notwendig zu sein scheint. Das resultierende Abbild der Marker ist in Abbildung 3.27 dargestellt.

Differentielle Marker gegenüber den anderen Nierenschädigungsmustern zu erkennen erweist sich hingegen als ebenso kompliziert, wie im Falle der FSGS. Besonders auffällig ist eine deutliche Ähnlichkeit zum Muster der diabetischen Nephropathie. Tabelle 3.28 zeigt eine Liste von ausgewählten Markern, die eine Differenzierung gewährleisten.

3.2 Ergebnisse der Untersuchungen zur diabetischen Nephropathie

Tabelle 3.26: Marker „MNGN“ im Urin

ID	Identifikation		Nachweis		Kontrollen		Diabetes Typ I				Diabetes Typ II			andere Nephritis			
	Masse [kDa]	Zeit [min]	Typ	F Amp.	Gr.- Amp.	Erw. (85)	Kind. (9)	D1P0 (28)	D1P1 (11)	D1P2 (2)	D2P0 (202)	D2P1 (13)	D2P2 (23)	D2P3 (23)	FSGS (10)	MNGN (18)	MCD (15)
126	0,91	36,6	MNG+	0,91		4%	11%	32%	18%	100%	2%	23%	17%	70%	50%	94%	33%
1758	4,71	26,1	MNG+	0,91		4%	22%	0%	9%	50%	15%	46%	61%	96%	70%	94%	47%
2470	8,65	16,8	MNG+	0,87	400	7%	0%	0%	0%	0%	12%	38%	39%	65%	40%	94%	60%
612	1,47	28,2	MNG+	0,87	400	7%	22%	36%	18%	0%	10%	54%	57%	78%	60%	94%	60%
480	1,29	30,1	MNG+	0,85		15%	11%	50%	36%	100%	13%	38%	52%	91%	80%	100%	60%
4435	1,93	16	MNG+	0,84		5%	22%	4%	9%	0%	18%	31%	57%	57%	70%	89%	53%
2391	8,05	16,7	MNG+	0,84		11%	33%	14%	27%	100%	16%	31%	35%	78%	70%	94%	67%
980	2,15	24,4	MNG+	0,83		12%	0%	36%	55%	100%	26%	23%	35%	65%	70%	94%	53%
1128	2,49	22,3	MNG+	0,82	200	18%	11%	29%	36%	50%	35%	54%	83%	87%	80%	100%	60%
610	1,46	25,3	MNG+	0,82	150	13%	22%	36%	27%	50%	20%	38%	61%	70%	70%	94%	73%
2646	10,1	18,7	MNG+	0,81	10000	19%	44%	7%	27%	100%	54%	77%	70%	91%	90%	100%	87%
1648	4,24	23,7	MNG+	0,81	5000	19%	44%	18%	55%	100%	39%	77%	65%	96%	80%	100%	73%
677	1,57	26,8	MNG+	0,81	800	19%	22%	25%	27%	50%	28%	85%	78%	100%	100%	100%	67%
7934	2,21	44,5	MNG-	-0,71	200	93%	100%	75%	91%	100%	72%	85%	43%	61%	50%	22%	93%
1600	4,04	30,2	MNG-	-0,72	1000	84%	100%	64%	55%	50%	65%	31%	22%	26%	40%	11%	53%
1390	3,27	31,4	MNG-	-0,74	500	85%	56%	82%	73%	50%	36%	23%	13%	13%	20%	11%	60%
1432 *	3,41	36,8	MNG-	-0,77	1500	88%	100%	96%	91%	50%	84%	77%	43%	17%	20%	11%	67%
826 *	1,83	28,6	MNGA+	0,50	10000	65%	89%	86%	91%	100%	79%	92%	96%	83%	100%	100%	87%
1101	2,43	24,1	MNGA+	0,50	15000	38%	33%	61%	45%	100%	52%	92%	87%	100%	90%	100%	73%
1225	2,75	25,6	MNGA+	0,50	20000	27%	56%	25%	18%	50%	60%	77%	91%	91%	80%	94%	67%
2485	8,77	17,9	MNGA+	0,50	15000	26%	78%	14%	36%	100%	57%	85%	96%	91%	80%	100%	93%
950 *	2,08	25,4	MNGA+	0,50	15000	69%	100%	89%	73%	100%	69%	85%	87%	96%	100%	100%	93%
765 *	1,72	28,3	MNGA+	0,50	10000	60%	100%	89%	82%	100%	81%	92%	100%	100%	100%	100%	87%
1016	2,23	28	MNGA+	0,50	10000	53%	100%	64%	91%	100%	67%	92%	96%	100%	100%	94%	87%
755	1,7	28,8	MNGA+	0,50	5000	53%	56%	50%	55%	100%	65%	100%	96%	100%	90%	100%	80%
1094 *	2,41	33,1	MNGA+	0,50	4000	98%	100%	82%	55%	50%	91%	100%	91%	100%	100%	100%	100%
816	1,81	30,8	MNGA+	0,50	2500	36%	33%	21%	36%	100%	63%	92%	96%	100%	90%	100%	73%
4442 *	1,95	38,7	MNGA-	-0,50	2000	80%	100%	71%	73%	0%	81%	77%	70%	70%	80%	72%	100%
1250 *	2,83	35,2	MNGA-	-0,50	2000	99%	100%	100%	100%	100%	78%	62%	43%	35%	40%	39%	73%
10426*	1,52	55	MNGA-	-0,50	2000	89%	100%	68%	45%	0%	80%	69%	43%	43%	90%	83%	100%
3942 *	1,22	48,2	MNGA-	-0,50	2000	84%	100%	82%	82%	100%	87%	77%	48%	87%	90%	67%	93%
8441 *	3,46	43,9	MNGA-	-0,50	2000	94%	100%	75%	82%	100%	86%	92%	70%	61%	80%	61%	87%
7461 *	1,45	41,9	MNGA-	-0,50	5000	96%	100%	71%	82%	100%	90%	100%	91%	87%	90%	83%	100%
7770 *	1,91	38,4	MNGA-	-0,50	10000	85%	100%	43%	64%	50%	83%	92%	78%	52%	70%	78%	93%

Erläuterungen: Typen: Marker zugunsten einer MNGN wenn vorhanden (MNG+), negativ wenn vorhanden (MNG-), positiv wenn oberhalb der Amplitudengrenze (MNGA+), negativ wenn oberhalb der Amplitudengrenze (MNGA-). Ein Stern hinter der ID bezeichnet solche Polypeptide die in den meisten Proben vorhanden sind (common polypeptides, Tabelle 3.12).

Markerpeptide MNGN

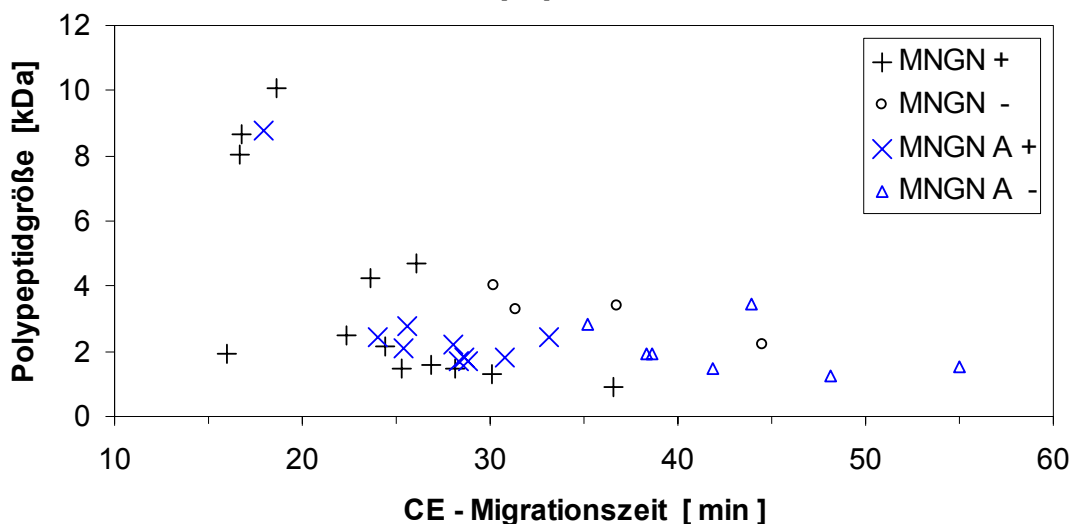


Abbildung 3.27: Muster der Marker-Polypeptide einer MNGN.

Dabei bedeuten: „+“ Polypeptide, die im Krankheitsfall häufiger auftreten und „o“ solche, die seltener auftreten. „x“ Amplitude ist deutlich erhöht und „Δ“ erniedrigt.

Tabelle 3.28: „differentielle Marker MNGN“ im Urin.

ID	Identifikation			Nachweis		Kontrollen		Diabetes Typ I			Diabetes Typ II			andere Nephritis			
	Masse kDa	Zeit min	Typ	F	Gr.- Amp.	Erw. (85)	Kind. (9)	D1P0 (28)	D1P1 (11)	D1P2 (2)	D2P0 (202)	D2P1 (13)	D2P2 (23)	D2P3 (23)	FSGS (10)	MNGN (18)	MCD (15)
1057	2,32	25,9	dMNG+	0,66	100	22%	33%	43%	27%	50%	26%	15%	17%	22%	30%	89%	27%
4822	2,78	40,4	dMNG+	0,65		9%	11%	21%	27%	0%	10%	0%	4%	9%	10%	72%	7%
734	1,66	22,1	dMNG+	0,64		11%	33%	32%	36%	50%	22%	31%	22%	17%	20%	83%	20%
682	1,57	27,7	dMNG+	0,61	100	11%	33%	46%	27%	0%	16%	23%	17%	39%	40%	89%	20%
2461	8,58	17,1	dMNG+	0,60	100	5%	0%	0%	9%	0%	2%	15%	4%	0%	30%	67%	7%
7934	2,21	44,5	dMNG-	-0,38	100	93%	100%	75%	91%	100%	72%	85%	43%	61%	50%	22%	93%
93	0,88	26,1	dMNG-	-0,42	200	87%	89%	89%	36%	50%	92%	100%	65%	43%	50%	17%	80%
1519	3,72	32	dMNG-	-0,44	500	95%	100%	57%	64%	50%	83%	54%	74%	48%	40%	11%	47%
1453	3,48	43,2	dMNG-	-0,45	500	79%	100%	71%	73%	100%	90%	92%	83%	61%	60%	22%	60%
2646	10,1	18,7	dMNGA+	0,50	40000	19%	44%	7%	27%	100%	54%	77%	70%	91%	90%	100%	87%
1101	2,43	24,1	dMNGA+	0,50	20000	38%	33%	61%	45%	100%	52%	92%	87%	100%	90%	100%	73%
826	1,83	28,6	dMNGA+	0,50	20000	65%	89%	86%	91%	100%	79%	92%	96%	83%	100%	100%	87%
950	2,08	25,4	dMNGA+	0,50	15000	69%	100%	89%	73%	100%	69%	85%	87%	96%	100%	100%	93%
2485	8,77	17,9	dMNGA+	0,50	15000	26%	78%	14%	36%	100%	57%	85%	96%	91%	80%	100%	93%
1094	2,41	33,1	dMNGA+	0,50	4000	98%	100%	82%	55%	50%	91%	100%	91%	100%	100%	100%	100%
489	1,3	37,8	dMNGA+	0,50	3500	42%	89%	39%	82%	100%	48%	77%	91%	100%	90%	94%	93%
1453	3,48	43,2	dMNGA-	-0,50	500	79%	100%	71%	73%	100%	90%	92%	83%	61%	60%	22%	60%
777	1,74	29	dMNGA-	-0,50	3000	67%	100%	89%	82%	100%	71%	100%	91%	100%	100%	100%	87%
838	1,85	29,7	dMNGA-	-0,50	2000	25%	78%	61%	64%	100%	59%	92%	96%	100%	80%	94%	73%
2074	6,19	39,4	dMNGA-	-0,50	500	95%	44%	50%	27%	0%	84%	77%	78%	74%	60%	78%	80%
1238	2,79	25,2	dMNGA-	-0,50	1000	21%	78%	46%	36%	100%	45%	69%	91%	91%	60%	67%	60%

Erläuterungen: Typen: Marker zugunsten einer MNGN wenn vorhanden (dMNG+), negativ wenn vorhanden (dMNG-), positiv wenn oberhalb der Amplitudengrenze (dMNG+), negativ wenn oberhalb der Amplitudengrenze (dMNG-).

Marker für MCD

Wie bei beiden zuletzt genannten Erkrankungstypen können auch bei der MCD die Markerpeptide im Wesentlichen über die gemessene Amplitude definiert werden. Auffällig ist hier aber eine deutliche Ähnlichkeit zu den Kontrollmustern. Das in Abbildung 3.30 (unten) dargestellte Polypeptid (# 7461, M = 1,45 kDa, t = 41,9 min) wird innerhalb der einzelnen Gruppen einer regelmäßig gefunden. Bei den Proben aus den Gruppen der Nierenschädigungen ist die mittlere Amplitude aber deutlich verringert. Obwohl dies auch bei den MCD-Proben der Fall ist, so liegt die errechnete mittlere Amplitude in dieser Gruppe doch wesentlich näher an der der Kontrollpatienten als in den anderen Gruppen ($A_{\text{Kontrolle}} = 16600$, $A_{\text{Nephropathien}} = 300 - 2000$, $A_{\text{MCD}} = 7000$).

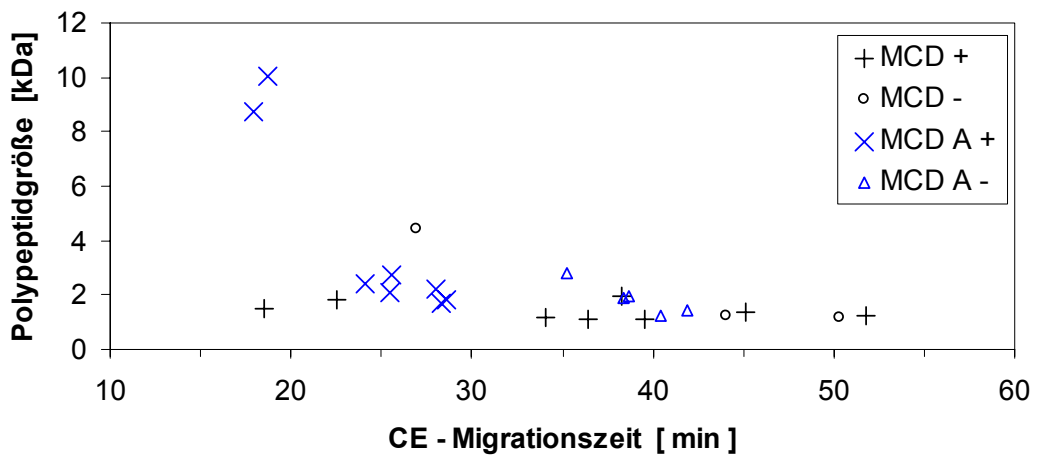
Die für die Klassifizierung der MCD gefundenen Polypeptide sind in Tabelle 3.29 aufgeführt, das resultierende Muster ist in Abbildung 3.30 dargestellt. Ein ausgewähltes Polypeptidmuster für die Differenzialdiagnostik der MCD ist in Tabelle 3.31 gezeigt.

Tabelle 3.29: Marker „MCD“ im Urin

ID	Identifikation		Nachweis		Kontrollen		Diabetes Typ I			Diabetes Typ II			andere Nephritis			
	Masse [kDa]	Zeit [min]	F	Gr.-Amp.	Erw. (85)	Kind. (9)	D1P0 (28)	D1P1 (11)	D1P2 (2)	D2P0 (202)	D2P1 (13)	D2P2 (23)	D2P3 (23)	FSGS (10)	MNGN (18)	MCD (15)
3901	1,17	34,1	MCD+	0,81	100	6%	11%	9%	100%	11%	23%	4%	22%	30%	50%	87%
10213	1,27	51,8	MCD+	0,80	100	20%	44%	18%	0%	0%	10%	0%	22%	30%	50%	100%
4057	1,35	45,1	MCD+	0,78	200	22%	11%	29%	27%	100%	32%	46%	30%	78%	90%	100%
3869	1,14	39,5	MCD+	0,74	100	13%	0%	46%	64%	0%	19%	54%	17%	39%	80%	87%
636	1,5	18,5	MCD+	0,68		12%	0%	32%	27%	50%	25%	46%	22%	65%	80%	80%
359	1,14	36,5	MCD+	0,68		19%	22%	68%	64%	50%	26%	38%	22%	17%	60%	87%
833	1,84	22,5	MCD+	0,68	200	19%	33%	39%	36%	50%	39%	77%	39%	83%	70%	87%
4450	1,96	38,3	MCD+	0,66	200	27%	56%	32%	18%	100%	37%	31%	57%	30%	50%	93%
12534	1,2	50,4	MCD-	-0,52	300	72%	89%	36%	36%	50%	37%	38%	26%	30%	30%	20%
1687	4,41	26,9	MCD-	-0,57	750	64%	89%	54%	45%	50%	37%	15%	0%	22%	10%	7%
3987	1,27	44	MCD-	-0,61		74%	89%	79%	36%	50%	52%	62%	43%	9%	30%	13%
1225	2,75	25,6	MCDA+	0,50	25000	27%	56%	25%	18%	50%	60%	77%	91%	91%	80%	67%
2646	10,1	18,7	MCDA+	0,50	10000	19%	44%	7%	27%	100%	54%	77%	70%	91%	90%	87%
826 *	1,83	28,6	MCDA+	0,50	5000	65%	89%	86%	91%	100%	79%	92%	96%	83%	100%	87%
1101	2,43	24,1	MCDA+	0,50	5000	38%	33%	61%	45%	100%	52%	92%	87%	100%	90%	73%
765 *	1,72	28,3	MCDA+	0,50	5000	60%	100%	89%	82%	100%	81%	92%	100%	100%	100%	87%
950 *	2,08	25,4	MCDA+	0,50	5000	69%	100%	89%	73%	100%	69%	85%	87%	96%	100%	93%
2485	8,77	17,9	MCDA+	0,50	5000	26%	78%	14%	36%	100%	57%	85%	96%	91%	80%	93%
1016	2,23	28	MCDA+	0,50	5000	53%	100%	64%	91%	100%	67%	92%	96%	100%	94%	87%
3985 *	1,27	40,4	MCDA-	-0,50	3000	93%	100%	79%	91%	100%	77%	69%	70%	74%	90%	100%
4442 *	1,95	38,7	MCDA-	-0,50	3000	80%	100%	71%	73%	0%	81%	77%	70%	80%	72%	100%
1250 *	2,83	35,2	MCDA-	-0,50	2000	99%	100%	100%	100%	100%	78%	62%	43%	35%	40%	73%
7461 *	1,45	41,9	MCDA-	-0,50	10000	96%	100%	71%	82%	100%	90%	100%	91%	87%	90%	100%
7770 *	1,91	38,4	MCDA-	-0,50	20000	85%	100%	43%	64%	50%	83%	92%	78%	52%	70%	93%

Erläuterungen: Typen: Marker zugunsten einer MCD wenn vorhanden (MCD+), negativ wenn vorhanden (MCD-), positiv wenn oberhalb der Amplitudengrenze (MCDA+), negativ wenn oberhalb der Amplitudengrenze (MCDA-). Ein Stern hinter der ID bezeichnet solche Polypeptide die in den meisten Proben vorhanden sind (common polypeptides).

Markerpeptide MCD



Markertyp
MCDA - (Δ)

Amplitude
erniedrigt

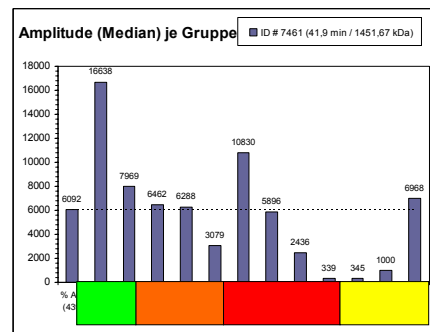
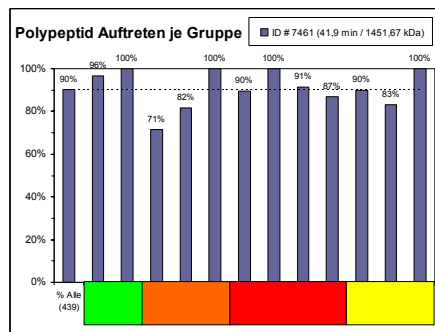


Abbildung 3.30: Muster der Marker-Polypeptide einer MCD (oben).

Dabei bedeuten: „+“ Polypeptide, die im Krankheitsfall häufiger auftreten und „o“ solche, die seltener auftreten. „x“ Amplitude ist deutlich erhöht und „Δ“ erniedrigt. Die Diagramme unten zeigen ein verwendetes Marker-Polypeptid zur Unterscheidung der MCD von Kontrollpatienten. Links ist die Frequenz, rechts die Amplitude dargestellt.

3.2 Ergebnisse der Untersuchungen zur diabetischen Nephropathie

Tabelle 3.31: „differentielle Marker MCD“ im Urin

ID	Identifikation			Nachweis		Kontrollen		Diabetes Typ I			Diabetes Typ II			andere Nephritis			
	Masse kDa	Zeit min	Typ	F	Gr.- Amp.	Erw. (85)	Kind. (9)	D1P0 (28)	D1P1 (11)	D1P2 (2)	D2P0 (202)	D2P1 (13)	D2P2 (23)	D2P3 (23)	FSGS (10)	MNGN (18)	MCD (15)
10213	1,27	51,8	dMCD+	0,65	100	20%	44%	18%	0%	0%	10%	0%	22%	30%	50%	50%	100%
3901	1,17	34,1	dMCD+	0,62	100	6%	11%	11%	9%	100%	11%	23%	4%	22%	30%	50%	87%
4266	1,65	54,8	dMCD+	0,61	700	91%	100%	68%	64%	50%	79%	62%	17%	26%	60%	72%	100%
3919	1,19	49,5	dMCD+	0,55		86%	67%	75%	64%	50%	45%	31%	30%	35%	30%	56%	93%
16149	2,67	61,1	dMCD+	0,55	100	5%	0%	0%	18%	0%	8%	15%	9%	0%	30%	22%	67%
1030	2,26	31,6	dMCD-	-0,41		40%	44%	61%	9%	50%	20%	23%	26%	74%	70%	83%	20%
704	1,61	25,9	dMCD-	-0,44	100	15%	22%	36%	18%	0%	17%	23%	43%	74%	80%	94%	27%
4567	2,19	39	dMCD-	-0,56		49%	22%	46%	36%	50%	21%	54%	61%	87%	80%	78%	20%
7770	1,91	38,4	dMCDA+	0,50	5000	85%	100%	43%	64%	50%	83%	92%	78%	52%	70%	78%	93%
8441	3,46	43,9	dMCDA+	0,50	4000	94%	100%	75%	82%	100%	86%	92%	70%	61%	80%	61%	87%
3942	1,22	48,2	dMCDA+	0,50	3000	84%	100%	82%	82%	100%	87%	77%	48%	87%	90%	67%	93%
7461	1,45	41,9	dMCDA+	0,50	3000	96%	100%	71%	82%	100%	90%	100%	91%	87%	90%	83%	100%
10426	1,52	55	dMCDA+	0,50	2500	89%	100%	68%	45%	0%	80%	69%	43%	43%	90%	83%	100%
2074	6,19	39,4	dMCDA+	0,50	2500	95%	44%	50%	27%	0%	84%	77%	78%	74%	60%	78%	80%
4117	1,44	41,6	dMCDA+	0,50	1500	92%	89%	79%	55%	100%	83%	85%	83%	91%	90%	89%	100%
687	1,58	28,1	dMCDA-	-0,50	4000	47%	67%	68%	64%	100%	65%	100%	96%	100%	80%	100%	87%
755	1,7	28,8	dMCDA-	-0,50	7500	53%	56%	50%	55%	100%	65%	100%	96%	100%	90%	100%	80%
950	2,08	25,4	dMCDA-	-0,50	15000	69%	100%	89%	73%	100%	69%	85%	87%	96%	100%	100%	93%
1016	2,23	28	dMCDA-	-0,50	12500	53%	100%	64%	91%	100%	67%	92%	96%	100%	100%	94%	87%
765	1,72	28,3	dMCDA-	-0,50	20000	60%	100%	89%	82%	100%	81%	92%	100%	100%	100%	100%	87%
826	1,83	28,6	dMCDA-	-0,50	20000	65%	89%	86%	91%	100%	79%	92%	96%	83%	100%	100%	87%
2646	10,1	18,7	dMCDA-	-0,50	30000	19%	44%	7%	27%	100%	54%	77%	70%	91%	90%	100%	87%

Erläuterungen: Typen: Marker zugunsten einer MNGN wenn vorhanden (dMNG+), negativ wenn vorhanden (dMNG-), positiv wenn oberhalb der Amplitudengrenze (dMNG+), negativ wenn oberhalb der Amplitudengrenze (dMNG-).

3.2.2 Anwendung der definierten Muster auf individuelle Proben

Wie oben aufgeführt konnten aus den 439 untersuchten Proben verschiedene Polypeptidmuster identifiziert werden, die die Erkennung der diabetischen Nephropathie und anderen Nierenschädigungen anhand von Urinproben ermöglichen sollen. Dabei wird das aus der CE-MS-Messung gewonnene Polypeptidabbild mit den vorgegebenen Mustern verglichen und die jeweilige Übereinstimmung bestimmt. Als Mittel zum Abgleich der einzelnen Proben mit den Markerlisten ist ein einfacher Muster-Algorithmus verwendet worden, der lediglich die An- oder Abwesenheit eines Polypeptides mit Hilfe einer vorgegebenen Amplitudengrenze bestimmt und dabei eine Addition der zuvor ermittelten Diskriminierungsfaktoren vornimmt. Ist ein positiver Marker oberhalb der Amplitudengrenze vorhanden, so wird der zugehörige Diskriminierungsfaktor addiert, sonst subtrahiert. Bei negativen Markern wird genau umgekehrt verfahren. Auf diese Weise wird eine Übereinstimmung mit dem untersuchten Marker-Muster festgestellt, die in Form der einzelnen Diskriminierungsfaktoren auch die Wahrscheinlichkeit berücksichtigt, mit der ein bestimmtes Polypeptid in einer Probe aufzufinden ist. Als Ergebnis wird die Übereinstimmung in Prozent der möglichen Maximal- und Minimalwerte angegeben. Das Verfahren ist in Abbildung 3.32 dargestellt.

Zur Überprüfung der gefundenen Muster sind diese auf die 439 untersuchten und auf weitere 104 Proben (32 Kontrollpatienten und 72 Diabetiker mit unterschiedlichen Proteinurien) angewendet worden. Mittels der zuerst genannten kann die Sensitivität und Spezifität der Muster abgeschätzt und eine jeweilige Diagnoseschwelle festgelegt werden.

Die dabei erzielten Ergebnisse für die 439 zur Bestimmung der Marker verwendeten Proben sind in der Tabelle im Anhang I aufgelistet. Die Tabelle im Anhang II fasst die Ergebnisse der neuen, in diesem Sinn als unbekannt einzustufende Proben zusammen.

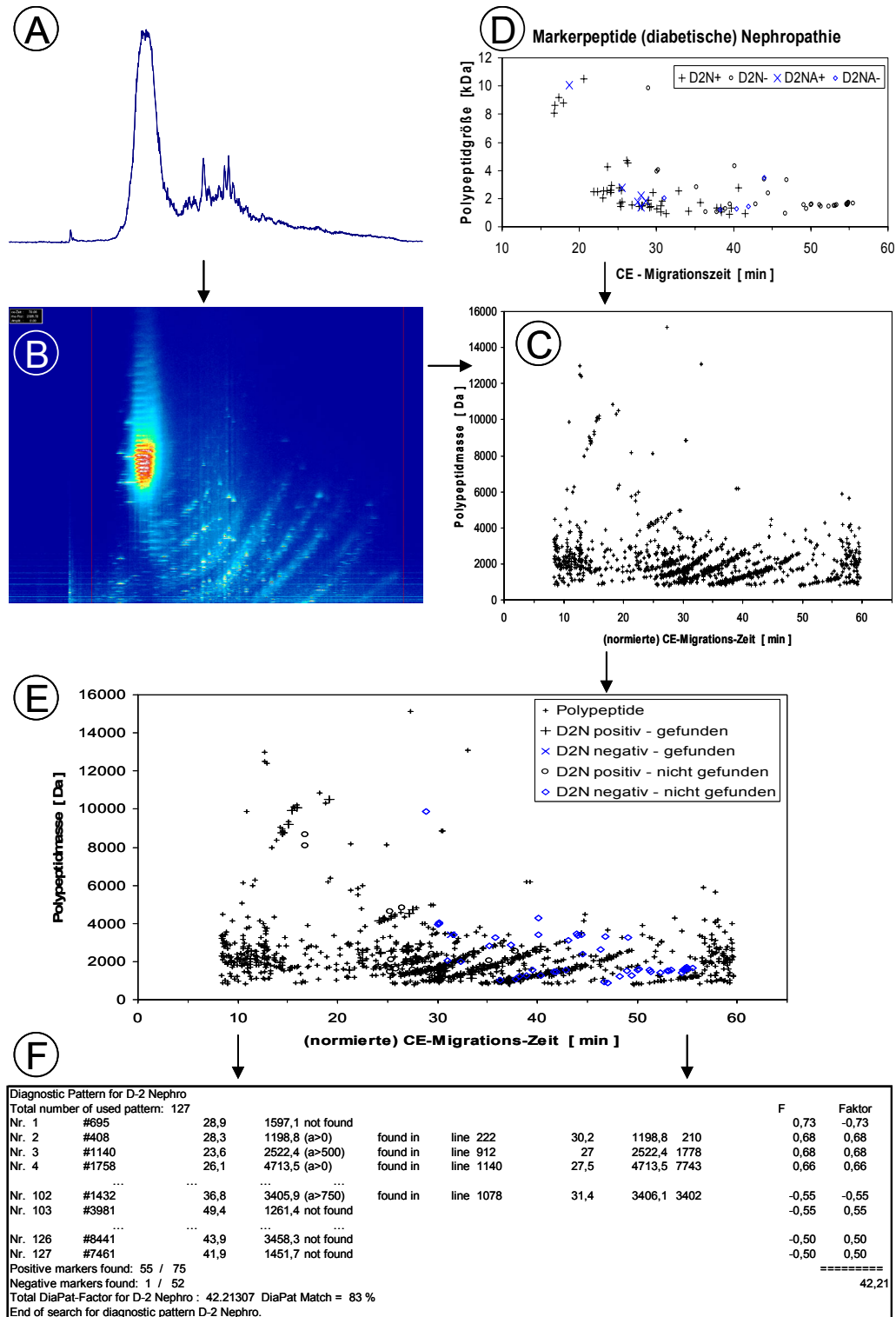


Abbildung 3.32: Vorgehensweise bei der Bestimmung des Übereinstimmungsfaktors.

Das aufgezeichnete Gesamtsignal (TIC, A) wird durch die Software in ein zeitabhängiges 3-D Signal umgerechnet (B) und zu einem Proteinplot dekonvolviert (C). Im nächsten Schritt werden die definierten Muster (D) innerhalb des Proteinplots gesucht (E). Ein gefundener positiver Marker führt zu einer Erhöhung des Faktors (F, Nr. 2-4), ein nicht gefundener positiver Marker zu einer Verringerung (F, Nr.1). Umgekehrt führen gefundene negative Marker zu einem Abzug (F, Nr. 102) und nicht gefundene negative Marker zu einer Erhöhung (F, Nr. 103). Alle Faktoren werden addiert und deren relatives Äquivalent zwischen dem maximal negativen und dem maximal positiven Wert bestimmt (hier: 42,21 zwischen -63,87 und +63,87 = 83,04 %).

3.2.3 Ergebnisse der Anwendung der definierten Muster auf individuelle Proben

Die als allgemeingültige Gruppe gefundenen Polypeptide („common“) können mit hoher Trefferquote in allen Proben gefunden werden (Abb. 3.33). 94 Prozent aller Proben enthalten jeweils mehr als die Hälfte dieser 58 Polypeptide. Diese Gruppe kann daher in der weiteren Folge als Kontrollgruppe für die Messung, Auswertung und Kalibrierung der Daten verwendet werden. Eine Übereinstimmung mit weniger als 50% des Musters sollte zu einer Überprüfung der Messergebnisse führen, was im vorliegenden Fall lediglich bei 26 der untersuchten 439 Proben der Fall ist.

Abbildung 3.34 stellt die mittlere Übereinstimmung der untersuchten Patientengruppen zu den Mustern des Diabetes Typs I und II dar. Wenn das Ziel einer Abgrenzung zu den Kontrollpatienten erreicht werden soll, so muss im Fall des Typs I Diabetes eine Grenze bei 32 % (blaue Linie) und im Fall des Typs II bei 45 % (rote Linie) gezogen werden. Es ist allerdings auch ersichtlich, dass die Abgrenzung der Typ II Patienten zu dem Typ I Muster, wie auch der anderen Patienten mit Nierenschäden zu dem Typ II Muster Schwierigkeiten bereitet.

Die Übereinstimmung der ermittelten Muster der Nephropathien ist in Abbildung 3.35 auf die selbe Art dargestellt. Es fällt auf, dass die gefundenen Muster sich in Bezug auf jede Probengruppe untereinander annähernd gleich verhalten. Allerdings ist die Übereinstimmung zu der jeweils eigenen Gruppe (D2, FSGS, MNGN, MCD) am größten.

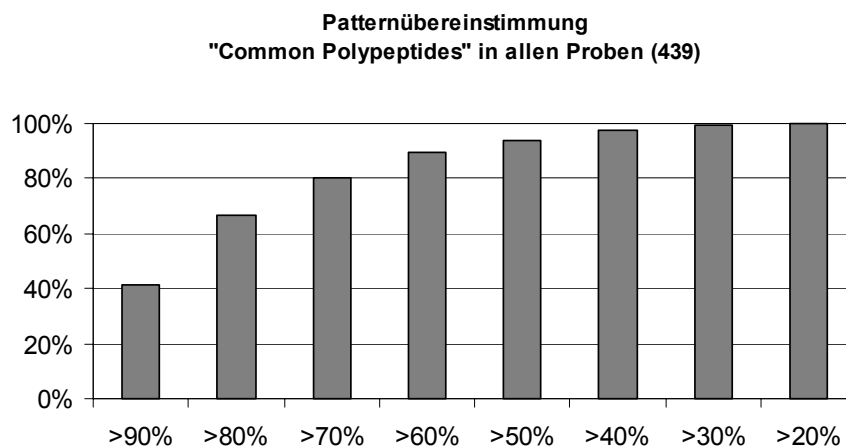


Abbildung 3.33: Übereinstimmung des Musters der „Allgemeinen Polypeptide“ mit den Proben.
Die relative Anzahl der zutreffenden Muster ist über der Übereinstimmungsquote dargestellt.

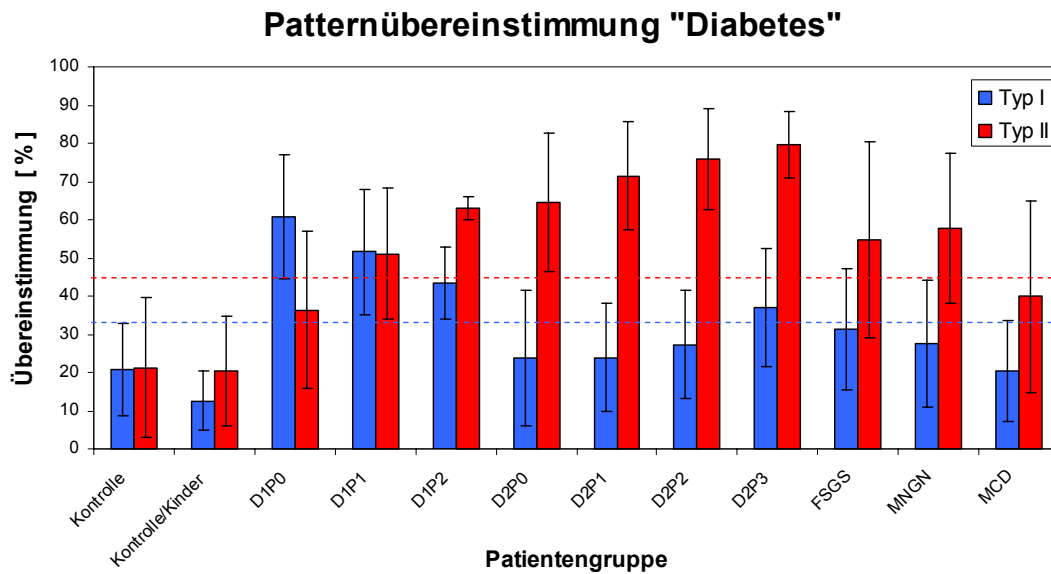


Abbildung 3.34: Übereinstimmung der Muster für Diabetes Typ I und II mit den Proben.

Die mittlere Übereinstimmung mit dem Muster für Diabetes Typ I ist durch die blauen Balken dargestellt, die Übereinstimmung mit dem Muster für Diabetes Typ II durch die roten. Schwarz eingezeichnet ist die Standardabweichung innerhalb der Gruppen. Daraus resultierende Diagnosegrenzen sind in gestrichelten Linien eingezeichnet.

Die gestrichelte Linie in Abbildung 3.35 (oben) bei 50 % zeigt eine Grenze auf, die bezüglich des Musters „Nephropathie allgemein“ als Diagnosegrenze verwendet werden könnte. Mit Ausnahme der mittleren Übereinstimmung zu den MCD-Proben liegen alle Gruppe deutlich über dieser Grenze, bzw. die Kontrollen deutlich darunter. Die MCD-Gruppe scheint auch diejenige zu sein, bei der die Nephropathie-Marker am geringsten ausgeprägt sind. Lediglich das spezifisch für diese Gruppe erarbeitete „MCD-Muster“ erreicht eine deutlich gesteigerte Übereinstimmung.

Da die Unterscheidung der einzelnen Nephropathie wie gezeigt Schwierigkeiten bereitet, sind differentielle Muster in Form der in den Tabellen 3.22, 3.25, 3.28 und 3.31 aufgelisteten Polypeptide erarbeitet worden, die nicht primär zwischen gesund und krank trennen, sondern eine Entscheidung im Sinne einer Differentialdiagnose ermöglichen sollen. Wie Abbildung 3.35 zeigt, trifft dies im Schnitt auf Proben der einzelnen Gruppen zu. Die verwendeten Muster sind nicht dazu geeignet gesunde Probanden im Sinne der hier untersuchten Erkrankungen zu erkennen (Gruppen Kontrolle, Kontrolle/Kinder, D1P0, D1P1, D1P2, D2P0), zeigen aber in den Gruppen der Nierenkranken (D2P2, D2P3, FSGS, MNGN, MCD) jeweils eine deutliche Tendenz in Richtung der richtigen Diagnose. Lediglich die Abgrenzung des Musters der diabetischen Nephropathie in den Gruppen FSGS und MNGN ist problematisch.

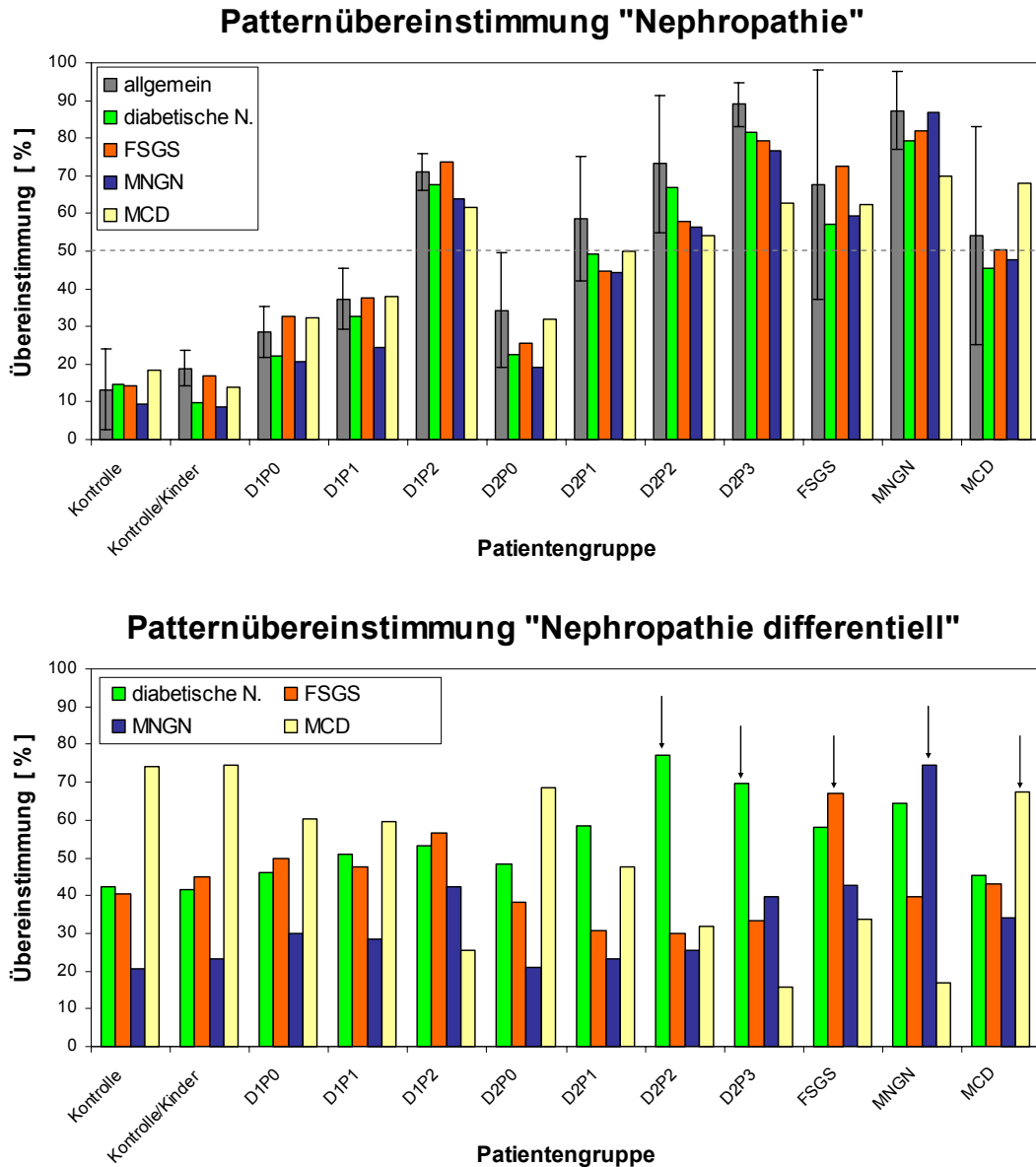


Abbildung 3.35: Übereinstimmung der Muster zur Diagnose der Nephropathien mit den Proben.
 Durch die Balken ist die mittlere Übereinstimmung der untersuchten Gruppen mit den definierten Mustern (allgemein = grau, diabetische Nephropathie = grün, FSGS = rot, MNGN = blau, MCD = gelb) dargestellt. Für das Muster „Nephritis allgemein“ ist die Standardabweichung eingezeichnet. Die Diagnosegrenze der Nephropathie ist oben gestrichelt eingezeichnet.
 Im unteren Bild sind die differentiellen Muster verwendet worden. Die jeweiligen zugehörigen Gruppen sind durch einen Pfeil markiert.

Mittels der Übereinstimmung zwischen den Polypeptiden in einer Probe und den erarbeiteten Mustern, sowie der Betrachtung differentieller Muster, kann eine Diagnose getroffen werden. Die aus den „bekannteren“ und für die Herausarbeitung der Muster verwendeten Proben abgeleiteten Diagnosen sind in den letzten drei Spalten der Tabellen im Anhang I und II aufgezeigt. Von den 439 untersuchten Proben erfüllten 413 (94 %) das Qualitätskriterium und wurden zur Diagnose verwendet.

Die Muster der Diabetes Typ I und Typ II Proben zeigen eine gute Sensitivität, lassen jedoch bei der Spezifität deutlich zu wünschen übrig. Die Typ I Diabetiker werden vollständig richtig als solche erkannt (n=35), jedoch spricht das Muster auch bei 82 weiteren Proben falsch positiv an. Die größte Gruppe bilden hier die Typ II Diabetiker (n=63; 25 %), während von den Kontrollpatienten nur 8 von 83 (9 %) falsch beurteilt werden. Die als primäre Kontrollen verwendeten Vergleichsproben (Kontrollen/Kinder) werden alle richtig negativ beurteilt. Von den Diabetikern des Typs II werden 212 (87 %) richtig als solche erkannt, 32 sind falsch negativ. 48 weitere Proben werden falsch positiv dem Muster für Diabetes Typ II zugeordnet. Hier bilden die anderen Nephropathiepatienten die größte Fehlergruppe.

Von den 92 Kontrollproben (83 Erwachsene, 9 Kinder) erzielt nur eine Probe eine Übereinstimmung mit einem der Muster für Nephropathie. Da bei allen anderen untersuchten Patienten zumindest die Möglichkeit einer Nierenschädigung nicht ausgeschlossen werden kann, liegt damit – unter der Voraussetzung, dass dieses Ergebnis falsch ist – die Spezifität der ermittelten Pattern bei 98,9 %.

Unter den untersuchten Typ I Diabetikern können mehrfach Übereinstimmungen mit den Mustern gefunden werden. Die beiden Proben mit hohen Albumin/Kreatinin-Quotienten zeigen deutliche Nephropathie-Marker, in einem Fall allerdings zum FSGS tendierend. Von den anderen Patienten zeigt einer ein nicht näher spezifizierbares FSGS- oder diabetische Nephropathie-Muster, drei weitere zeigen danach Anzeichen einer Nierenschädigung.

Von den 46 Proben der Typ II Diabetiker mit deutlich erhöhten Albumin/Kreatinin-Quotienten (D2P2 und D2P3) sind 42 berücksichtigt worden. Von diesen zeigen 32 (76 %) eine deutliche Übereinstimmung mit den Mustern der diabetischen Nephropathie. Bei weiteren vier Patienten kann nicht zwischen dieser und anderen Nephropathien unterschieden werden, so dass – unter der Voraussetzung dass bei vorliegendem Diabetes in erster Linie in Richtung diabetischer Nephropathie entschieden wird – bei 86 % aller Patienten richtig diagnostiziert werden kann. Von den verbliebenen vier Patienten zeigt einer ein FSGS-Muster, einer ein MNGN-Muster, einer ein nur schwaches Anzeichen für eine Nephropathie und einer zeigt keine Hinweise auf einen Nierenschaden.

Unter den Diabetikern mit normalen oder nur leicht erhöhten Albumin/Kreatinin-Werten (D2P0 und D2P1) kann in 13 von 211 Fällen (6 %) eine diabetische

Nephropathie angenommen werden. 9 weitere (4 %) zeigen FSGS- oder MCD-Muster. Unter diesen ist eine auffällig Häufung von Übereinstimmungen zum Muster für MCD (7) zu beobachten.

In den zwecks Abgrenzung zur diabetischen Nephropathie herangezogenen 41 Proben anderer Nephropathien, kann in 19 Fällen (46 %) das Muster der klinisch diagnostizierten Diagnose eindeutig erkannt werden. Die untersuchten FSGS-Proben (10 Proben, 3 FSGS, 4 DN., 2 MCD, 1 negativ, 30 % richtig) zeigen eine deutliche Tendenz zum Muster der diabetischen Nephropathie. Ebenso die verwendeten MNGN-Proben (16 Proben, 7 MNGN, 7 MNGN oder DN, 1 MCD, 1 unspezifisch, 44 % richtig). Allerdings ist hier in 14 von 16 Proben (87,5 %) das Muster für MNGN als mögliche Diagnose erkennbar. Die betrachteten MCD-Proben (15 Proben, 9 MCD, 2 MNGN, 1 MNGN oder DN, 3 negativ, 60 % richtig) zeigen die geringste Abgrenzung zu den Kontrollproben, so dass hier 3 von 15 (20 %) falsch negativ beurteilt werden.

Zur Überprüfung der definierten Muster sind 104 weitere Proben verwendet worden, die nicht in die Musterfindung eingegangen sind. Von diesen erfüllte nur eine Probe nicht das gesetzte Kriterium von 50 % Übereinstimmung mit dem „common-polypeptide“-Muster, was die Robustheit der verwendeten Methode unterstreicht.

Bei der Betrachtung der 32 eingesetzten Kontrollproben fällt auf, dass ein Großteil dieser Proben (26 von 31 verwendeten) positive Übereinstimmungen mit dem Muster Diabetes-Muster zeigen. Dieser Wert liegt sogar noch oberhalb der bei den Diabetikern beobachteten Quote (33 von 72). Es muss daher davon ausgegangen werden, dass das verwendete Muster für Diabetes (Typ II) eine außerordentlich schlechte Selektivität aufweist.

Im Bezug auf die Diagnose der Nephropathien sieht es dagegen anders aus. Unter den 31 berücksichtigten Kontrollproben wurden 3 mögliche Nephropathien diagnostiziert. Dabei handelt es sich in zwei Fällen um eine MCD, deren Muster – wie oben beschrieben – schwer von den Kontrollen zu unterscheiden ist. In einem Fall wurde eine mögliche diabetische Nephropathie gefunden. Da die untersuchten Kontrollproben nicht zwangsläufig ohne Diabetes sein müssen, liegt dieses Ergebnis im Bereich des möglichen.

Unter den einbezogenen Diabetiker-Proben wurde in 5 Fällen eine diabetische Nephropathie und in zwei weiteren Fällen eine nicht weiter differenzierbare Nephropathie diagnostiziert. Dabei wurden alle Fälle mit deutlich erhöhtem Albumin/Kreatinin-Level erfasst und es gibt keine falsch negativen Beurteilungen.

Falsch positive Diagnosen in Richtung anderer Nephropathien wurden ebenfalls nicht erstellt.

Abbildung 3.36 zeigt den ermittelten Übereinstimmungs-Faktor der untersuchten Proben als Funktion des Albumin/Kreatinin-Quotienten. Es ist eine deutliche lineare Korrelation zwischen den beiden Parametern zu erkennen (grau Linie). Darüber hinaus gehend fallen einige Proben ins Auge (gelbe und rote Kreise), bei denen das definierte Muster deutlich besser passt, als es der Quotient vermuten ließe. Bei den Patienten, von denen diese Proben stammen, kann daher die Gefahr einer diabetischen Nephropathie vermutet werden.

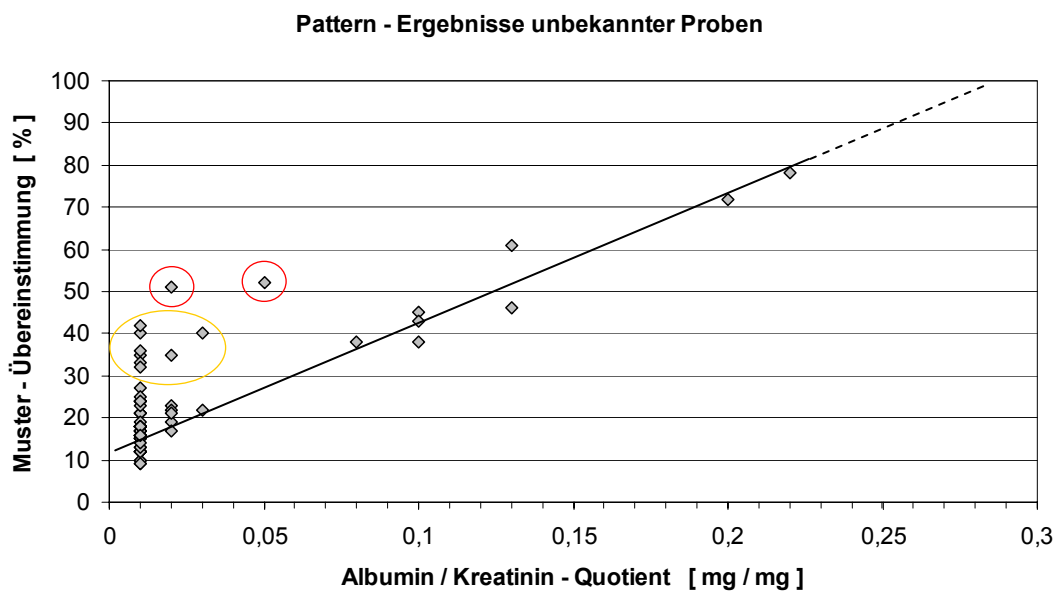


Abbildung 3.36: Übereinstimmung des Musters der diabetischen Nephropathie mit den Kontroll-Diabetikern

Die aus der Pattern-Diagnose stammende Muster-Übereinstimmung ist für die zur Kontrolle verwendeten Diabetiker über deren Albumin/Kreatinin-Quotienten aufgetragen. Die eingezeichnete Linie zeigt einen möglicherweise linearen Zusammenhang. Daneben erzielen die Proben einiger anderer Patienten überraschend hohe Werte (gelbe und rote Kreise). Hier kann – bei niedrigen A/K-Werten – von einer frühzeitigen Nephropathie – Gefahr ausgegangen werden. Zwei Proben mit deutlich höheren A/K-Werten (0,7 und 0,72) sind in dieser Abbildung nicht berücksichtigt.

3.3 Ergebnisse der Untersuchung von Plasma

Mit Hilfe der oben vorgestellten Präparationsmethode können Polypeptide aus Serum- und Plasmaproben isoliert werden, so dass sie für eine CE-ESI-MS Messung zugänglich sind. Der effektive Molekulargrößenausschluss der Präparation liegt bei etwa 15.000 kDa. Prominente größere Blutproteine können zwar in Spuren immer noch in den Spektren vorhanden und visuell wahrnehmbar sein, eine zuverlässige Zuordnung von Ladung und dekonvolutierter Proteinmasse ist aber aufgrund der begrenzten Auflösung des verwendeten Massenspektrometers nicht mehr möglich.

In dem hier gezeigten Beispiel sind Plasmaproben von dialysepflichtigen Patienten mit (14) und ohne (13) diagnostizierter Arteriosklerose untersucht worden. Wie auch bei den untersuchten Urinproben können eine Reihe von Polypeptiden erkannt werden, die in den meisten Proben und unabhängig von der betrachteten Erkrankung vorhanden sind (Typ „common“). Verschiedene Polypeptide sind aber in ihrem Auftreten regelmäßig verändert und kommen daher als Markerkandidaten in Frage. Die aufgrund ihres unterschiedlichen Vorkommens zwischen den beiden Gruppen diskriminierenden Polypeptide sind in Tabelle 3.37 aufgelistet. Typische Polypeptide der Kontrollgruppe („cntr“) sind solche, die hier in den meisten Proben vorhanden sind, in der Patientengruppe aber fehlen. Typische Polypeptide der Krankheitsgruppe („disease“) sind hingegen solche die in der Patientengruppe vorkommen, in der Kontrollgruppe aber nicht. Das in Tabelle 3.37 auf Position 1 angegebene Polypeptid konnte zwar in beiden Gruppen gleichmäßig gefunden werden, kommt aber bei allen positiven Patientenproben mit wesentlich verminderter Amplitude vor und wurde deshalb als Kontroll-typisch eingestuft.

Die Tatsache, dass nur eine relativ geringe Anzahl an diskriminierenden Polypeptiden gefunden werden konnte ist vermutlich auf die kleine Probenzahl zurückzuführen.

In Abbildung 3.38 sind zwei Plasmaproben eines Kontrollprobanden (a) und eines Patienten (b) dargestellt. Die aus den gemessenen Rohdaten ermittelten Polypeptidmassen sind in den Bildern c und d über der normierten Migrationszeit dargestellt. Wie zu erkennen ist, werden die in der Patientenprobe sichtbaren großen Proteine,

wie z.B. Albumin, nicht in ihrer echten Größe erkannt und somit auch nicht weiter berücksichtigt. Aus allen vorliegenden Messungen können Gesamtbilder für „gesund“ (e) und „erkrankt“ (f) erstellt und miteinander verglichen werden. Die aus diesem Vergleich mit statistischer Relevanz ermittelten Unterschiede sind in der Abbildung dargestellt. Polypeptide deren Auftreten im Krankheitsfall deutlich reduziert ist, sind durch die gelben Kreise, solche deren Auftreten erhöht ist, durch die gelben Dreiecke hervorgehoben.

Tabelle 3.37: Markerpolypeptide der Arteriosklerose im Plasma.

Nr.	Identifikation		Kontrollen		Patientenproben		Typ
	CE-Zeit [min]	Masse [kDa]	Anzahl (n=13)	%	Anzahl (n=14)	%	
1	30,71	1,53	10	77%	11	79%	CNTR*
2	20,97	1,24	9	69%	4	29%	CNTR
3	25,69	2,37	10	77%	2	14%	CNTR
4	21,51	2,01	9	69%	3	21%	CNTR
5	21,10	4,42	3	23%	11	79%	disease
6	12,77	3,76	1	8%	12	86%	disease
7	24,59	4,37	0	0%	11	79%	disease
8	18,13	4,93	1	8%	12	86%	disease
9	10,70	14,69	0	0%	13	93%	disease
10	13,03	2,02	4	31%	10	71%	disease
11	19,10	4,08	4	31%	10	71%	disease
12	21,44	4,44	4	31%	10	71%	disease
13	16,22	0,88	2	15%	12	86%	disease
14	23,68	0,97	3	23%	11	79%	disease
15	17,00	1,62	3	23%	10	71%	disease
16	16,01	1,90	2	15%	11	79%	disease
17	14,64	5,90	1	8%	10	71%	disease
18	14,74	1,86	4	31%	12	86%	disease
19	20,93	2,11	12	92%	10	71%	COMN
20	14,63	0,87	12	92%	11	79%	COMN
21	20,17	1,21	12	92%	11	79%	COMN
22	29,99	1,86	12	92%	14	100%	COMN
23	28,05	2,15	13	100%	12	86%	COMN
24	24,58	2,23	12	92%	13	93%	COMN
25	14,11	2,34	11	85%	14	100%	COMN
26	13,62	2,41	11	85%	13	93%	COMN
27	14,01	2,66	11	85%	14	100%	COMN
28	13,70	2,86	10	77%	11	79%	COMN
29	17,74	4,96	13	100%	14	100%	COMN
30	17,95	4,98	11	85%	14	100%	COMN
31	20,27	2,02	13	100%	14	100%	COMN
32	29,77	2,42	12	92%	13	93%	COMN
33	35,95	1,26	10	77%	11	79%	COMN

Erläuterungen: Typ COMN: regelmäßig und erkrankungsunabhängig in den meisten Proben vorhanden, CNTR: nur in den Kontrollproben oder dort deutlich erhöht, disease: nur oder erhöht in den Patientenproben. Das mit einem Stern gekennzeichnete Polypeptid tritt in den Patientenproben mit wesentlich verminderter Amplitude auf.

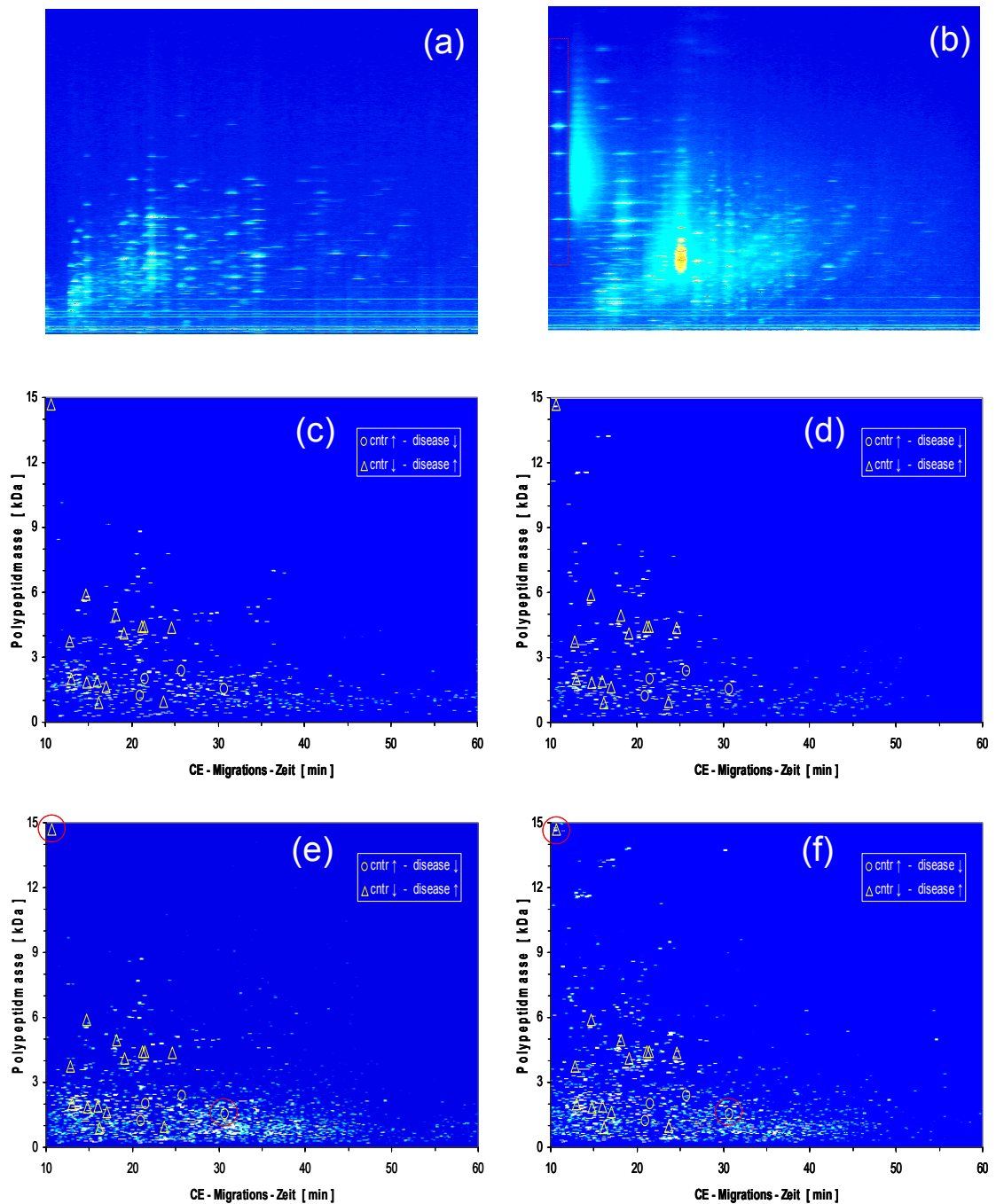


Abbildung 3.38: Datenerfassung und Markerdefinition in Plasmaproben.

In der oberen Reihe sind die Rohdatenplots der Plasmaproben eines Kontrollprobanden (a) und eines Patienten (b) dargestellt. Obwohl einige Unterschiede offensichtlich sind, können diese nicht richtig erfasst werden oder sind statistisch nicht relevant. Die Proteinplots in der mittleren Reihe zeigen aber auch einige Polypeptide, die nach der Auswertung aller Proben als diskriminierende Marker definiert wurden (gelbe Kreise und Dreiecke). Am deutlichsten wird dies anhand des 14,7 kDa großen Polypeptides bei 10,3 Minuten, welches aus den im Bild b durch einen roten Kasten hervorgehobenen Signalen resultiert.

In der unteren Reihe sind die zum Vergleich der beiden Gruppen verwendeten Gesamtmuster dargestellt. Die mit einem roten Kreis versehenen Polypeptide sind in Abbildung 3.39 näher dargestellt.

Zwei Beispiele für das Auftreten und die jeweils gemessenen Amplituden sind in der Abbildung 3.39 gezeigt. Das Polypeptid bei 10,7 Minuten und 14,7 kDa konnte in keiner der 13 untersuchten Kontrollproben detektiert werden, tritt aber mit teilweise erheblicher Intensität in fast allen Patientenproben auf. Auch im gezeigten Rohdatenplot (Abbildung 3.38 d) ist dieses Protein aufgrund seiner isolierten Lage schon deutlich zu erkennen (roter Kasten).

Das zweite Beispiel (30,7 min und 1,5 kDa) zeigt ein Polypeptid, welches zwar regelmäßig in den Kontrollen und in den Arterioskleroseproben erkannt wurde, jedoch mit deutlich unterschiedlicher Intensität vorliegt. Im Mittel liegt die errechnete Amplitude in den Kontrollen bei 17.000, in den Patientenproben aber nur bei 4.400. Dieser deutliche Unterschied in der Signalausprägung könnte ein Indiz für einen Zusammenhang mit der untersuchten Krankheit sein.

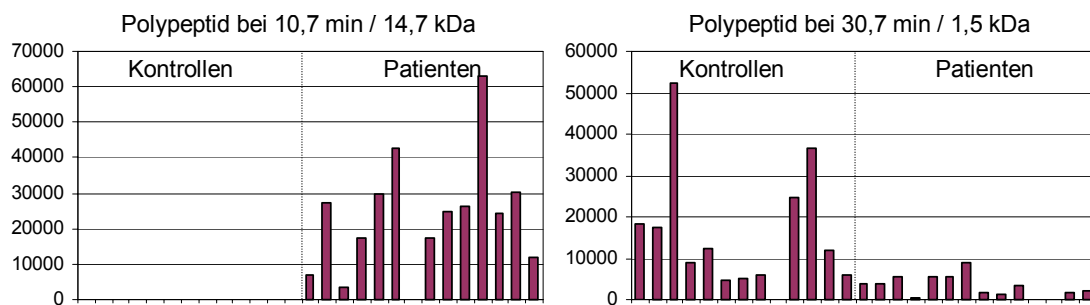


Abbildung 3.39: Detektierte Amplituden zweier Polypeptide in Plasmaproben.

Die linke Grafik zeigt ein Polypeptid, welches nur in Patientenproben gefunden werden konnte und niemals in den untersuchten Kontrollproben. Auf der rechten Seite ist hingegen ein Polypeptid gezeigt, welches in fast allen der untersuchten Proben gefunden werden konnte. Dennoch ist ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden verglichenen Probengruppen zu erkennen. In dem Plasma der betroffenen Patienten tritt das gezeigte Polypeptid mit stark reduzierter Amplitude auf.

Gezeigt ist jeweils die aus den MS-Signalen berechnete Gesamtamplitude des Polypeptides. Jede Kategorie, bzw. jeder Balken repräsentiert eine Probe.

3.4 Ergebnisse der Untersuchungen von Dialysaten

Mit Hilfe der beschriebenen CE-ESI-MS-Methode sind Dialysat-Proben untersucht und miteinander verglichen worden, welche während der Dialyse an unterschiedlichen Dialysemembranen gewonnen wurden. 15 Proben von „low-flux“- und 8 Proben von „high-flux“-Membran-Dialysen standen zur Verfügung.

Abbildung 3.40 Bild A und B stellt exemplarisch zwei der dabei aufgezeichneten Rohdatenplots gegenüber. Die unter A gezeigte Probe wurde während der Dialyse an einer „low-flux“-Membran gewonnen, während die in B gezeigte Probe einer Dialyse an einer „high-flux“-Membran entstammt.

Der entstehende Reindruck, dass die Proben aus „high-flux“-Membranen sich durch eine größere Intensität auszeichnen, kann bei der Betrachtung aller Proben nicht bestätigt werden. Vielmehr schwankt die Intensität der gefundenen Signale und damit das Maß für die Konzentration unabhängig vom verwendeten Membrantyp sehr stark zwischen einzelnen Proben. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass der Transmembranfluss der Proteine durch eine Reihe von klinischen und technischen Parametern beeinflusst wird, die hier nicht berücksichtigt werden konnten. Bei der weiteren Auswertung ist deshalb die Amplitude nicht betrachtet worden, sondern nur die An- oder Abwesenheit eines Polypeptides.

Bei der Beurteilung der verwendeten Membranen und der Untersuchung der vorhandenen Unterschiede steht zunächst der Gedanke im Vordergrund, dass einzelne Dialysemembranen sich primär in ihrer Ausschlussgröße für Proteine unterscheiden. In Abbildung 3.40 Bild E ist daher die Verteilung der Polypeptidgrößen der beiden untersuchten Dialysat-Typen dargestellt. Es ist zu erkennen, dass sich die Größenverteilung der ermittelten Polypeptide lediglich im höher molekularen Bereich voneinander unterscheidet. Hingegen divergiert die Gesamtzahl vorhandener Polypeptide deutlich. Während in den 15 Proben, die an „low-flux“-Membranen gewonnen wurden, im Schnitt nur 273 Polypeptide vorhanden waren (Bild C), waren es 611 in den Proben der „high-flux“-Membranen (Bild D). Dieser Unterschied erstreckt sich gleichmäßig über den gesamten Molekularmassenbereich. Oberhalb von 10 kDa sind in den Proben der „low-flux“-Membranen nur wenige Polypeptide zu finden. In den „high-flux“-Membranen hingegen tauchen in diesem Bereich noch einige Polypeptide mit erkennbarer Regelmäßigkeit auf. Dies führt dazu, dass 90 % aller

Polypeptide in den „low-flux“-Proben eine Molekulargröße von unter 5 kDa haben; in der anderen Gruppe hingegen liegt diese Grenze aufgrund einiger größerer Polypeptide bei etwa 7 kDa.

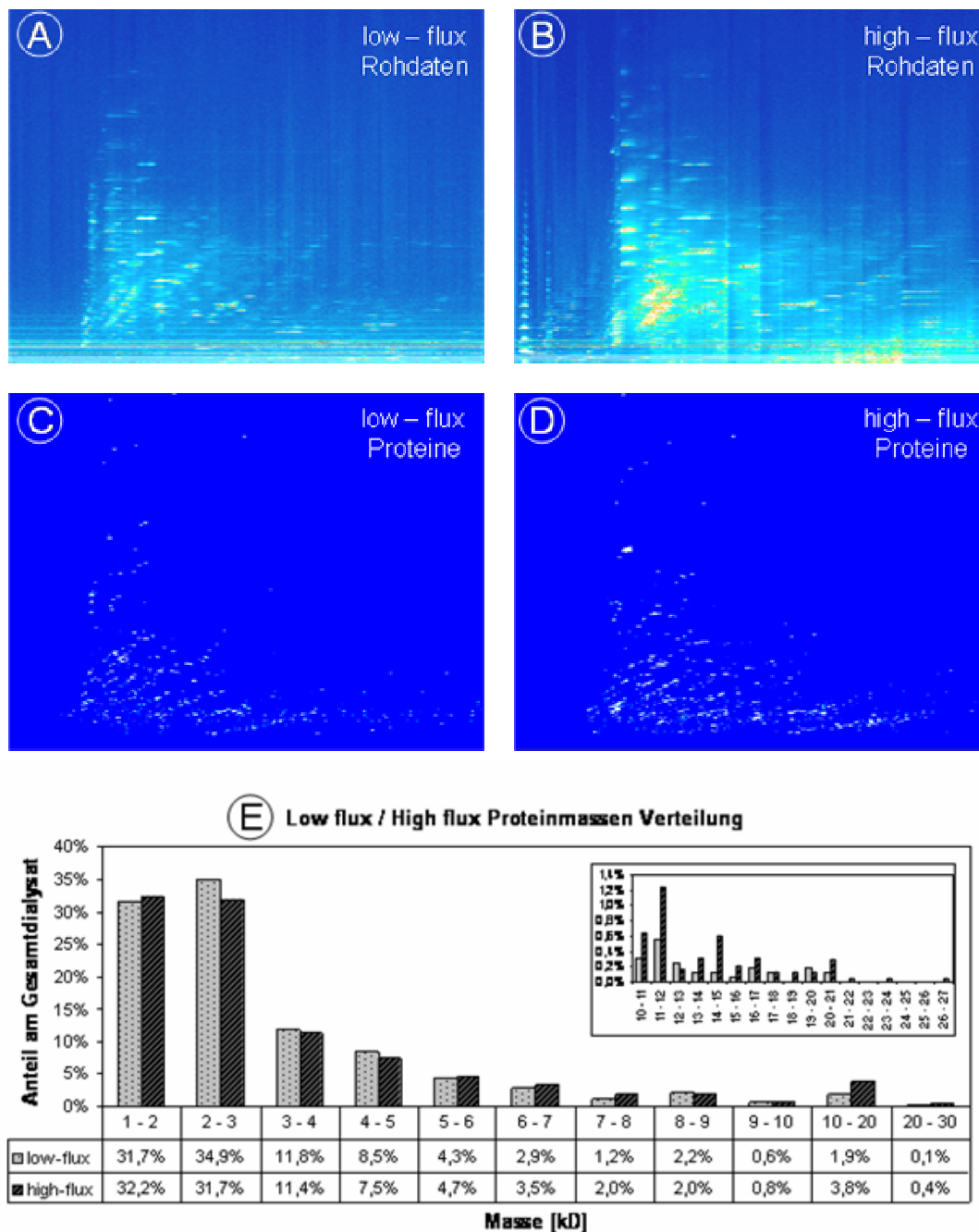


Abbildung 3.40: Vergleich der Dialysate von „high-flux“- und „low-flux“- Membranen.

Dargestellt sind die Rohdatenplots zweier Proben in den Bildern A und B. Die daraus resultierenden Proteinplots sind in den Bildern C und D dargestellt.

Teilbild E zeigt eine Darstellung der Proteingrößenverteilung innerhalb der untersuchten Proben der beiden Membrantypen. Das große Bild zeigt den gesamten Molekularbereich bis 30 kDa, während in dem eingeschobenen Bild der Bereich von 11 bis 27 kDa näher aufgetrennt ist.

Insgesamt konnten in den untersuchten Proben 3.827 verschiedene und durch ihre Masse und CE-Zeit charakterisierten Polypeptide gefunden werden. Unter diesen waren 14, die typischerweise nur in den Proben aus den „low-flux“-Membranen vorhanden waren. Hingegen waren es 146, welche als „high-flux“-spezifisch einzustufen sind. Erstaunlicherweise konnten nur 33 Polypeptide ermittelt werden, die in fast allen Proben vorhanden waren (Tabelle 3.41). „low-flux“-typische Polypeptide umfassen demnach einen Bereich bis 10,2 kDa, während die „high-flux“-spezifischen bis zu 21 kDa groß sind.

Im Vergleich zu Urinproben gesunder Erwachsener konnten nur 43 der hier aufgeführten 193 Polypeptide (22 %) im typischen Urinmuster wiedergefunden werden. Auch umgekehrt fehlen viele im Urin zu findende Massen in den hier untersuchten Dialysaten.

Tabelle 3.41: Spezifische Proteinmuster im Dialysat von „high-flux“- und „low-flux“-Membranen

Nr.	Identifikation		Anzahl Auftreten			Typ	Low-flux Dialysate															High-flux Dialysate						
	[Da]	[min]	Total	in LF	in HF		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1	10199,06	15,15	8	8	0	LF				+	+	+	+	+	+	+	+	+										
2	1423,41	16,89	11	11	0	LF	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+										
3	2048,00	17,37	9	9	0	LF	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+										
4	2064,57	18,54	11	11	0	LF	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+										
5	2147,40	7,86	9	8	1	LF	+	+	+						+	+	+	+										+
6	2170,03	23,86	8	8	0	LF	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+										
7	2414,04	10,63	13	13	0	LF	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+									
8	2658,02	10,42	14	13	1	LF	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+									+
9	2859,60	11,69	10	8	2	LF	+	+	+	+	+	+	+															+
10	4322,02	20,53	15	13	2	LF	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+								+
11	5228,97	20,98	9	9	0	LF	+	+				+	+	+	+	+	+	+	+									
12	6799,19	15,21	9	8	1	LF	+	+				+	+	+	+	+	+	+	+									+
13	8176,52	11,77	9	9	0	LF	+	+	+	+	+	+	+	+														
14	8289,72	11,49	9	9	0	LF	+	+	+	+	+	+				+												
15	1013,18	33,97	6	0	6	HF																						+
16	1044,60	12,09	5	0	5	HF																						+
17	1061,30	21,72	5	0	5	HF																						+
18	1062,60	12,04	6	0	6	HF																						+
19	1084,22	34,05	6	0	6	HF																						+
20	1085,22	25,38	5	0	5	HF																						+
21	1088,37	22,16	7	0	7	HF																						+
22	1091,40	22,13	7	0	7	HF																						+
23	1095,36	18,80	7	0	7	HF																						+
24	11681,12	15,40	5	0	5	HF																						+
25	11735,18	15,89	8	1	7	HF	+																					+
26	11896,59	16,07	6	0	6	HF																						+
27	1209,34	35,29	5	0	5	HF																						+
28	1216,46	17,54	7	0	7	HF																						+
29	1244,50	23,93	7	0	7	HF																						+
30	1247,28	25,47	6	0	6	HF																						+
31	1287,43	39,99	6	0	6	HF																						+
32	1324,33	40,25	6	0	6	HF																						+
33	1347,48	39,20	5	0	5	HF																						+
34	1374,50	26,72	6	0	6	HF																						+
35	1386,40	41,29	5	0	5	HF																						+
36	14556,73	14,13	6	0	6	HF																						+
37	14682,82	14,00	5	0	5	HF																						+
38	1501,54	20,26	8	2	6	HF	+					+																+
39	1511,29	20,06	7	2	5	HF																						+
40	1565,48	44,11	6	0	6	HF																						+
41	1568,65	19,78	6	0	6	HF																						+

Fortsetzung nächste Seite

3.4 Ergebnisse der Untersuchungen von Dialysaten

Tabelle 3.41: Spezifische Proteinmuster im Dialysat (Fortsetzung).

Nr.	Identifikation		Anzahl Auftreten			Typ	Low-flux Dialysate										High-flux Dialysate												
	[Da]	[min]	Total	in LF	in HF		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
42	15816,48	14,61	8	2	6	HF	+					+										+	+	+		+	+	+	
43	1592,58	44,11	6	0	6	HF																	+	+	+		+	+	+
44	1638,58	17,92	6	0	6	HF																	+	+	+		+	+	+
45	1719,03	5,72	9	1	8	HF																+	+	+	+	+	+	+	
46	1733,38	44,07	5	0	5	HF																	+	+	+		+	+	
47	1750,70	12,66	6	0	6	HF																	+	+	+		+	+	
48	1761,70	30,18	5	0	5	HF																	+	+			+	+	
49	1764,55	36,29	5	0	5	HF																	+	+	+		+	+	
50	1775,56	17,35	7	0	7	HF																	+	+	+		+	+	
51	1780,44	29,49	5	0	5	HF																	+	+			+	+	
52	1846,54	17,73	7	0	7	HF																	+	+	+		+	+	
53	1864,08	39,99	5	0	5	HF																	+	+	+		+	+	
54	1869,74	29,95	5	0	5	HF																	+	+			+	+	
55	1871,16	5,80	5	0	5	HF																	+	+	+		+	+	
56	1876,56	27,67	6	0	6	HF																	+	+	+		+	+	
57	1878,79	11,78	7	0	7	HF																	+	+	+		+	+	
58	1932,42	18,34	5	0	5	HF																	+	+			+	+	
59	1932,94	24,88	5	0	5	HF																	+	+			+	+	
60	1949,88	12,02	6	0	6	HF																	+	+			+	+	
61	1999,52	30,78	5	0	5	HF																	+	+			+	+	
62	2022,21	23,28	7	0	7	HF																	+	+	+		+	+	
63	2055,64	34,15	5	0	5	HF																	+	+	+		+	+	
64	2069,71	14,72	5	0	5	HF																	+	+	+		+	+	
65	2070,46	33,02	5	0	5	HF																	+	+	+	+	+	+	
66	2083,08	26,49	5	0	5	HF																	+	+	+		+	+	
67	2090,57	17,36	7	0	7	HF																	+	+	+		+	+	
68	21052,38	14,77	5	0	5	HF																	+	+			+	+	
69	2108,33	17,02	5	0	5	HF																	+	+			+	+	
70	2112,31	31,66	6	0	6	HF																	+	+	+		+	+	
71	2127,70	32,32	5	0	5	HF																	+	+			+	+	
72	2138,70	28,59	6	0	6	HF																	+	+	+		+	+	
73	2149,32	16,75	7	2	5	HF																	+	+	+		+	+	
74	2149,47	38,06	6	0	6	HF																	+	+	+		+	+	
75	2153,52	34,09	8	2	6	HF																	+	+			+	+	
76	2161,85	12,49	6	0	6	HF																	+	+	+		+	+	
77	2185,22	34,35	6	0	6	HF																	+	+			+	+	
78	2198,79	14,66	7	0	7	HF																	+	+	+		+	+	
79	2208,14	33,72	5	0	5	HF																	+	+			+	+	
80	2255,72	25,40	6	1	5	HF																	+	+			+	+	
81	2265,55	24,50	11	5	6	HF	+			+													+	+	+		+	+	
82	2286,13	14,08	8	2	6	HF	+																+	+	+		+	+	
83	2291,56	36,77	6	0	6	HF																	+	+	+		+	+	
84	2299,00	11,58	7	0	7	HF																	+	+	+		+	+	
85	2307,90	16,64	5	0	5	HF																	+	+			+	+	
86	2314,80	13,79	7	1	6	HF	+																+	+	+		+	+	
87	2323,66	28,12	5	0	5	HF																	+	+	+		+	+	
88	2324,42	14,56	6	1	5	HF																	+	+	+	+	+	+	
89	2342,82	14,80	6	0	6	HF																	+	+	+		+	+	
90	2355,05	26,09	5	0	5	HF																	+	+			+	+	
91	2358,79	20,40	6	0	6	HF																	+	+	+		+	+	
92	2376,87	39,41	6	0	6	HF																	+	+	+		+	+	
93	2394,58	30,20	6	0	6	HF																	+	+	+		+	+	
94	2395,69	14,65	8	0	8	HF																	+	+	+	+	+	+	
95	2524,20	14,42	5	0	5	HF																	+	+			+	+	
96	2542,87	13,68	7	1	6	HF	+																+	+	+		+	+	
97	2580,42	32,02	5	0	5	HF																	+	+	+		+	+	
98	2622,73	14,62	7	0	7	HF																	+	+	+		+	+	
99	2635,94	29,91	7	2	5	HF	+																+	+			+	+	
100	2636,82	41,39	5	0	5	HF																	+	+	+		+	+	
101	2639,80	15,30	8	1	7	HF	+																+	+	+		+	+	
102	2695,49	13,93	7	2	5	HF																	+	+	+		+	+	
103	2728,30	14,70	7	0	7	HF																	+	+	+		+	+	
104	2774,55	19,48	8	2	6	HF																	+	+	+		+	+	
105	2807,08	29,97	6	0	6	HF																	+	+	+		+	+	
106	2819,82	14,91	7	1	6	HF	+																+	+	+		+	+	
107	2923,43	21,25	5	0	5	HF																	+	+			+	+	
108	2939,16	20,99	5	0	5	HF																	+	+			+	+	
109	2942,05	25,31	8	0	8	HF																	+	+	+	+	+	+	
110	2955,97	20,72	5	0	5	HF																	+	+	+		+	+	

Fortsetzung nächste Seite

3.4 Ergebnisse der Untersuchungen von Dialysaten

Tabelle 3.41: Spezifische Proteinmuster im Dialysat (Fortsetzung).

Nr.	Identifikation		Anzahl Auftreten		Typ	Low-flux Dialysate												High-flux Dialysate											
	[Da]	[min]	Total	in LF		in HF	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
111	2987,58	13,79	5	0	5	HF																		+	+	+	+	+	
112	3016,30	13,34	7	1	6	HF											+					+	+	+		+	+	+	
113	3022,41	17,38	6	1	5	HF																+	+	+		+	+	+	
114	3068,92	20,89	6	0	6	HF																	+	+	+		+	+	+
115	3197,13	18,05	6	1	5	HF	+																+	+	+		+	+	+
116	3208,89	27,98	5	0	5	HF																	+	+	+		+	+	+
117	3237,93	14,42	7	0	7	HF																	+	+	+		+	+	+
118	3265,69	25,53	7	0	7	HF																	+	+	+	+	+	+	+
119	3300,16	19,47	5	0	5	HF																	+	+	+		+	+	+
120	3328,88	43,20	5	0	5	HF																	+	+		+	+	+	+
121	3366,10	13,40	6	0	6	HF																	+	+	+		+	+	+
122	3453,11	13,43	7	0	7	HF																	+	+	+		+	+	+
123	3630,52	13,65	5	0	5	HF																		+		+	+	+	+
124	3729,19	14,11	7	0	7	HF																	+	+	+		+	+	+
125	3923,32	20,57	5	0	5	HF																	+	+	+		+	+	+
126	3944,58	29,92	5	0	5	HF																	+	+		+	+	+	+
127	4032,24	15,48	7	0	7	HF																	+	+	+		+	+	+
128	4044,42	17,52	6	0	6	HF																	+	+	+		+	+	+
129	4070,30	21,26	5	0	5	HF																	+	+		+	+	+	+
130	4088,62	15,68	5	0	5	HF																	+	+	+		+	+	+
131	4233,36	24,66	5	0	5	HF																	+	+		+	+	+	+
132	4244,38	14,17	5	0	5	HF																	+	+	+		+	+	+
133	4347,97	28,20	7	0	7	HF																	+	+	+		+	+	+
134	4359,00	14,56	6	0	6	HF																	+	+	+		+	+	+
135	4378,91	27,08	7	1	6	HF										+							+	+	+		+	+	+
136	4414,56	25,29	5	0	5	HF																		+		+	+	+	+
137	4440,84	27,02	7	0	7	HF																	+	+	+		+	+	+
138	4456,89	26,23	6	0	6	HF																	+	+	+		+	+	+
139	4780,52	30,07	5	0	5	HF																	+	+		+	+	+	+
140	4800,23	30,11	6	0	6	HF																	+	+	+		+	+	+
141	4817,32	28,87	5	0	5	HF																	+	+		+	+	+	+
142	4833,05	29,02	6	0	6	HF																	+	+	+		+	+	+
143	4849,27	29,89	5	0	5	HF																	+	+		+	+	+	+
144	5243,72	18,52	7	0	7	HF																	+	+	+		+	+	+
145	5452,08	17,31	6	0	6	HF																	+	+	+		+	+	+
146	5839,13	17,35	8	3	5	HF											+						+	+	+	+	+	+	+
147	6366,22	19,65	5	0	5	HF																	+	+	+		+	+	+
148	6387,63	22,17	6	0	6	HF																	+	+	+		+	+	+
149	6651,60	20,25	6	1	5	HF																		+		+	+	+	+
150	6651,68	33,92	5	0	5	HF																	+	+	+		+	+	+
151	6688,28	21,95	6	0	6	HF																		+	+		+	+	+
152	6813,60	20,20	5	0	5	HF																	+	+		+	+	+	+
153	7659,99	14,21	7	0	7	HF																	+	+	+		+	+	+
154	7870,27	20,85	6	0	6	HF																	+	+	+		+	+	+
155	8000,72	19,18	5	0	5	HF																	+	+	+		+	+	+
156	8015,71	19,10	7	0	7	HF																	+	+	+		+	+	+
157	8512,43	19,15	6	0	6	HF																	+	+	+		+	+	+
158	8667,44	14,11	7	0	7	HF																	+	+	+		+	+	+
159	8837,30	21,89	6	0	6	HF																	+	+	+		+	+	+
160	9866,23	21,08	6	0	6	HF																	+	+	+		+	+	+
161	10329,33	16,23	17	10	7	CO	+							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
162	11721,46	12,22	16	9	7	CO	+							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
163	1250,47	21,73	16	9	7	CO	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
164	1409,48	16,96	20	13	7	CO	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
165	1723,15	36,85	19	13	6	CO	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
166	1787,30	13,75	18	13	5	CO	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
167	1882,62	12,67	19	11	8	CO	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
168	2015,19	27,39	20	13	7	CO	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
169	2079,22	36,88	18	11	7	CO	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
170	2133,74	21,66	18	10	7	CO	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
171	2169,68	18,95	15	8	7	CO	+			+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
172	2204,75	22,69	17	11	6	CO	+	+		+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
173	2220,87	22,57	17	11	6	CO	+	+		+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
174	2226,84	22,24	17	11	6	CO	+	+		+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
175	2249,39	20,36	18	11	7	CO	+			+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
176	2559,07	10,62	19	12	7	CO	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
177	2565,04	18,12	16	8	8	CO	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
178	2824,70	18,94	17	10	7	CO	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
179	2999,02	16,82	19	12	7	CO	+	+		+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Fortsetzung nächste Seite

Tabelle 3.41: Spezifische Proteinmuster im Dialysat (Fortsetzung).

Nr.	Identifikation		Anzahl Auftreten			Typ	Low-flux Dialysate													High-flux Dialysate								
	[Da]	[min]	Total	in LF	in HF		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
180	3013,04	16,73	14	8	6	CO	+	+		+			+	+		+	+			+	+	+						
181	3314,29	13,34	15	9	6	CO	+	+	+	+			+	+	+					+	+	+				+	+	+
182	3891,49	19,81	14	9	5	CO	+		+			+	+	+	+					+	+		+			+	+	+
183	4418,51	16,38	19	13	6	CO	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+		+	+	+			+	+	+	+
184	4933,20	13,67	21	13	8	CO	+		+			+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
185	4960,16	13,59	21	14	7	CO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
186	4976,04	13,84	18	11	7	CO	+	+	+	+	+	+	+	+	+				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
187	4999,86	20,40	14	9	5	CO	+		+			+	+	+	+					+	+				+	+	+	+
188	5121,84	14,42	17	10	7	CO	+		+			+	+	+	+					+	+	+	+		+	+	+	+
189	5258,24	15,74	19	12	7	CO	+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+	+	+
190	6237,65	14,84	19	12	7	CO	+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+	+	+
191	6542,27	14,90	20	13	7	CO	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
192	8499,69	13,42	15	10	5	CO	+	+	+	+	+	+								+	+		+	+	+	+	+	+
193	8559,00	11,85	19	12	7	CO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+

Erläuterungen: Typ LF: spezifisch für low-flux-Membranen; Typ HF: spezifisch für high-flux-Membranen; Typ CO: in den meisten Proben, unabhängig vom Membrantyp gefunden; „+“: Polypeptid wurde in der Probe gefunden.

Die gewonnenen Daten zeigen, dass zwischen den heute klinisch verwendeten Dialysemembranen erhebliche Unterschiede in ihrer Durchlässigkeit für einzelne Proteine bestehen. „High-flux“-Membranen zeichnen sich dabei nicht in erster Linie durch einen größeren Molekularmassenbereich aus, sondern durch ein erheblich vergrößertes Spektrum an Polypeptiden jeden Größenbereichs.

Interessanter Weise können in einigen Proben auch deutliche Signale gefunden werden, die nicht-peptidischen Ursprungs sind (Abbildung 3.42). Die Ladung dieser Signale beträgt immer eins und die Isotopenverteilung ist deutlich von der der Polypeptide abweichend, ähnelt aber der von chlorierten Substanzen. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um synthetische, chlorierte Substanzen, die durch die Dialysemembranen oder Schläuche in die Probe gelangt sind.

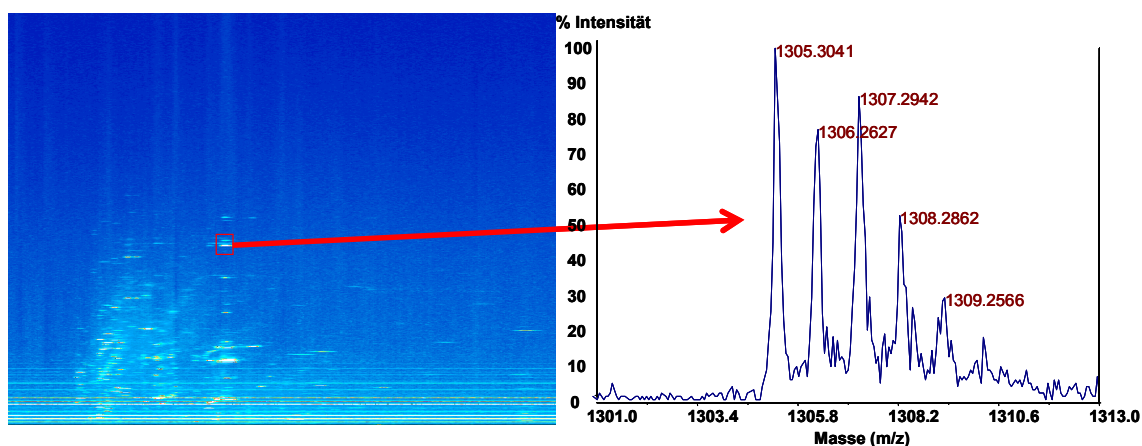


Abbildung 3.42: Signale nicht-peptidischen Ursprungs in Proben aus Dialysaten.

Gezeigt ist ein Ausschnitt aus dem Massenspektrum der Messung einer Dialysatprobe. Das dargestellte Spektrum enthält Isotopenpeaks mit dem Abstand 1 m/z. Daneben sind der monoisotopische Peak, sowie der um zwei Masseneinheiten höhere Peak dominierend. Dies ist eine für Proteine völlig untypische Verteilung, so dass angenommen werden kann, dass es sich hierbei nicht um eine Polypeptid handelt. Das gezeigte Spektrum ist vielmehr typisch für eine synthetische, chlorierte Substanz.

3.5 Ergebnisse der Untersuchungen zur Stammzelltransplantation

Das vierte hier beschriebene Projekt beschäftigt sich mit der Auffindung von Markern im Urin von Patienten, die als Folge einer Leukämieerkrankung eine Stammzelltransplantation erhalten haben. Eine dabei häufig auftretende Nebenwirkung ist eine Abstoßungsreaktion des Transplantats gegen den Körper, eine „graft-versus-host-disease“. Um Polypeptide definieren zu können, die im Zusammenhang mit der Erkrankung stehen, wurden zunächst Proben von Patienten bei denen eine GvHD diagnostiziert worden ist, mit solchen verglichen, die komplikationsfrei geblieben sind. Dabei wurden Urinproben verwendet, die möglichst kurz vor oder kurz nach dem Zeitpunkt der Diagnose gewonnen wurden. Während die Auswahl der Polypeptide nach den bereits zuvor verwendeten Kriterien (Frequenz und mittlere Amplitude innerhalb der betrachteten Gruppen) erfolgte, wurden die daraus gewonnenen Markerkandidaten mittels einer Support-Vector-Machine (SVM) mit dem Ziel einer möglichst zuverlässigen Gruppentrennung getestet. Tabelle 3.43 stellt die Polypeptide zusammen, deren Verwendung das beste Ergebnis erzielte.

Tabelle 3.43: Polypeptidmarker zur Diagnose der GvHD im Urin

Nr.	Polypeptid Identifikation		Frequenz in der Gruppe		Mittlere Amplitude	
	Masse (kDa)	CE-Zeit (min)	GvHD	ohne Probleme	GvHD	ohne Probleme
1	1,97	34,7	82%	18%	801	89
2	1,75	36,0	55%	0%	280	
3	1,85	34,0	64%	9%	314	28
4	1,07	37,8	50%	0%	434	
5	1,57	36,0	59%	9%	246	25
6	1,87	46,3	50%	0%	108	
7	4,00	30,2	50%	0%	842	
8	1,83	33,2	95%	73%	16298	2047
9	2,38	34,6	18%	73%	53	301
10	3,44	44,1	45%	100%	4581	12182
11	1,35	48,1	23%	82%	173	1572
12	3,21	33,6	23%	82%	825	3605
13	6,19	38,8	23%	82%	275	2161
14	1,73	50,1	32%	91%	344	799
15	3,09	45,9	27%	91%	283	974
16	1,85	56,6	9%	82%	5	650

Ausgewählt wurden dabei 7 Polypeptide, die als GvHD-typisch einzustufen sind (Nr. 1-7). Bei diesen ist der prozentuale Anteil innerhalb der GvHD-Gruppe wenigstens um 50 % höher als in der Kontrollgruppe. Weitere 8 Polypeptide zeigten ein umgekehrtes Verhalten und wurden als nicht-GvHD-typisch eingestuft (Nr. 9-16). Eines der ausgewählten Polypeptide (Nr. 8) wurde in den GvHD-Proben durchweg mit weitaus höherer Amplitude detektiert, als in den Kontrollproben.

Mit Hilfe des verwendeten SVM-Algorithmus wurde eine vollständige Kreuzvalidierung durchgeführt. Die Spezifität der Zuordnung lag danach bei 82 % und die Sensitivität bei 100 %.

In Abbildung 3.44 ist sind die Gesamtbilder der beiden Gruppen gegenübergestellt. Dabei handelt es sich um synthetische Abbildungen, die alle detektierten Polypeptide unter Berücksichtigung der gruppenspezifischen Häufigkeit und der Einzelamplituden beinhalten. Darunter sind vier der ausgewählten Polypeptide vergrößert dargestellt. Während die Gesamtbilder zunächst kaum ersichtliche Unterschiede zeigen, werden diese in den vergrößerten Darstellungen deutlich.

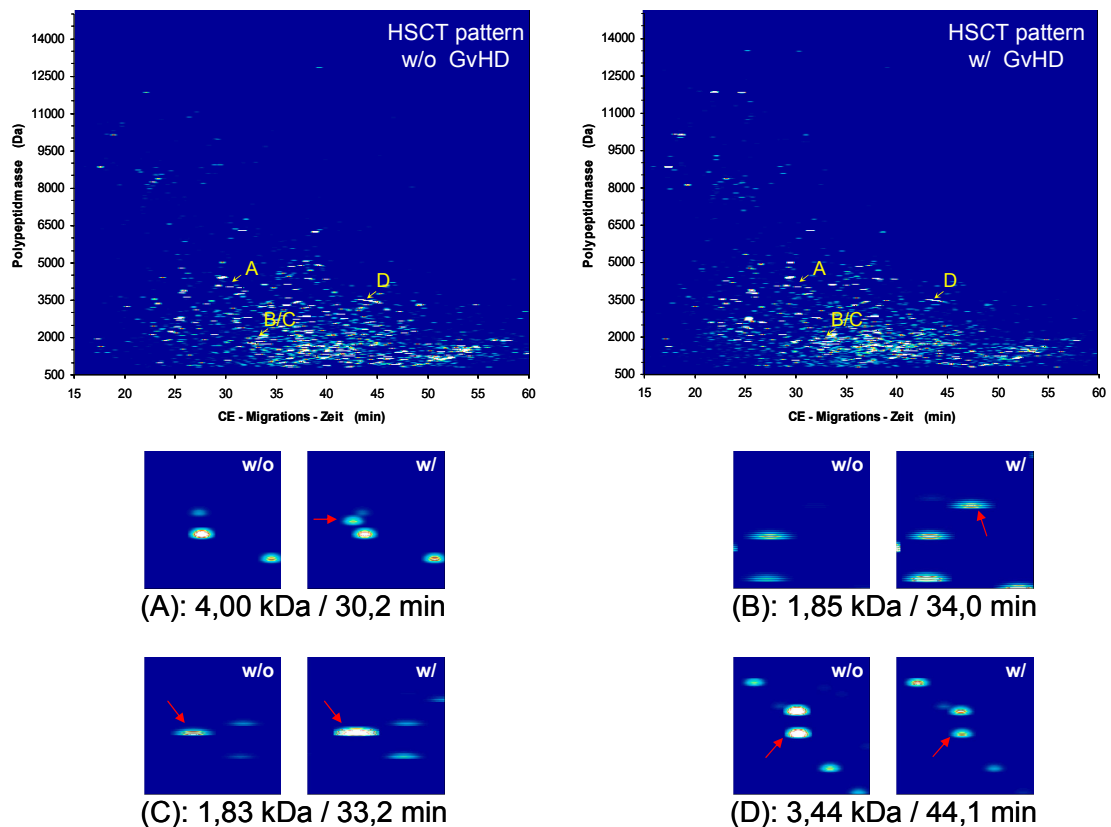


Abbildung 3.44: Gesamtabbildungen der Urine von Transplantationspatienten ohne Probleme (w/o GvHD, links) und in zeitlicher Nähe einer GvHD-Diagnose (w/ GvHD, rechts). Vier der ausgewählten Polypeptide sind in den unteren Darstellungen herausgezoomt.

Das unter (A) gezeigte Polypeptid von 4,00 kDa wurde in der Hälfte aller GvHD-Proben detektiert, jedoch in keiner der Kontrollproben. Das unter (B) gezeigte wurde in 64 % aller GvHD-Proben gefunden und nur in 9 % aller Kontrollproben.

Bei Polypeptid (C) handelt es sich um das bereits oben genannte, welches mit 95 % und 73 % zwar in den meisten Proben erkannt werden konnte, dessen mittlere Amplitude in den GvHD-Proben mit mehr als 16.000 aber deutlich über derjenigen der Kontrollpatienten (ca. 2.050) lag.

Das vierte dargestellte Polypeptid (D) zeigt ein Beispiel eines nicht-GvHD-typischen Markerpeptides. Dieses konnte in allen Kontrollproben (100 %) mit einer mittleren Amplitude von 12.000, aber nur in 45 % aller GvHD-Proben mit im Mittel 4.800 detektiert werden.

Da die Möglichkeit einer Abstoßungsreaktion ab dem Tag der Stammzelltransplantation (HSCT) besteht und bei einer positiven Diagnose schnell medikamentös interveniert werden muss, ist der zeitliche Verlauf der Polypeptid-Detektion von besonders großem Interesse. Abbildung 3.45 stellt diesen für zwei Patienten gegenüber. Das Polypeptid Nr. 3 konnte bei Patient Nr. 293, der am Tag +15 nach der HSCT eine GvHD entwickelte, ab Tag +1 mit stetig steigender Tendenz erkannt werden. In diesem Fall wäre das gezeigte Polypeptid ein idealer Marker. Wie Tabelle 3.43 deutlich macht, wäre es alleine aber unbrauchbar.

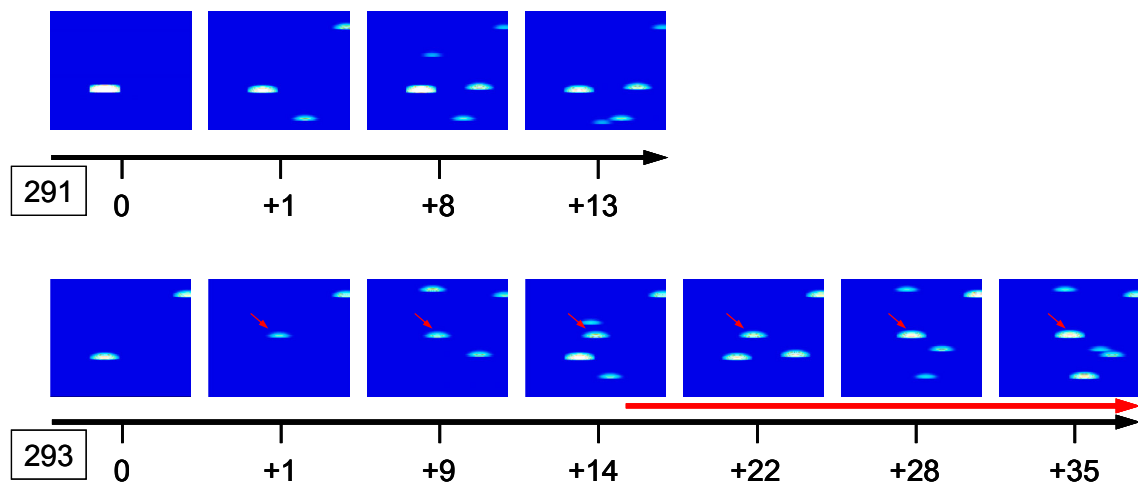


Abbildung 3.45: Vergrößerte Darstellung des Polypeptides Nr. 3 (1,85 kDa / 34 min) im zeitlichen Verlauf bei zwei Patienten.

Die Zeit nach der Transplantation verlief bei Patient Nr. 291 ohne Probleme. Bei Patient Nr. 293 wurde hingegen am Tag 15 nach der Stammzelltransplantation eine GvHD diagnostiziert. Der schwarze Balken zeigt den zeitlichen Ablauf nach Transplantation (in Tagen), der rote Balken den Zeitraum der GvHD.

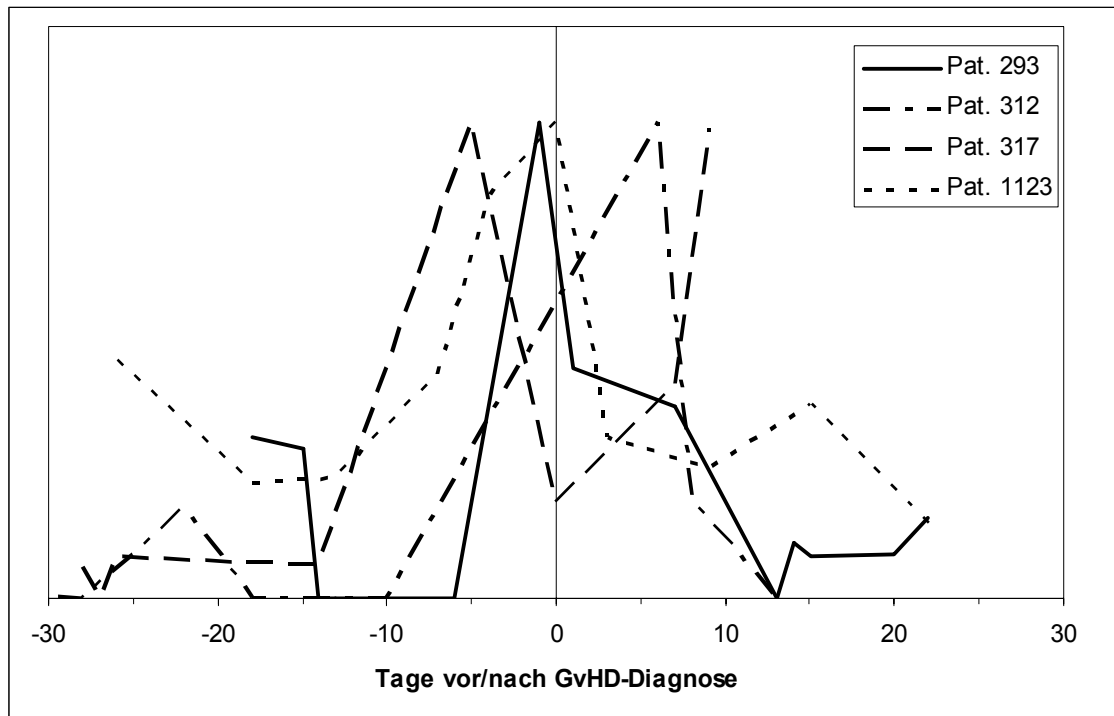


Abbildung 3.46: Verläufe der Amplitude des Polypeptides Nr. 8 (1,83 kDa / 33,2 min) bei vier Patienten mit ausgebrochener GvHD bezogen auf den Tag der GvHD Diagnose.

Als weiteres Beispiel ist in Abbildung 3.46 das Polypeptid Nr. 8 gezeigt, welches bei der Auswahl der verwendeten Marker dadurch auffiel, dass es in den GvHD-Proben mit deutlich verstärkter Amplitude auftrat. Gezeigt sind die Verläufe der Amplitude dieses Polypeptides in 4 Patienten mit ausgebrochener GvHD. Es wird deutlich, dass die Amplituden in allen Fällen etwa 5 bis 15 Tage vor der Diagnose angestiegen sind.

Mittels MALDI-MS/MS sind die beiden zuletzt gezeigten Polypeptide fragmentiert und analysiert worden. In beiden Fällen konnte eine positive Identifikation der Fragmentmuster erfolgen. Aus Polypeptid Nr. 3 (1,85 kDa / 34,0 min) konnte die Sequenz WGQYDLLVLPSPFPYG ermittelt werden (Abb. 3.49 oben), welche aus der Leukotrien-A4-Hydrolase entstammt. Bei Polypeptid Nr. 8 (1,83 kDa / 33,2 min) handelt es sich um die Sequenz LVRVYTKKVPQVSTPTL (Abb. 3.49 unten), einem Peptid aus dem humanen Serumalbumin.

Insbesondere die Leukotrien-A4-Hydrolase (LTA₄H, auch bekannt als Grp94) ist im Rahmen der GvHD-Diagnostik ein interessantes Polypeptid. Es handelt sich um ein bifunktionales Zink-Metall-Enzym mit Epoxyd-Hydrolase- und Aminopeptidase-Aktivität (Funk 2001). LTA₄H katalysiert die stereoselektive Hydrolyse von LTA₄ zu LTB₄ und stellt dabei den limitierenden Schritt in dessen Biosynthese dar (Haeggstrom

3.5 Ergebnisse der Untersuchung zur Stammzelltransplantation

2000). Leukotrien-B4 schließlich ist nicht nur eines der wichtigsten proinflammatorischen Signalmoleküle, welches in nanomolarer Konzentration die Annäherung und Anheftung von Leukozyten an das Endothel vermittelt. Es moduliert auch Immunantworten und ist Teil vieler Abwehrreaktionen gegen akute und chronische Entzündungen, wie Nephritis, Arthritis und Dermatitis (Haeggstrom et al. 2002). Takatsuka et al. haben die Serumkonzentration von LTB₄ mit der Stärke der GvHD nach einer Stammzelltransplantation in Verbindung bringen können und dieses als diagnostischen Marker, wie auch zur Überprüfung von medikamentösen Therapien vorgeschlagen (Takatsuka et al. 2000; Takatsuka et al. 2001; Takatsuka et al. 2002).

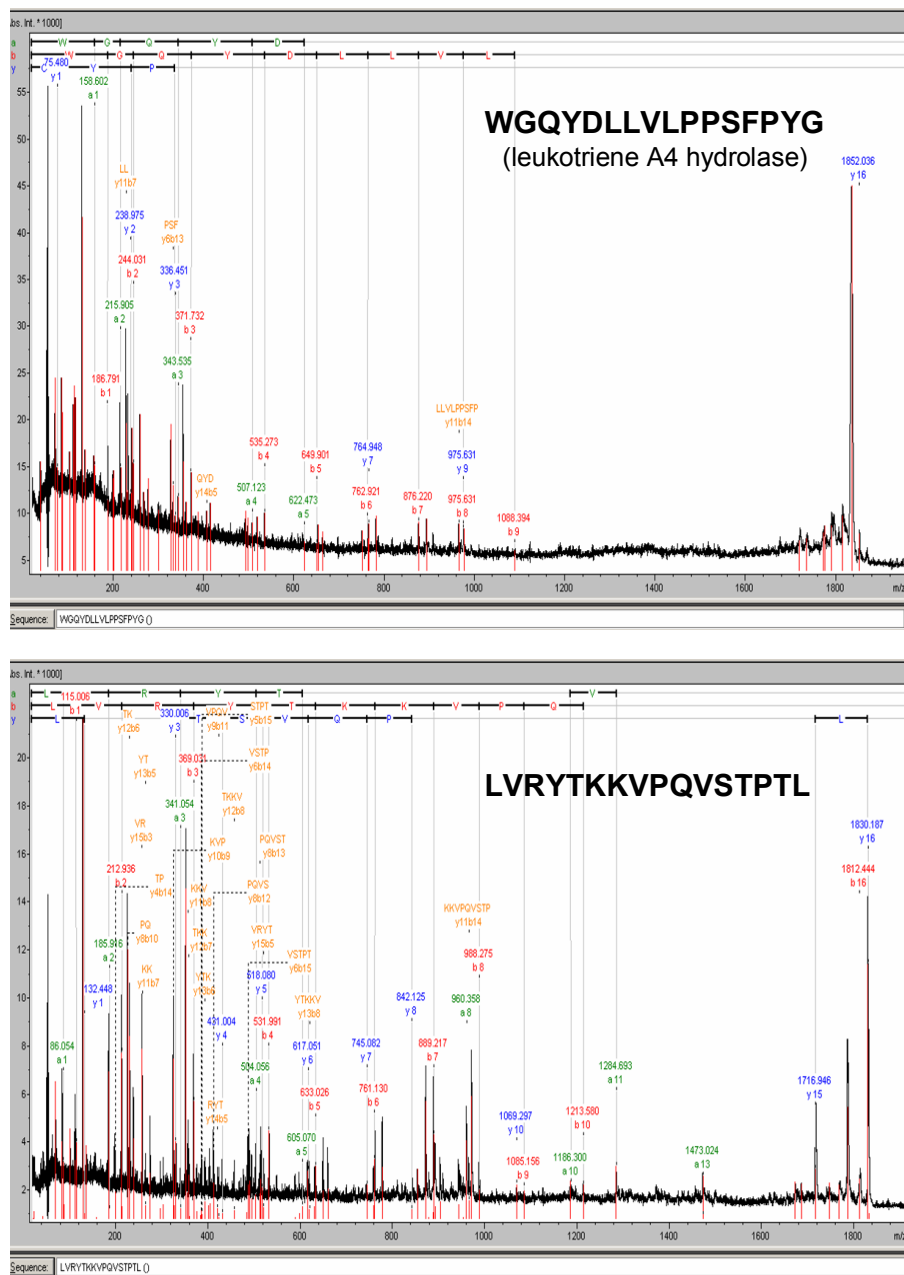


Abbildung 3.47: Sequenzierung zweier Markerpeptide mittels MALDI-MS/MS. Oben Leukotrien-A4-Hydrolase, unten ein Peptid aus Serumalbumin.

4. Diskussion und Ausblick

4.1 Proteomics zur klinischen Diagnostik

Mit der parallelen Veröffentlichung zweier Arbeiten in *Nature* (Lander et al. 2001) und *Science* (Venter et al. 2001) hat die wissenschaftliche Forschung eines ihrer bislang größten Projekte, die Entschlüsselung des humanen Genoms, nahezu abgeschlossen. Die Forschung hat sich seit dem einen logischen Schritt weiter bewegt. Mit Hilfe neuer Techniken und dem aus der Genomforschung gewonnenen Wissen, wird nun das Proteom des Menschen untersucht, um einen Einblick in dessen Metabolismus zu bekommen und den Ist-Zustand des Körpers zu erfassen. Allerdings werden mit den Begriffen Genomics und Proteomics zwei Dinge miteinander verglichen, die kaum unterschiedlicher sein könnten. Während es sich bei den etwa 35.000 Genen des Menschen um die „Baupläne“ aller seiner Möglichkeiten handelt, erwartet man etwa zehn Mal so viele Proteine vorfinden zu können. Während das Genom, definitionsgemäß die Gesamtheit aller Gene eines Organismus ist, die in jeder seiner Zellen immer nahezu identisch ist, beschreibt der Begriff des Proteoms die Gesamtheit aller Proteine eines Organismus, eines Organs oder einer Zelle, zu einem bestimmten Zeitpunkt und in einer bestimmten Situation. Proteine unterlaufen bereits während der Translation ersten Modifikationsschritten, werden im Zuge der Prozessierung glykosiliert, phosphoryliert, acetyliert, gefaltet, geschnitten und zu funktionellen Einheiten zusammengesetzt. Sie werden kontrolliert abgebaut, aber auch durch externe Einflüsse ungewollt degeneriert. Ist das Genom noch ein statischer Satz an Informationen, so ist das Proteom ein hochdynamisches System, welches einen bestimmten Zustand zu einem bestimmten Zeitpunkt widerspiegelt.

Aus dieser Erkenntnis heraus liegt es nahe, die Proteomforschung als ideales klinisches Diagnosetool der Zukunft anzusehen (Wittke et al. 2004).

Um dieses Ziel zu erreichen werden Technologien und Verfahren benötigt, die schnell und zuverlässig in der Lage sind, die Informationen eines Proteoms zu lesen und zu deuten. Einen Beitrag dazu will diese Arbeit leisten, indem anhand einiger Beispiele die Möglichkeiten der CE-MS-Technik für die klinische Diagnostik aufgezeigt werden.

4.2 Etablierung der CE – MS – Messtechnik

Die in dieser Arbeit eingesetzte Technologie kombiniert eine der besten bekannten Trenntechnologien für Proteine, die Kapillarelektrophorese, mit dem heute weithin akzeptierten Detektionsverfahren Massenspektrometrie. Die Kapillarelektrophorese ist eine sehr alte Technologie, die aber extrem flexibel einsetzbar, hoch effizient und vor allem hoch automatisierbar ist (Watzig et al. 1998). Die dagegen noch junge Massenspektrometrie geht über ein einfaches Detektionsverfahren hinaus, indem in Form von Molekularmassen und Ladungszuständen Informationen über die Analyten bereitgestellt werden oder diese sogar direkt identifiziert werden können (Pusch et al. 2003).

Zwar ist keine der verwendeten Techniken und auch nicht deren Kombination neu, doch wurden bislang wenige Anstrengungen unternommen, diese auch für eine umfassende Proteomforschung zu etablieren. Ein Grund dafür mag in der Diskrepanz zwischen den vorhandenen Informationen und den Möglichkeiten ihrer Bearbeitung liegen. So wurde die Trennung und Detektion zwar häufig auf den Nachweis einzelner Analyten oder Substanzklassen hin optimiert, einen Einsatz mit dem Ziel der Erfassung aller Proteininformationen gibt es aber bislang nicht, bzw. nur in Form verwandter Technologien, wie HPLC-MS (Issaq 2001; Issaq et al. 2002a; Spahr et al. 2001; Wu et al. 2003).

Im Vordergrund dieser Arbeit stand zunächst die Etablierung der Technik, insbesondere einer stabilen und robusten Kopplung zwischen Kapillarelektrophorese und Massenspektrometrie. Ausgehend von der Idee einer CE-ESI-TOF-MS-Verbindung, wurde zunächst mit dem Ziel begonnen, ein System mit möglichst hoher Sensitivität zu erarbeiten. Doch schon nach kurzer Zeit wurde klar, dass der Informationsgehalt der betrachteten Körperflüssigkeiten dermaßen hoch ist, dass die Herausforderung darin besteht, eine stabile und robuste Technik zu schaffen und mit den daraus gewonnenen Informationen umzugehen.

Es ist unbestritten, dass die verwendeten Verfahren, jeweils für sich betrachtet, kein Optimum darstellen. Die Trennung einzelner Substanzen in der Kapillarelektrophorese könnte durch darauf optimierte Programme und Puffer verbessert werden; die Signalintensität könnte durch den Einsatz von Kapillaren mit geringerem Innendurchmesser erhöht werden; die Auflösung und die Sensitivität der Massen-

spektrometrie könnte durch ein auf bestimmte Masse/Ladungs-Zahlen ausgerichtetes Tuning spezifiziert werden. Doch alle diese Möglichkeiten kommen nur dann in Betracht, wenn definierte Analyten aus einer definierten Matrix bestimmt werden sollen. Im vorliegenden Fall ist hingegen ein Messsystem entwickelt worden, dessen wichtigste Eigenschaft eine hohe Robustheit und ein weiter, reproduzierbarer Messbereich ist. In Fragen der Trennleistung, der Sensitivität und der Auflösung sind hingegen unvermeidbare Kompromisse eingegangen worden.

Doch wie die Abbildung 3.6 bis 3.8 verdeutlichen, ist dabei ein System gewonnen worden, mit dessen Hilfe Körperflüssigkeiten unterschiedlichsten Ursprungs und mit einem großen Variationsbereich an Proteinkonzentrationen zuverlässig und reproduzierbar analysiert werden können. Dazu wurden robuste Trennparameter (z.B. Methanol/Ameisensäure-Puffer, stabile Tuningeinstellungen, Druckaufgabe zum Ende des Trennlaufs) mit sensitivitätssteigernden Verfahren kombiniert (pH-Stacking, minimale sheath-Flussrate, zunächst druckfreie Trennung). Das Ergebnis ist eine Trenntechnik, die vollautomatisiert über einen langen Zeitraum arbeiten kann, wobei die Erfassung des Proteoms einer Probe in etwa einer Stunde abgeschlossen ist. Erst diese Technik, zusammen mit der Entwicklung zugehöriger Software-Tools hat es ermöglicht, hunderte von Proben zu analysieren und so klinische Studien durchzuführen.

Eingesetzt wurde diese Technologie hier, um die Proteome verschiedener Körperflüssigkeiten zu untersuchen. Im Gegensatz zu den Proteomen von Zellen und Organen, sind diese meist einfach zugänglich und werden heute in der klinischen Praxis routinemäßig gewonnen. Gleichzeitig stellen sie aber auch einen ungeheuren Informationspool dar, da diese Körperflüssigkeiten, insbesondere das Blut, dem Organismus als Transport- und Informationsaustauschmedien dienen. Die Verwendung der CE-MS-Technologie zur Erfassung des Proteoms von Körperflüssigkeiten ist daher für eine schnelle, robuste und hoch-sensible Diagnostik prädestiniert (Bergquist et al. 2002; Wulfkuhle et al. 2003).

In vier einzelnen Projekten wurden die Proteome des humanen Plasmas, von Urin, sowie von Dialysaten untersucht. Diese drei Körperflüssigkeiten stehen in logischer Verbindung zueinander, wenn davon ausgegangen wird, dass sich nahezu alle pathologischen Situationen durch ein verändertes Proteinmuster im Blut abbilden. Ist dessen Nachweis auch auf andere Körperflüssigkeiten übertragbar, so sollte dieses insbesondere im Urin, wie auch in seiner künstlichen Ersatzflüssigkeit, dem Dialysat möglich sein. Beide Körperflüssigkeiten bilden auch gleichzeitig die einfachsten zu gewinnenden Probenquellen.

4.3 Proteomuntersuchung im Urin: Nierenerkrankungen

Grundsätzlich müssen bei der Untersuchung von Urinproben mit Methoden der Proteomforschung zwei Überlegungen berücksichtigt werden. Einerseits kann davon ausgegangen werden, dass der menschliche Urin ein ähnliches Informationspotential besitzt, wie das Blut, dem es entstammt. Qualitativ sollten selbst beginnende bakterielle Degradationsprozesse, die bei der Probenahme, der Lagerung und dem Transport fast unvermeidbar sind, keine Rolle spielen, da auch Proteinbruchstücke mit Hilfe der Massenspektrometrie noch identifizierbar sind. Auch lässt sich die als Folge der Nierenfunktion variierende Proteinkonzentration durch Normierungstechniken ausgleichen. Auf der anderen Seite überlagern aber beginnende oder manifestierte Nierenschäden das in der Urinprobe zu beobachtende Proteinabbild, indem sowohl Änderungen der molekularen Ausschlussgröße, wie auch der Konzentrationen individueller kleiner Polypeptide auftreten. Bevor daher Urin als einfach zugänglicher Übermittler der Informationen, die im Blut vorhanden sind, angesehen werden kann, muss zunächst ein Wissen über den Einfluss von Nierenschädigungen auf das Proteinmuster gewonnen werden.

Das mit Abstand umfangreichste der hier beschriebenen Projekte hat sich mit der Diagnose und Früherkennung von Nierenschäden am Beispiel der diabetischen Nephropathie beschäftigt. Dabei handelt es sich bereits heute um die häufigste Einzelursache einer terminalen Niereninsuffizienz. Aufgrund der stetig ansteigenden Anzahl an Diabetikern kann erwartet werden, dass in naher Zukunft auch das Problem der diabetischen Nephropathie eine immer größere Rolle spielt (American Diabetes Association 2002; Mischak et al. 2004).

Neben dem Ziel, eine möglichst frühzeitige Diagnose der diabetischen Nephropathie zu ermöglichen, wurden – einerseits zur Differenzialdiagnose, andererseits zur Vervollständigung des Untersuchungsbildes – auch die fokalsegmentale Glomerulosklerose (FSGS) oder IgM-Nephropathie, die membranöse Glomerulopathie (MNGN) und die Minimal-changes-Glomerulopathie (MCD) behandelt.

Wie in Abbildung 3.9 dargestellt, zeigte sich dabei bei vielen Proben auch in der CE-MS-Messung das aus der Elektrophorese bekannte und in der klinischen Diagnostik verwendete Bild einer Korrelation zwischen der Nierenschädigung und der Konzentration größerer Proteine (Hong et al. 1998; Viberti et al. 1982). Weiterhin

stellte sich heraus, dass ein Nierenschädigungsmuster sich zunächst einmal unabhängig von der Art der Schädigung zeigt. Überraschender ist hingegen die Tatsache, dass die Polypeptide, die nach Berücksichtigung einer Vielzahl von Proben (174) als Marker einer Nephropathie deklariert werden konnten (Tabelle 3.20 und Abbildung 3.21) zu einem überwiegenden Teil relativ kleine Polypeptide bis zu 5.000 Dalton sind. Würde die hier verwendete Messtechnik nach den selben Prinzipien arbeiten, wie die etablierte Protein-Messung, so müsste eine Vielzahl von höhermolekularen Proteinmarkern gefunden werden, die in den Proben der Kontrollpatienten nicht oder mit wesentlich geringerer Intensität vorkommen. Doch weder wird – mit Ausnahme einiger prominenter Proteine – die Verschiebung zu höheren Molekularmassen beobachtet, noch ist eine steigende absolute Anzahl an Polypeptiden zu erkennen. Die aufgrund von Frequenz- und Amplitudenvergleichen ausgewählten und verwendeten Marker-Peptide sind hingegen gleichermaßen „Krankheits“-spezifisch, wie auch „Gesund“-spezifisch. Während diese Tatsache zum Teil sicherlich auch auf die begrenzte Auflösung der Messtechnik bei höheren Proteinmassen zurückzuführen ist, zeigt sie doch auch, dass in der CE-MS-Messung von Urinproben andere Parameter untersucht werden, als durch den einfachen Gesamtproteinnachweis. Die deklarierten Marker sind vielmehr auch als solche zu deuten und es kann erwartet werden, dass viele von diesen nach einer Identifizierung unmittelbar oder mittelbar mit der Krankheit in Verbindung gebracht werden können.

Auch die insbesondere in Abbildung 3.19 am Beispiel der diabetischen Nephropathie zu erkennende Diskrepanz im Migrationsverhalten der „positiven“ und der „negativen“ Marker zeigt, dass die gefundenen Ergebnisse keinesfalls Zufallsprodukte oder statistische Artefakte darstellen. Die Tatsache, dass die Polypeptide, die im Krankheitsfall verstärkt auftreten, kurze Migrationszeiten aufweisen, diejenigen, die im Krankheitsfall fehlen, aber bei späten Migrationszeiten zu finden sind, ist ein Indiz für ein vollständig verändertes Selektionsverhalten der Niere oder für modifizierte Proteine im gesamten Organismus.

In den dargestellten Tabellen sind Polypeptide aufgelistet, welche die Diagnose einer bestimmten Nierenschädigung zulassen. Die angegebenen Frequenzmuster zeigen, dass es sich dabei nicht um ideale Marker handelt, die jeweils für sich den Zustand „gesund“ von „krank“ trennen können. In ihrer Kombination ergänzen sie sich aber zu einem Polypeptidmuster, das zu einer zuverlässigen Beurteilung der Proben führt. Als Schwachpunkt hat sich dabei die Tatsache herausgestellt, dass es keine eindeutigen Muster für die untersuchten Erkrankungen zu geben scheint. Das

allgemeine Muster der Nierenschädigung überlagert die jeweils spezifischen Muster dermaßen, dass sich immer alle Muster annähernd gleich verhalten. Abhilfe konnte dadurch geschaffen werden, dass neben den zwischen „gesund“ und „krank“ trennenden Mustern auch noch solche erstellt wurden, die jeweils eine möglichst hohe Spezifität für einzelne Erkrankungen aufweisen. Solche Polypeptide, die absolut spezifisch für eine bestimmte Erkrankung sind, und sich damit dem „idealen Marker“ annähern, konnten in dieser Arbeit nicht gefunden werden.

Wie die Diagnosefolgerungen in den Tabellen der Anhänge I und II, sowie Abbildung 3.35 zeigen, ist diese Idealvorstellung der Diagnostik auch nicht notwendig, wenn auf ein Proteom-Pattern zurückgegriffen wird. Die Summierung der gefundenen bzw. nicht gefundenen Polypeptide führt dazu, dass in den meisten Fällen die richtige Diagnose getroffen werden kann. Da die Krankheitsmarker sich bei allen untersuchten Erkrankungen überschneiden, verhalten sich auch die Musterübereinstimmungen im Mittel sehr gleich (Abbildung 3.35 oben). Hier helfen tatsächlich die differenziellen Musterlisten, die im Zweifelsfall die exakte Diagnose ermöglichen (Abbildung 3.35 unten). Auffallend ist hier insbesondere die Übereinstimmung des Musters „MCD differenziell“ zu den Kontrollproben. Eine schärfere Trennung ist dabei aber nicht notwendig, da diese bereits durch das Nephropathie-Muster gegeben ist. Auch muss berücksichtigt werden, dass die Minimal-changes-Glomerulopathie auch klinisch die unausgeprägtesten Symptome aufweist.

Die zur Überprüfung der ermittelten Muster herangezogenen „unbekannten“ Proben beschränkten sich leider auf nicht näher untersuchte Kontrollpatienten und auf Diabetiker ohne klare Diagnose des renalen Status. Dennoch lässt deren Untersuchung einige klare Schlussfolgerungen zu. Zunächst ist es auffällig, dass das ermittelte „Diabetes“-Muster in einem extrem weiten Bereich streuen und keine aussagekräftige Diagnose zulassen. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass der Zustand „Diabetes“ im Urin nicht mit der hier verwendeten Methode dargestellt werden kann. Dies ist insofern nachvollziehbar, da es sich um eine Stoffwechselstörung handelt, die auf einer Insulinunempfindlichkeit beruht und sich in erster Linie im Blutzuckerspiegel niederschlägt. Zur Messung des Letzteren sind wiederum einfache und hoch effektive Methoden vorhanden. Hier wäre jede Art einer routinemäßigen Proteomics-Untersuchung fehlplaziert. Eine weitere Erklärung für das Versagen der Muster ist, dass die als Vergleich ausgewählten Kontrollproben nicht sorgfältig genug charakterisiert sind. Zwar ist bei deren Auswahl auf einen allgemeinen Zustand „Gesund“ geachtet worden, Diabetiker sind davon aber nicht ausdrücklich ausgenommen. Nicht zu vergessen ist auch die erhebliche Anzahl nicht

entdeckter Diabetiker in unserer Gesellschaft. Ist aber die Vergleichsgruppe „Kontrollen“ in dieser Hinsicht zu inhomogen, so können die daraus resultierenden Polypeptidmarker zwangsläufig nicht genügend zwischen den Gruppen diskriminieren.

Die Diagnose der diabetischen Nephropathie, also der daraus resultierenden renalen Schädigung, korreliert hingegen ganz ausgezeichnet mit den bekannten klinischen Parametern. Die gefundene Übereinstimmung ist in vielen Fällen nahezu perfekt linear. Darüber hinaus ist, wie Abbildung 3.36 deutlich macht, bei einigen der untersuchten Proben eine Frühdiagnose dahingehend möglich, dass das gefundene Polypeptidmuster einem höheren Albumin / Kreatinin – Quotienten entspricht als klinisch ermittelt wurde. Sind die Grundgedanken, von denen hier ausgegangen wird, richtig, so laufen diese Patienten Gefahr, an einer diabetischen Nephropathie zu erkranken. Ob diese Annahme allerdings zutrifft, kann nur durch eine prospektive Studie über einen längeren Zeitraum (5-10 Jahre) bestätigt werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit Hilfe der CE-MS-Technik und den hier vorgestellten Polypeptidmarkern eine Frühdiagnose der diabetischen Nephropathie möglich scheint. Gleiches gilt auch für andere Erkrankungen der Niere unabhängig von deren pathologischen Ursachen (Weissinger et al. 2004b) (Wittke et al. 2003).

Die in dieser Studie angewandte Vorgehensweise ist exemplarisch für den typischen Aufbau einer Proteom-Studie (Petricoin et al. 2002a). Der erfasste Informationsgehalt ist in jedem Fall so groß, dass der Vergleich von wenigen Proben – unabhängig davon, wie gut diese charakterisiert worden sind – zu völlig falschen Ergebnissen führen kann. Daher muss zunächst eine möglichst große Anzahl an Proben mit bekannter Diagnose untersucht werden, aus denen die diskriminatorischen Marker isoliert werden. Werden dabei Marker gefunden, die „ideal“ und statistisch relevant zwischen den untersuchten Gruppen zu trennen vermögen, so können diese verwendet werden. Ansonsten sind zunächst Datenreduktionsschritte notwendig, welche die Anzahl der in Frage kommenden Marker-Kandidaten deutlich reduzieren. Die Anzahl der ausgewählten Marker spielt dagegen für die Pattern-Diagnostik offenbar nur eine untergeordnete Rolle, wie aus den Listen der untersuchten Nephropathien zu erkennen ist. Vielmehr ist es wichtiger, dass die Markerlisten statistisch sinnvoll begrenzt sind, also nicht künstlich vergrößert werden. Ein Ausschluss von Markern sollte hingegen nur dann erfolgen, wenn dieser aufgrund weiterer Informa-

tionen angebracht erscheint, z.B. aufgrund logischer Verteilungsmuster, wie hier angewandt, oder nach einer Identifizierung und sorgfältiger Einschätzung.

In einem zweiten Schritt müssen dann die gefundenen Marker auf die ursprünglichen Proben angewendet werden, um eine Einschätzung ihrer Aussagekraft und die Festlegung von Grenzen zu erhalten. Abschließend erfolgt die Untersuchung der Marker auf tatsächliche Eignung anhand von für die Muster geblindeten neuen Proben.

Im Gegensatz zu den klassischen Verfahren der Proteindiagnostik bei der einzelne Proteine qualitativ und quantitativ erfasst werden, hat die hier verwendete Pattern-Diagnostik innerhalb eines Proteoms den entscheidenden Vorteil, dass die eingesetzten Marker weder zwangsläufig identifiziert sein müssen, noch muss ihre Funktionalität im Einzelnen nachgewiesen sein. Die Verwendung eines komplexen Musters an Polypeptiden geht vielmehr gar nicht davon aus, dass der „ideale“ Marker vorhanden ist, sondern betrachtet proteomweite Veränderungen und bestimmt das Maß, in welchem diese vorliegen. Da der Zusammenhang zwischen den einzelnen Markern und der untersuchten Krankheit bei der Definition der Marker gezeigt wird, kann auch davon ausgegangen werden, dass das betrachtete Gesamtbild eine Korrelation zeigt. Der Einfluss einzelner Markerpeptide auf das Diagnoseergebnis gerät dabei zugunsten einer durch die Erfassung vieler Parameter abgesicherten Betrachtungsweise in den Hintergrund (Rosenblatt et al. 2004).

Ein weiterer Vorteil der Proteomdiagnostik wird sich in der Zukunft mit der Definition immer neuer Diagnose-Muster zeigen. Da die Untersuchung einer Probe ohnehin immer die nach dem Stand der Technik jeweils bestmögliche vollständige Erfassung aller Proteine beinhaltet, können in nur einer Probe eine Vielzahl an möglichen Mustern gesucht werden. Die simultane Erfassung möglicher Krankheitsmuster ist in dieser Arbeit bereits anhand der differenzialdiagnostischen Untersuchung der einzelnen Nierenerkrankungen geschehen. In der Zukunft wird es möglich sein, eine Probe zu verwenden und darin nach einer Vielzahl unterschiedlichster Krankheitsmuster zu suchen. Die Proteomdiagnostik kann damit zu einem alles umfassenden Diagnosewerkzeug werden.

4.4 Proteomuntersuchung im Plasma

Zweifellos ist das Blut für Proteomuntersuchungen die interessanteste aller Körperflüssigkeiten. Es ist nicht nur einfach zugänglich und in der klinischen Diagnostik

allgemein akzeptiert, sondern es kann aufgrund seiner zentralen Rolle im Organismus auch von einem enormen Informationsgehalt ausgegangen werden der in den Proteinen des Blutes verschlüsselt ist. Die Untersuchung von Blut mit Hilfe von Proteomics-Techniken kann vermutlich eher Einzug in die klinische Praxis finden, als die jeder anderen Körperflüssigkeit (Anderson et al. 2004; Petricoin, III et al. 2002; Pieper et al. 2003a; Rai et al. 2002).

Im Laufe der hier beschriebenen Etablierung der CE-ESI-MS-Technik für Proteomuntersuchungen hat sich allerdings gezeigt, dass das Blut aufgrund seiner Zusammensetzung auch erhebliche Schwierigkeiten mit sich bringt. Sind die korpuskulären Bestandteile mittels Zentrifugation noch recht einfach abzutrennen, so stellt die Proteinzusammensetzung das größte Hindernis für die verwendete Technik dar. Dadurch dass wenige Proteine in einer sehr hohen Konzentration vorliegen und viele andere in um mehrere Zehnerpotenzen geringeren Mengen vorhanden sind, wird das Proteom des Blutes durch diese wenigen, in der Regel auch nicht gerade besonders interessanten Proteine dominiert. Zusätzlich erschwert wird das Verfahren auch noch dadurch, dass es gerade diese wenigen, alles dominierenden Proteine sind, die in der gewählten Technologie einerseits praktisch nicht darstellbar sind, andererseits diese auch noch, beispielsweise durch Maskierung anderer Proteine, erheblich stören.

Das gewählte Verfahren musste daher einen Schritt beinhalten, um diese prominenten Proteine zu entfernen. Da eine spezifische Abreicherung beispielsweise durch Affinitätschromatographie oder Farb-Liganden-Chromatographie nicht zum gewünschten Erfolg geführt hat, wurde ein Größenausschlusschritt eingeführt. Der Bereich der nachweisbaren Polypeptide ist damit zwar erheblich eingeschränkt worden, durch eine geeignete Wahl der Parameter bei der durchgeführten Ultrafiltration konnte aber dennoch ein umfangreiches und informationsreiches Protein-Abbild gewonnen werden.

Wie die durchgeführte Studie zeigt, ist aus diesem künstlich begrenzten Proteom immer noch ein erheblicher Informationsgehalt zu beziehen, der klinisch relevante Fragestellungen beantworten kann. Es ist sogar zu vermuten, dass der gewählte Untersuchungsbereich bis 15.000 kDa nicht nur die wichtigeren Polypeptide, wie Signal- und Botenstoffe beinhaltet, sondern auch die in den größeren Proteinen vorhanden Informationen durch deren Abbauprodukte und Bruchstücke darstellen kann (Tirumalai et al. 2003).

Gleichzeitig hat die beschriebene Untersuchung auch gezeigt, wie sorgfältig die verwendete Probenquelle ausgewählt werden muss. Serum, obwohl ein in der Proteomforschung häufig verwendetes Material, ist für exakte und reproduzierbare

Proteomics-Untersuchungen nur bedingt geeignet, da der zum Serum führende Prozess der autolytischen Proteindegradation ein schwer zu kontrollierendes Verfahren ist, das das Untersuchungsergebnis entscheidend beeinflusst. Für die Routineuntersuchung, die an vielen Orten durch viele verschiedene Personen durchgeführt wird, ist Plasma daher eindeutig besser geeignet, da das Verfahren besser normiert werden kann und wie gezeigt, zu reproduzierbaren Ergebnissen führt.

In der Zukunft wird durch Identifizierung der detektierten Polypeptide das Wissen über das menschliche Plasma vermehrt werden können, da sich die bislang durchgeführten Proteomuntersuchungen, bedingt durch den Einsatz der zweidimensionalen Gelelektrophorese, im wesentlichen auf höher molekulare Proteine stützen. Gleichzeitig können aber durch die Untersuchung des Plasmas von Patienten in Krankheitssituationen eine Reihe von Proteinmustern identifiziert werden, die eine Beurteilung des aktuellen Gesundheitsstatus des Patienten zulassen. Neben Urin ist Plasma daher zukünftig die zweite wichtige Probenquelle für die Routineuntersuchung mittels CE-MS.

4.5 Proteomuntersuchung im Dialysat

Dialysate können sicherlich nicht als eine Körperflüssigkeit im eigentlichen Sinne bezeichnet werden. Im Zuge der Nierenersatztherapie kommt diesen aber eine Funktion zu, die der des Urins gesunder Menschen ähnelt. Daher werden ständig Anstrengungen unternommen, um die Funktionalität der verwendeten Dialysevorrichtungen und Membranen derjenigen der menschlichen Niere anzugleichen und damit die Zusammensetzung des Dialysates der des Urins näher zu bringen.

Die vorliegende Arbeit hat mittels CE-MS-Technologie Hämodialysate miteinander verglichen, die an unterschiedlichen Membranen gewonnen wurden. Da ein Vergleich dieser beider Methoden aufgrund unterschiedlicher Dialyseparameter schwierig ist, wurden die detektierten Polypeptide nur qualitativ miteinander verglichen und in erster Linie deren Anzahl und der Molekularmassenbereich der Filtrate betrachtet. Wie erwartet zeigen die an „high-flux“-Membranen gewonnenen Proben deutlich mehr Polypeptide als die durch eine Filtration an „low-flux“-Membranen erzeugten. Auch der Molekularmassenbereich unterscheidet sich geringfügig.

Dieser Vergleich zeigt primär die Eignung des verwendeten Verfahrens auch für Dialysate. Insbesondere ist hervorzuheben, dass trotz der sehr unterschiedlichen und teilweise unbekanntem klinischen Parameter, miteinander vergleichbare Resultate erzielt wurden. Die in Tabelle 3.41 aufgelisteten Polypeptide zeigen jeweils eindeutige Tendenzen nur in den Filtraten der einen oder der anderen Methode aufzutreten. Diese Beobachtung ist mit hoher Wahrscheinlichkeit trotz der sicherlich zu geringen Anzahl untersuchter Proben nicht auf statistische Zufälle, sondern auf die Filtrationseigenschaften der verwendeten Membranen zurückzuführen. Sollte es in Zukunft gelingen, Dialysate qualitativ wie auch quantitativ einerseits untereinander, andererseits aber auch mit dem jeweils zugrunde liegenden Plasma und mit Urinen zu vergleichen, so ist zu erwarten, dass wesentliche Schritte zur Erkennung urämischer Toxine gemacht werden können. In weiterer Zukunft kann dadurch eine Verbesserung der Dialysemethoden und somit eine Verringerung der bei dieser lebensnotwendigen Therapie zu befürchtenden Nebenwirkungen erzielt werden.

Auch die Tatsache, dass in einigen der untersuchten Proben künstliche Substanzen gefunden wurden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit aus den Kunststoffen der Dialysatoren stammen, unterstreicht die Sensitivität der Technologie. Nur durch die online und kontinuierlich als Detektionssystem betriebene Massenspektrometrie sind derartige Substanzen in geringen Konzentrationen erkennbar, obwohl gar nicht nach diesen gesucht worden ist.

4.6 Proteomuntersuchung im Urin als Verlaufskontrolle nach einer Stammzelltransplantation

Das vierte hier beschriebene Projekt beschäftigt sich erneut mit der Protein-Muster-Erkennung im Urin. Doch gegenüber der oben dargestellten Früherkennung von Nierenschäden handelt es sich bei der Früherkennung von Abstoßungsreaktionen nach einer Stammzelltransplantation um einen lebensbedrohenden Prozess, der sich sehr schnell innerhalb von wenigen Tagen entwickelt und entsprechend schnell erkannt werden muss. Die durchgeführten Untersuchungen haben auch hier ein Muster von auftretenden und verschwindenden Polypeptiden ergeben, mit deren Hilfe eine Erkennung der Bedrohung früher möglich erscheint als in der heute gängigen Praxis. Wie anhand der genauer betrachteten Einzelpeptide gezeigt, ist häufig nicht nur eine Beziehung zwischen dem Auftreten des Peptides im zeitlichen Verlauf und der Ausbildung der Erkrankung zu erkennen, sondern es können sogar –

wie beispielsweise durch die Leukotrien-A4-Hydrolase – nach dem Stand des Wissens nachvollziehbare Ursachen gefunden werden (Kaiser et al. 2004a).

Die wesentliche Erkenntnis aus dieser Studie liegt aber darin, dass die eingesetzte Technik auch zu einer schnellen Überprüfung des Gesundheitszustandes und zu einer fortlaufenden Überwachung eines Krankheitsprozesses eingesetzt werden kann.

Auf der einen Seite zeigen die sich bei vielen Patienten wiederholenden Proteinmuster, dass sich schnell entwickelnde Entzündungsprozesse auch zeitnah und reproduzierbar im Urin-Proteom abbilden. Dieses unterstreicht die Eignung des Urins als eine einfach zu beziehende und einfach zu handhabende Informationsquelle. Auf der anderen Seite stellt die CE-MS-Technik eine Proteomics-Technologie mit einem sehr hohen Informationsgehalt bei gleichzeitig ausgezeichneter Automatisierbarkeit und unübertroffener Geschwindigkeit dar. Die hier verwendete Probenpräparation nimmt etwa 3 bis 4 Stunden in Anspruch, wobei der überwiegende Anteil durch die Lyophilisation der Proben benötigt wird. Die Messung selber ist nach etwa 90 Minuten abgeschlossen. Stehen die verwendeten Markerpeptide einmal zur Verfügung, so werden für die Auswertung und Analyse nur wenige Minuten benötigt, so dass von der Probennahme bis zur Diagnosestellung weniger als sechs Stunden notwendig sind. Berücksichtigt man noch logistisch und technisch bedingte Verzögerungen, so ist dennoch eine nahezu vollautomatisierte Probenabarbeitung bis hin zur Diagnose innerhalb von 12 bis 24 Stunden zu erreichen. Diese Eigenschaft verleiht der CE-MS-Technik die Fähigkeit routinemäßig bei klinischen Untersuchungen eingesetzt zu werden.

4.7 Ausblick

Die vorliegende Arbeit hat die Entwicklung und Etablierung einer Proteomics-Technologie zum Inhalt. Dabei wurde gleichermaßen auf die Entwicklung der technischen Parameter wie auch auf den Nachweis der klinischen Eignung Rücksicht genommen. Beide Schritte konnten nur nebeneinander geschehen, da sie eng miteinander verknüpft sind und die Anwendung des einen jeweils wichtige Hinweise für den anderen Teil der Arbeit brachte. Parallel zu dieser Arbeit entstand noch ein leistungsstarkes Softwarepaket, ohne das weder die Auswertung einzelner Messungen, noch der Vergleich ganzer Messreihen möglich gewesen wäre. Auch diese Entwicklungen gingen Hand in Hand mit der Etablierung der Proteomics-Technologie und den klinischen Untersuchungen. Diese interdisziplinäre Zusammenarbeit hat schließlich die neue Technologie erschaffen.

Dabei beinhaltet die entwickelte Technologie alle Voraussetzungen, die nach dem derzeitigen Stand des Wissens benötigt werden. Eine hohe und teilweise schon umgesetzte Automatisierbarkeit in Kombination mit einem prinzipiell schnellen Verfahren kann die routinemäßige Untersuchung beliebig vieler Proben gewährleisten. Der Einsatz einfach und wenig invasiv zu gewinnender Probenmaterialien kann nahezu sofort in der klinischen Praxis eingegliedert werden. Die Betrachtung der Proteine als Informationsquelle schließlich stellt die nach dem heutigen Stand des Wissens modernste Untersuchungsmethode dar.

Der größte Vorteil der beschriebenen Technik liegt aber darin, dass es sich tatsächlich um eine Proteomics-Technik handelt, die versucht, das gesamte vorhandene Proteom einer Probe ohne vorgegebene Präferenzen zu erfassen. Wie anhand der durchgeführten Studien gezeigt, hat jede der verwendeten Körperflüssigkeiten einen nahezu unerschöpflichen Informationsgehalt. Es ist zu erwarten, dass beinahe jeder erdenkliche Gesundheitszustand, bei geeigneter Wahl des Untersuchungsmaterials, im jeweiligen Proteom gefunden werden kann. Auch hat sich die Technik als offen gegenüber unterschiedlichsten Probenquellen gezeigt. In der Zukunft wird es daher möglich sein, neue Diagnosemuster für immer mehr unterschiedliche Erkrankungen zu definieren. Das Anwendungsspektrum wird dadurch immer größer, wobei diese weiter anwachsende Zahl an Informationen im

Idealfall aus nur einer Probe, wie Urin oder Plasma, gewonnen werden kann. Damit kann sich die CE-MS-Technologie zu einem allumfassenden Diagnosetool entwickeln, welches alle Informationen, die im Proteom verschlüsselt sind, gleichzeitig liest und beurteilt.

Eine wichtige Grundlage der Technik ist es dabei, das Auftauchen, Verschwinden und die Zu- oder Abnahme ganzer Gruppen von Polypeptiden gleichzeitig zu betrachten. Es ist nicht das Ziel, den einen idealen Marker zu finden, sondern durch die Beobachtung komplexer Muster eine Aussage zu treffen. Diese Grundüberlegung ermöglicht es erst, die gefundenen Markerproteine zu verwenden, ohne dass ein exaktes Wissen über dessen Natur und Einbindung in den Metabolismus vorhanden sein muss. Gleichwohl ist eine Identifizierung der definierten Marker, wie gezeigt, möglich und sinnvoll. Die daraus gewonnenen Informationen sind aber nur für die Erforschung der einer Krankheit zugrunde liegenden Zusammenhänge nützlich und können die Eignung der CE-MS-Proteomics-Technologie bestenfalls untermauern. Für den Einsatz des Markerproteins innerhalb eines komplexen Musters sind diese Untersuchungen hingegen belanglos. Ebenso wenig ist es entscheidend, welches Verfahren zur Musterdefinition und Mustererkennung verwendet wird, solange es nur in der Lage ist, unvoreingenommen mit komplexen Mustern umzugehen. Die hier verwendete einfache Pattern-Vergleichs-Diagnostik dürfte damit ähnlich gut verwendbar sein, wie komplexe mathematische Verfahren, wie beispielsweise die Cluster-Analyse. Die vielfach verwendeten Entscheidungsbäume bilden hingegen kein geeignetes Verfahren, da Entscheidungswege fest vorgegeben sind.

Mit der Etablierung der CE-MS-Proteomics-Technologie steht damit eine weitere Technik im Forschungsbereich Proteomics zur Verfügung. Es ist zu erwarten, dass diese, wie auch andere bereits vorhandene oder noch zu entwickelnde Verfahren, das Wissen über Proteine und ihre Funktionen in den nächsten Jahren erheblich vermehren. Jede Technik hat ihr Stärken und Schwächen oder deckt einen bestimmten Zielbereich ab. Die hier vorgestellte CE-MS-Technik dürfte gute Aussichten haben, schnell aus der wissenschaftlichen Grundlagenforschung in den Bereich der klinischen Praxis überzutreten. Doch es wird noch einiges an Überzeugungsarbeit notwendig sein, um etablierte Diagnoseverfahren zu ersetzen. Diese kann nur dadurch geleistet werden, dass die CE-MS-Proteomics-Technologie ihr Können in der Zukunft zeigt, indem immer mehr Krankheiten erfolgreich erfasst und die daraus resultierenden Protein-Muster angewendet werden. Das Potenzial dazu ist auf jeden Fall vorhanden.

5. Verzeichnis der Abkürzungen

2DE	Zweidimensionale (Gel-) Elektrophorese	MM	Multiples Myelom, Plasmozytom
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym	MNGN	Membranöse Glomerulonephritis
A/K	Albumin zu Kreatinin Quotient	MS	Massenspektrometrie / Massenspektrometer
ALL	Akute lymphatische Leukämie	MW	Molekulargewicht, <i>molecular weight</i>
AML	Akute myeloische Leukämie	NHL	Non-Hodgkin-Lymphome
ARB	Angiotensin-Rezeptor-Blockern	NIDDM	Nicht Insulinabhängiger Diabetes, <i>non insulin dependent diabetes mellitus</i>
BCA	Bichinonsäure, <i>bichinonic acid</i>	NMR	Kernresonanzspektrometrie
CE	Kapillarelektrophorese, <i>capillary electrophoresis</i>	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
CGE	Kapillargelelektrophorese	PSD	<i>post source decay</i>
CID	<i>collision induced decay</i>	Q-TOF	Quadrupol – Time-Of-Flight Massenspektrometer
CIEF	Kapillar-Isoelektrofokussierung	RAM	<i>restricted access material</i>
CITP	Kapillar-Isotachophorese	SAA	Schwere aplastische Anämie
CML	Chronische myeloische Leukämie	SDS	Natriumdodecylsulfat
CZE	Kapillarzonenelektrophorese, <i>capillary zone electrophoresis</i>	SELDI	<i>surface enhanced laser desorption ionisation</i>
DC	Dünnschicht-Chromatographie	SGE	Gelelektrophorese, <i>slab gel electrophoresis</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	SVM	<i>support vector machines</i>
DSO	Deutschen Stiftung Organtransplantation	TIC	Gesamtionensignal, <i>total ion count</i>
EOF	Elektroosmotischer Fluss	TOF	Flugzeit, <i>time of flight</i>
ESI	Elektrospray Ionisierung, <i>elektrospray ionisation</i>	UV	Ultraviolette Strahlung
ESRF	terminale Niereninsuffizienz, <i>end stage renal failure</i>		
EST	<i>expressed sequence tags</i>		
FSGS	Fokal segmentale Glomerulosklerose		
FT-ICR	Fourier-Transform-Cyclotron-Resonance-Massenspektrometer		
GC	Gaschromatographie		
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate		
GN	Glomerulonephritis		
GP	Glomerulopathie		
GvH	<i>graft versus host</i>		
GvHD	<i>graft versus host disease</i>		
HCG	humanes Choriongonadotropin		
HD	Hodgkin'sche Erkrankung		
HF	high-flux (Dialysemembran)		
HLA	Humane Leukozyten-Antigene		
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie, <i>high pressure liquid chromatography</i>		
HSA	humanes Serumalbumin		
HSC	Hämatopoetische Stammzellen, <i>hematopoietic stem cells</i>		
HSCT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation, <i>hematopoietic stem cell transplanatation</i>		
HvG	<i>host versus graft</i>		
IDDM	Insulinabhängiger Diabetes, <i>insulin dependent diabetes mellitus</i>		
IEF	Isoelektrische Fokussierung		
LC	Flüssigchromatographie, <i>liquid chromatography</i>		
LF	low-flux (Dialysemembran)		
LTA ₄ H	Leukotrien A-4 Hydrolase		
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption ionisation</i>		
MCD	<i>minimal change disease</i>		
MCN	glomeruläre Minimalläsion		
MEKC	mizellare elektrokinetische Chromatographie		

6. Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

1.1	Tab. der in NCBI gelisteten Veröffentlichungen über „Proteomics“	11
1.2	Abb. Aufbau eines Kapillarelektrophoresesystems	16
1.3	Abb. Einfluss verschiedener Parameter auf die CE-Trennung	21
1.4	Abb. Stacking einer Probe basierend auf unterschiedlichen Leitfähigkeiten	22
1.5	Abb. pH-unterstütztes Stacking	23
1.6	Tab. online-Detektionssysteme in der Kapillarelektrophorese	23
1.7	Abb. MALDI – Ionisierungstechnik	25
1.8	Abb. ESI als Sonderfall einer Elektrolysezelle	25
1.9	Abb. Tropfendisintegration und Analytioneinbildung	26
1.10	Abb. ESI-TOF am Beispiel des ABI Mariner	28
1.11	Abb. Q-TOF Quadrupol / Time-Of-Flight-Hybrid	29
1.12	Abb. CE/ESI-Stromkreis	30
1.13	Abb. CE-ESI Interfaces	32
1.14	Abb. Schematischer und funktioneller Aufbau der humanen Niere	34
1.15	Tab. Zusammensetzung des 24h Urins eines gesunden Erwachsenen	35
1.16	Tab. Nierendagnostikverfahren	36
1.17	Abb. Elektrophoretische Darstellungen von humanem Urin	38
1.18	Abb. Vergleich zweier Urinproben mittels SELDI	39
1.19	Tab. Risikoerhöhung für Folgekrankheiten des Diabetes	41
1.20	Tab. Definitionen der Albuminurie	42
1.21	Tab. Protein-Marker der diabetischen Nephropathie	44
1.22	Tab. Einteilung der Glomerulopathien	45
1.23	Abb. Der hämatopoetische Stammbaum	49
1.24	Abb. Zusammensetzung des Blutes	50
1.25	Abb. Referenzkonzentrationen einiger Proteine im humanen Plasma	51
1.26	Abb. Trennung und Visualisierung einer humanen Plasmaprobe	53
1.27	Abb. Zusammensetzung der humanen Plasmaproteine	54
1.28	Tab. Niereninsuffizienz	55
1.29	Abb. Chronische Nierenersatztherapie in Deutschland (Übersicht)	56
1.30	Tab. Chronische Nierenersatztherapie in Deutschland (Statistik)	58
2.1	Tab. Aufbau des verwendeten CE-Trennprogramms	61
2.2	Tab. Zusammenstellung optimierter MS-Parameter	62
2.3	Tab. Zusammensetzung der Standardlösung	64
2.4	Tab. Zusammenstellung der Datenbank zur Proteomanalytik von Nierenerkrankungen	70
2.5	Tab. Einteilung der Kategorien zur Proteomanalyse von Nephropathien	71
3.1	Abb. Aufbau des verwendeten CE – ESI – MS – Systems	76
3.2	Abb. Optimierung der Spannungs- und Temperaturparameter	78
3.3	Abb. Nachweisgrenze einzelner Polypeptide	79
3.4	Abb. Prozessierung einer Probe am Beispiel eines Standardgemisches	81
3.5	Abb. Prozessierung einer Urin-„Real“-Probe	83
3.6	Abb. CE-MS Ergebnisse verschiedener Präparationsmethoden für Plasma und Serum	85
3.7	Abb. CE-MS Ergebnisse verschiedener Präparationsmethoden für Urin	87
3.8	Abb. CE-MS Ergebnisse verschiedener Präparationsmethoden für Dialysat	88
3.9	Abb. Typische Rohdatenplots verschiedener Proben	90
3.10	Abb. Zusammenhang zwischen Albumin und A/K-Quotienten	91
3.11	Abb. Anzahl gefundener Polypeptide in den 439 untersuchten Urinproben	92
3.12	Tab. „Common Polypeptides“ im Urin	93

3.13	Tab. Markerpeptide für Diabetes Typ II im Urin	94
3.14	Abb. Markerpeptide für Diabetes Typ II im Urin	95
3.15	Abb. Verteilungsmuster eines Polypeptides	95
3.16	Tab. Markerpeptide für Diabetes Typ I im Urin	96
3.17	Abb. Muster der Marker-Polypeptide für Diabetes Typ I	96
3.18	Tab. Marker „Diabetische Nephropathie“ im Urin	98
3.19	Abb. Muster der Marker-Polypeptide für die diabetische Nephropathie (Typ II)	100
3.20	Tab. Marker „Nephropathie“ im Urin	102
3.21	Abb. Muster der Marker-Polypeptide einer allgemeinen (undifferenzierten) Nephritis	103
3.22	Tab. „differentielle Marker der diabetischen Nephropathie“ im Urin	103
3.23	Tab. Marker „FSGS“ im Urin	104
3.24	Abb. Muster der Marker-Polypeptide einer FSGS	105
3.25	Tab. „differentielle Marker FSGS“ im Urin	106
3.26	Tab. Marker „MNGN“ im Urin	107
3.27	Abb. Muster der Marker-Polypeptide einer MNGN	107
3.28	Tab. „differentielle Marker MNGN“ im Urin	108
3.29	Tab. Marker „MCD“ im Urin	109
3.30	Abb. Muster der Marker-Polypeptide einer MCD	109
3.31	Tab. „differentielle Marker MCD“ im Urin	110
3.32	Abb. Vorgehensweise bei der Bestimmung des Übereinstimmungsfaktors	112
3.33	Abb. Übereinstimmung des Musters der „Allgemeinen Polypeptide“	113
3.34	Abb. Übereinstimmung der Muster für Diabetes Typ I und II	114
3.35	Abb. Übereinstimmung der Muster zur Diagnose der Nephropathien	115
3.36	Abb. Übereinstimmung des Musters der diabetischen Nephropathie mit den Kontroll-Diabetikern	118
3.37	Tab. Markerpolypeptide der Arteriosklerose im Plasma	120
3.38	Abb. Datenerfassung und Markerdefinition in Plasmaproben	121
3.39	Abb. Detektierte Amplituden zweier Polypeptide in Plasmaproben	122
3.40	Abb. Vergleich der Dialysate von „high-flux“- und „low-flux“- Membranen	124
3.41	Tab. Spezifische Proteinmuster im Dialysat von „high-flux“- und „low-flux“-Membranen	125
3.42	Abb. Signale nicht-peptidischen Ursprungs in Proben aus Dialysaten	128
3.43	Tab. Polypeptidmarker zur Diagnose der GvHD im Urin	129
3.44	Abb. Abbildungen der Urine von Transplantationspatienten ohne Probleme und in zeitlicher Nähe einer GvHD-Diagnose	130
3.45	Abb. Darstellung eines Polypeptides im zeitlichen Verlauf	131
3.46	Abb. Verläufe der Amplitude eines Polypeptides bei vier Patienten mit ausgebrochener GvHD bezogen auf den Tag der GvHD Diagnose	132
3.47	Abb. Sequenzierung zweier Markerpeptide mittels MALDI-MS/MS	133

Anhänge

I.	Ergebnisse der Pattern-Analyse für die 439 verwendeten Urinproben	170
II.	Ergebnisse der Pattern-Analyse für die 104 „unbekannten“ Proben	176

7. Literaturverzeichnis

Abian, J., Oosterkamp, A. J., and Gelpi, E.; Comparison of Conventional, Narrow-bore and Capillary Liquid Chromatography/Mass Spectrometry for Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Practical Considerations; *J Mass Spectrom* 34 (1999), 244-254

Adam, B. L., Qu, Y., Davis, J. W., Ward, M. D., Clements, M. A. et al.; Serum protein fingerprinting coupled with a pattern-matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men; *Cancer Res* 62 (2002), 13: 3609-3614

Adkins, J. N., Varnum, S. M., Auberry, K. J., Moore, R. J., Angell, N. H., Smith, R. D., Springer, D. L., and Pounds, J. G.; Toward a human blood serum proteome: analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry; *Mol Cell Proteomics* 1 (2002), 12: 947-955

Aebersold, R. and Goodlett, D. R.; Mass spectrometry in proteomics; *Chem Rev* 101 (2001), 2: 269-295

Aebersold, R. and Mann, M.; Mass spectrometry-based proteomics; *Nature* 422 (2003), 6928: 198-207

Aebersold, R. and Morrison, H. D.; Analysis of dilute peptide samples by capillary zone electrophoresis; *J Chromatogr* 516 (1990), 1: 79-88

American Diabetes Association; Diabetic Nephropathy; *Diabetes Care* 25 (2002), Supplement 1: 85-89

Anderson, N. L. and Anderson, N. G.; The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects; *Mol Cell Proteomics* 2 (2003), 1: 50

Anderson, N. L., Polanski, M., Pieper, R., Gatlin, T., Tirumalai, R. S. et al.; The Human Plasma Proteome: A Nonredundant List Developed by Combination of Four Separate Sources; *Mol Cell Proteomics* 3 (2004), 4: 311-326

Applied Biosystems (Ed.): Handbook Mariner API TOF Mass Spectrometer; (1998)

Arnett, S. D. and Lunte, C. E.; Investigation of the mechanism of pH-mediated stacking of anions for the analysis of physiological samples by capillary electrophoresis; *Electrophoresis* 24 (2003), 11: 1745-1752

Ascheim, S. and Zondek, B.; Hypophysenworderlappen hormon und ovarialhormon im Harn von Schwangeren; *Klin Wochenschr* 6 (1927), 1322-1324

Barrett, B. J. and Parfrey, P. S.; Prevention of nephrotoxicity induced by radiocontrast agents; *N Engl J Med* 331 (1994), 21: 1449-1450

Beckers, J. L. and Bocek, P.; Sample stacking in capillary zone electrophoresis: principles, advantages and limitations; *Electrophoresis* 21 (2000), 14: 2747-2767

Belder, D., Deege, A., Husmann, H., Kohler, F., and Ludwig, M.; Cross-linked poly(vinyl alcohol) as permanent hydrophilic column coating for capillary electrophoresis; *Electrophoresis* 22 (2001), 17: 3813-3818

Bennett, P. H., Haffner, S., Kasiske, B. L., Keane, W. F., Mogensen, C. E., Parving, H. H., Steffes, M. W., and Striker, G. E.; Screening and management of microalbuminuria in patients with diabetes mellitus: recommendations to the Scientific Advisory Board of the National Kidney Foundation from an ad hoc committee of the Council on Diabetes Mellitus of the National Kidney Foundation; *Am J Kidney Dis* 25 (1995), 1: 107-112

Bergquist, J., Palmblad, M., Wetterhall, M., Hakansson, P., and Markides, K. E.; Peptide mapping of proteins in human body fluids using electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry; *Mass Spectrom Rev* 21 (2002), 1: 2-15

Blennow, K. and Galasko, D.; Cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's disease: their role in Clinical Chemistry; *The Electronic Journal Of the International Federation Of Clinical Chemistry And Laboratory Medicine* (20030), 1

Brenner, B. M., Cooper, M. E., de Zeeuw, D., Keane, W. F., Mitch, W. E., Parving, H. H., Remuzzi, G., Snapinn, S. M., Zhang, Z., and Shahinfar, S.; Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy; *N Engl J Med* %20;345 (2001), 12: 861-869

Bruins, A. P.; Mechanistic aspects of electrospray ionization; *J Chromatogr* 794 (1998), 345-357

Burgi, D. S. and Chien, R. L.; Improvement in the method of sample stacking for gravity injection in capillary zone electrophoresis; *Anal Biochem* 202 (1992), 2: 306-309

Camilleri, P.: History and Development of Capillary Electrophoresis; in Camilleri, P.; *Capillary Electrophoresis - Theory and Practice* CRC Press; (1998)

Chiari, M., Cretich, M., Damin, F., Ceriotti, L., and Consonni, R.; New adsorbed coatings for capillary electrophoresis; *Electrophoresis* 21 (2000), 5: 909-916

Choe, L. H., Dutt, M. J., Relkin, N., and Lee, K. H.; Studies of potential cerebrospinal fluid molecular markers for Alzheimer's disease; *Electrophoresis* 23 (2002), 14: 2247-2251

Cifuentes, A., Canalejas, P., and Diez-Masa, J. C.; Preparation of linear polyacrylamide-coated capillaries

Study of the polymerization process and its effect on capillary electrophoresis performance; *J Chromatogr A* 830 (1999), 423-438

Clark, W. R. and Gao, D.; Low-molecular weight proteins in end-stage renal disease: potential toxicity and dialytic removal mechanisms; *J Am Soc Nephrol* 13 Suppl 1:S41-7. (2002), S41-S47

Cohen, G., Rudnicki, M., and Horl, W. H.; Isolation of modified ubiquitin as a neutrophil chemotaxis inhibitor from uremic patients; *J Am Soc Nephrol* 9 (1998), 3: 451-456

Cutillas, P., Burlingame, A., and Unwin, R.; Proteomic Strategies and Their Application in Studies of Renal Function; *News Physiol Sci* 19 (2004), 3: 114-119

Danish Centre for Human Genome Research; Human 2-D Databases for proteome analysis in health and disease; <http://proteomics.cancer.dk> (2004),

Dare, T. O., Davies, H. A., Turton, J. A., Lomas, L., Williams, T. C., and York, M. J.; Application of surface-enhanced laser desorption/ionization technology to the detection and identification of urinary parvalbumin-alpha: a biomarker of compound-induced skeletal muscle toxicity in the rat; *Electrophoresis* 23 (2002), 18: 3241-3251

Daugirdas, J. T., Blake, P. G., and Todd, S.; *Handbook of Dialysis*; (2001),

Davis, M. T., Spahr, C. S., McGinley, M. D., Robinson, J. H., Bures, E. J., Beierle, J., Mort, J., Yu, W., Luethy, R., and Patterson, S. D.; Towards defining the urinary proteome using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. II. Limitations of complex mixture analyses; *Proteomics* 1 (2001), 1: 108-117

Dickinson, A. M., Cavet, J., Cullup, H., Wang, X. N., Jarvis, M., Sviland, L., and Middleton, P. G.; Predicting outcome in hematological stem cell transplantation; *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 50 (2002), 6: 371-378

Drexel, H., Dworzak, E., Kirchmair, W., Milz, M. M., Puschendorf, B., and Dienstl, F.; Myoglobinemia in the early phase of acute myocardial infarction; *Am Heart J* 105 (1983), 4: 642-651

Farag, S. S.; Chronic graft-versus-host disease: where do we go from here?; *Bone Marrow Transplant* (2004),

Figeys, D., van, Oostveen, I., Ducret, A., and Aebersold, R.; Protein identification by capillary zone electrophoresis/microelectrospray ionization-tandem mass spectrometry at the subfemtomole level; *Anal Chem* 68 (1996), 11: 1822-1828

Figeys, D., Zhang, Y., and Aebersold, R.; Optimization of solid phase microextraction - capillary zone electrophoresis - mass spectrometry for high sensitivity protein identification; *Electrophoresis* 19 (1998), 13: 2338-2347

Foret, F., Szoko, E., and Karger, B. L.; Trace analysis of proteins by capillary zone electrophoresis with on-column transient isotachophoretic preconcentration; *Electrophoresis* 14 (1993), 5-6: 417-428

Frei, U. and Schober-Halstenberg, H. J.; *Nierenersatztherapie in Deutschland*; (2003),

Funk, C. D.; Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology; *Science* 294 (2001), 5548: 1871-1875

Gaede, P., Vedel, P., Larsen, N., Jensen, G. V., Parving, H. H., and Pedersen, O.; Multifactorial intervention and cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes; *N Engl J Med* 348 (2003), 5: 383-393

Gebauer, P., Krivankova, L., Pantuckova, P., Bocek, P., and Thormann, W.; Sample self-stacking in capillary zone electrophoresis: behavior of samples containing multiple major coionic components; *Electrophoresis* 21 (2000), 14: 2797-2808

Gejyo, F., Yamada, T., Odani, S., Nakagawa, Y., Arakawa, M. et al.; A new form of amyloid protein associated with chronic hemodialysis was identified as beta 2-microglobulin; *Biochem Biophys Res Commun* 129 (1985), 3: 701-706

Gelfi, C., Vigano, A., Ripamonti, M., Righetti, P. G., Sebastiano, R., and Citterio, A.; Protein analysis by capillary zone electrophoresis utilizing a trifunctional diamine for silica coating; *Anal Chem* 73 (2001), 16: 3862-3868

Gelpi, E.; Interfaces for coupled liquid-phase separation/mass spectrometry techniques. An update on recent developments; *J Mass Spectrom* 37 (2002), 3: 241-253

Ghafouri, B., Tagesson, C., and Lindahl, M.; Mapping of proteins in human saliva using two-dimensional gel electrophoresis and peptide mass fingerprinting; *Proteomics* 3 (2003), 6: 1003-1015

Gharbi, S., Gaffney, P., Yang, A., Zvelebil, M. J., Cramer, R., Waterfield, M. D., and Timms, J. F.; Evaluation of two-dimensional differential gel electrophoresis for proteomic expression analysis of a model breast cancer cell system; *Mol Cell Proteomics* 1 (2002), 2: 91-98

Giddings, J. C.; Harnessing electrical forces for separation. Capillary zone electrophoresis, isoelectric focusing, field-flow fractionation, split-flow thin-cell continuous-separation and other techniques; *J Chromatogr* 20 (1989), 480: 21-33

Gorg, A., Postel, W., and Gunther, S.; The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients; *Electrophoresis* 9 (1988), 9: 531-546

Gratwohl, A., Brand, R., Apperley, J., Biezen, Av A., Bandini, G. et al.; Graft-versus-host disease and outcome in HLA-identical sibling transplantations for chronic myeloid leukemia; *Blood* 100 (2002), 12: 3877-3886

Guzman, N. A. and Majors, R. E.; New Directions for Concentration Sensitivity Enhancement in CE and Microchip Technology; (2001a),

Guzman, N. A. and Stubbs, R. J.; The use of selective adsorbents in capillary electrophoresis-mass spectrometry for analyte preconcentration and microreactions: a powerful three-dimensional tool for multiple chemical and biological applications; *Electrophoresis* 22 (2001b), 17: 3602-3628

Haeggstrom, J. Z.; Structure, function, and regulation of leukotriene A4 hydrolase; *Am J Respir Crit Care Med* 161 (2000), 2 Pt 2: S25-S31

Haeggstrom, J. Z., Kull, F., Rudberg, P. C., Tholander, F., and Thunnissen, M. M.; Leukotriene A4 hydrolase; *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69:495-510. (2002), 495-510

Hampel, D. J., Sansome, C., Sha, M., Brodsky, S., Lawson, W. E., and Goligorsky, M. S.; Toward proteomics in uroscopy: urinary protein profiles after radiocontrast medium administration; *J Am Soc Nephrol* 12 (2001), 5: 1026-1035

Hauk, M., Kuhlmann, M. K., Riegel, W., and Kohler, H.; In vivo effects of dialysate flow rate on Kt/V in maintenance hemodialysis patients; *Am J Kidney Dis* 35 (2000), 1: 105-111

He, Q. Y., Lau, G. K., Zhou, Y., Yuen, S. T., Lin, M. C., Kung, H. F., and Chiu, J. F.; Serum biomarkers of hepatitis B virus infected liver inflammation: A proteomic study; *Proteomics* 3 (2003), 5: 666-674

Hecker, H., Vaske, B., and Bretz, F.; Baumanalysen nach CART und rpart - ein geeigneter Ansatz zur Analyse von Genomik- und Proteomikdaten ?; (2003),

Heiger, D. and Agilent Technologies; High performance capillary electrophoresis; (2000),

Hildebrandt, H. (Ed.): Pschyrembel Klinisches Wörterbuch; de Gruyter; Berlin(1998)

Hjerten, S.; Free zone electrophoresis; *Chromatogr Rev* 9 (1967), 2: 122-219

Hong, C. Y. and Chia, K. S.; Markers of diabetic nephropathy; *J Diabetes Complications* 12 (1998), 1: 43-60

Horl, W. H., Haag-Weber, M., Georgopoulos, A., and Block, L. H.; Physicochemical characterization of a polypeptide present in uremic serum that inhibits the biological activity of polymorphonuclear cells; *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (1990), 16: 6353-6357

Horowitz, M. M., Gale, R. P., Sondel, P. M., Goldman, J. M., Kersey, J. et al.; Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation; *Blood* 75 (1990), 3: 555-562

Ingendo, A., Kiehne, A., and Greiner, M.; CE-MS-MS of Peptides Using a Novel Orthogonal CE ESI Sprayer and Ion trap MS; *Chromatographia* 49 (1999), Supplement I: 87-92

Ishimitsu, T., Nishikimi, T., Saito, Y., Kitamura, K., Eto, T., Kangawa, K., Matsuo, H., Omae, T., and Matsuoka, H.; Plasma levels of adrenomedullin, a newly identified hypotensive peptide, in patients with hypertension and renal failure; *J Clin Invest* 94 (1994), 5: 2158-2161

Issaq, H. J.; A decade of capillary electrophoresis; *Electrophoresis* 21 (2000), 10: 1921-1939

Issaq, H. J.; The role of separation science in proteomics research; *Electrophoresis* 22 (2001), 17: 3629-3638

Issaq, H. J., Conrads, T. P., Janini, G. M., and Veenstra, T. D.; Methods for fractionation, separation and profiling of proteins and peptides; *Electrophoresis* 23 (2002a), 17: 3048-3061

Issaq, H. J., Veenstra, T. D., Conrads, T. P., and Felschow, D.; The SELDI-TOF MS approach to proteomics: protein profiling and biomarker identification; *Biochem Biophys Res Commun* 292 (2002b), 3: 587-592

Ivory, C. F.; Electrically driven separation processes: analytical and preparative methods; *Bioprocess Technol* 9:517-68. (1990), 517-568

Jaksch, M., Remberger, M., and Mattsson, J.; Increased immune transcript levels are correlated with acute graft-versus-host disease and cytomegalovirus response after allogeneic stem cell transplantation; *Transplantation* 77 (2004), 2: 195-200

James, P. (Ed.): *Proteome Research: Mass Spectrometry*; Springer Verlag; Berlin, Heidelberg, New York (2004)

Jarvis, M., Marzolini, M., Wang, X. N., Jackson, G., Sviland, L., and Dickinson, A. M.; Heat shock protein 70: correlation of expression with degree of graft-versus-host response and clinical graft-versus-host disease; *Transplantation* 76 (2003), 5: 849-853

Ji, H., Whitehead, R. H., Reid, G. E., Moritz, R. L., Ward, L. D., and Simpson, R. J.; Two-dimensional electrophoretic analysis of proteins expressed by normal and cancerous human crypts: application of mass spectrometry to peptide-mass fingerprinting; *Electrophoresis* 15 (1994), 3-4: 391-405

Johnson, T., Bergquist, J., Ekman, R., Nordhoff, E., Schurenberg, M., Kloppel, K. D., Muller, M., Lehrach, H., and Gobom, J.; A CE-MALDI interface based on the use of prestructured sample supports; *Anal Chem* 73 (2001), 8: 1670-1675

- Jones, M. B., Krutzsch, H., Shu, H., Zhao, Y., Liotta, L. A., Kohn, E. C., and Petricoin, E. F., III; Proteomic analysis and identification of new biomarkers and therapeutic targets for invasive ovarian cancer; *Proteomics* 2 (2002), 1: 76-84
- Jorgenson, J. W. and Lukacs, K. D.; Free-zone electrophoresis in glass capillaries; *Clin Chem* 27 (1981), 9: 1551-1553
- Jorgenson, J. W. and Lukacs, K. D.; Capillary zone electrophoresis; *Science* 222 (1983), 4621: 266-272
- Jurgens, M., Schrader, M., Raida, M., Forssmann, W. G., and Schulz-Knappe, P.; MULTI-DIMENSIONAL MAPPING OF HUMAN BLOOD PEPTIDES BY MASS SPECTROMETRY; *J Biomolecular Techniques* 6 (1998),
- Kaiser, T., Kamal, H., Rank, A., Kolb, H. J., Holler, E., Ganser, A., Hertenstein, B., Mischak, H., and Weissinger, E. M.; Proteomics applied to the clinical follow up of patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; *Blood* . (2004a),
- Kaiser, T., Wittke, S., Just, I., Krebs, R., Bartel, S., Fliser, D., Mischak, H., and Weissinger, E. M.; Capillary Electrophoresis coupled to mass spectrometer for automated and robust polypeptide determination in body fluids for clinical use; *Electrophoresis* (2004b), in press
- Kaniansky, D., Masar, M., Marak, J., and Bodor, R.; Capillary electrophoresis of inorganic anions; *J Chromatogr A* 834 (1999), 1-2: 133-178
- Katus, H. A., Remppis, A., Looser, S., Hallermeier, K., Scheffold, T., and Kubler, W.; Enzyme linked immuno assay of cardiac troponin T for the detection of acute myocardial infarction in patients; *J Mol Cell Cardiol* 21 (1989), 12: 1349-1353
- Kim, J. H., Skates, S. J., Uede, T., Wong Kk, K. K., Schorge, J. O., Feltmate, C. M., Berkowitz, R. S., Cramer, D. W., and Mok, S. C.; Osteopontin as a potential diagnostic biomarker for ovarian cancer; *JAMA* 287 (2002), 13: 1671-1679
- Klose, J.; Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals; *Humangenetik* 26 (1975), 3: 231-243
- Knox, J. H.; Thermal effects and band spreading in capillary electro-separations; *Chromatographia* 26 (1989), 329
- Knulst, A. C., Bril-Bazuin, C., Tibbe, G. J., van Oudenaren, A., Savelkoul, H. F., and Benner, R.; Cytokines in lethal graft-versus-host disease; *Transpl Int* 5 Suppl 1:S679-80. (1992), S679-S680
- Kolb, H. J., Schmid, C., Barrett, A. J., and Schendel, D. J.; Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras; *Blood* 103 (2004), 3: 767-776
- Kolios, G., Bairaktari, E., Tsolas, O., and Seferiadis, K.; Routine differential diagnosis of proteinurias by capillary electrophoresis; *Clin Chem Lab Med* 39 (2001), 9: 784-788
- Kong, C. H., Tattersall, J. E., Greenwood, R. N., and Farrington, K.; The effect of exercise during haemodialysis on solute removal; *Nephrol Dial Transplant* 14 (1999), 12: 2927-2931

Konig, S. and Welsch, T.; Moderation of the electroosmotic flow in capillary electrophoresis by chemical modification of the capillary surface with tentacle-like oligourethanes; *J Chromatogr A* 894 (2000), 1-2: 79-88

Kramer, H. J., Nguyen, Q. D., Curhan, G., and Hsu, C. Y.; Renal insufficiency in the absence of albuminuria and retinopathy among adults with type 2 diabetes mellitus; *JAMA* 289 (2003), 24: 3273-3277

Krivankova, L. and Bocek, P.; Synergism of capillary isotachopheresis and capillary zone electrophoresis; *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 689 (1997), 1: 13-34

Kuhr, W. G.: Separation of Small Organic Molecules; in Camilleri, P.; *Capillary Electrophoresis - Theory and Practice* CRC Press; (1998)

Kuriyama, M., Wang, M. C., Papsidero, L. D., Killian, C. S., Shimano, T., Valenzuela, L., Nishiura, T., Murphy, G. P., and Chu, T. M.; Quantitation of prostate-specific antigen in serum by a sensitive enzyme immunoassay; *Cancer Res* 40 (1980), 12: 4658-4662

Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C. et al.; Initial sequencing and analysis of the human genome; *Nature* 409 (2001), 6822: 860-921

Leak, L. V., Liotta, L. A., Krutzsch, H., Jones, M., Fusarola, V. A., Ross, S. J., Zhao, Y., and Petricoin, E. F., III; Proteomic analysis of lymph; *Proteomics* 4 (2004), 3: 753-765

Lewis, E. J., Hunsicker, L. G., Clarke, W. R., Berl, T., Pohl, M. A., Lewis, J. B., Ritz, E., Atkins, R. C., Rohde, R., and Raz, I.; Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes; *N Engl J Med* 345 (2001), 12: 851-860

Li, J., Wang, C., Kelly, J. F., Harrison, D. J., and Thibault, P.; Rapid and sensitive separation of trace level protein digests using microfabricated devices coupled to a quadrupole-time-of-flight mass spectrometer; *Electrophoresis* 21 (2000), 1: 198-210

Lorenz, P., Ruschpler, P., Koczan, D., Stiehl, P., and Thiesen, H. J.; From transcriptome to proteome: differentially expressed proteins identified in synovial tissue of patients suffering from rheumatoid arthritis and osteoarthritis by an initial screen with a panel of 791 antibodies; *Proteomics* 3 (2003), 6: 991-1002

Lux, J. A., Yin, H. F., and Schomburg, G.; Construction, evaluation, and analytical operation of a modular capillary electrophoresis instrument; *Chromatographia* 30 (1990), 7

Makita, Z., Bucala, R., Rayfield, E. J., Friedman, E. A., Kaufman, A. M. et al.; Reactive glycosylation endproducts in diabetic uraemia and treatment of renal failure; *Lancet* 343 (1994), 8912: 1519-1522

Manabe, T.; Capillary electrophoresis of proteins for proteomic studies; *Electrophoresis* 20 (1999), 15-16: 3116-3121

Marshall, T. and Williams, K. M.; Clinical analysis of human urinary proteins using high resolution electrophoretic methods; *Electrophoresis* 19 (1998), 10: 1752-1770

Mischak, H., Kaiser, T., Hillmann, M., Wittke, S., Hermann, A., Knueppel, S., Haller, H., and Fliser, D.; Proteomic analysis for early detection of diabetic renal damage; *Clinical Science* (2004),

Moini, M.; Capillary electrophoresis mass spectrometry and its application to the analysis of biological mixtures; *Anal Bioanal Chem* 373 (2002), 6: 466-480

Montori, V. M., Dinneen, S. F., Gorman, C. A., Zimmerman, B. R., Rizza, R. A., Bjornsen, S. S., Green, E. M., Bryant, S. C., and Smith, S. A.; The impact of planned care and a diabetes electronic management system on community-based diabetes care: the Mayo Health System Diabetes Translation Project; *Diabetes Care* 25 (2002), 11: 1952-1957

Neiman, B., Grushka, E., Gun, J., and Lev, O.; Organically modified silica sol-mediated capillary electrophoresis; *Anal Chem* 74 (2002), 14: 3484-3491

Neuhoff, N., Kaiser, T., Wittke, S., Krebs, R., Pitt, A., Burchard, A., Sundmacher, A., Schlegelberger, B., Kolch, W., and Mischak, H.; Mass spectrometry for the detection of differentially expressed proteins: a comparison of surface-enhanced laser desorption/ionization and capillary electrophoresis/mass spectrometry; *Rapid Commun Mass Spectrom* 18 (2004), 2: 149-156

Neumeier, D., Knedel, M., Wurzburg, U., Hennrich, N., and Lang, H.; [Determination of creatine phosphokinase-MB in the serum of patients with myocardial infarction by an immunological method (author's transl)]; *Klin Wochenschr* 53 (1975), 7: 329-333

Neususs, C., Pelzing, M., and Macht, M.; A robust approach for the analysis of peptides in the low femtomole range by capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry; *Electrophoresis* 23 (2002), 18: 3149-3159

Niessen, W. M.; State-of-the-art in liquid chromatography-mass spectrometry; *J Chromatogr A* 856 (1999), 1-2: 179-197

O'Farrell, P. H.; High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins; *J Biol Chem* 250 (1975), 10: 4007-4021

Olivares, J. A., Nguyen, N. T., Yonker, C. R., and Smith, R. D.; On-line mass spectrometric detection for capillary zone electrophoresis; *Anal Chem* 59 (1987), 8: 1230-1232

Parving, H. H., Oxenboll, B., Svendsen, P. A., Christiansen, J. S., and Andersen, A. R.; Early detection of patients at risk of developing diabetic nephropathy. A longitudinal study of urinary albumin excretion; *Acta Endocrinol (Copenh)* 100 (1982), 4: 550-555

Patterson, S. D. and Aebersold, R.; Mass spectrometric approaches for the identification of gel-separated proteins; *Electrophoresis* 16 (1995), 10: 1791-1814

Perkins, B. A., Ficociello, L. H., Silva, K. H., Finkelstein, D. M., Warram, J. H., and Krolewski, A. S.; Regression of microalbuminuria in type 1 diabetes; *N Engl J Med* 348 (2003), 23: 2285-2293

Petersson, M. A., Hulthe, G., and Fogelqvist, E.; New sheathless interface for coupling capillary electrophoresis to electrospray mass spectrometry evaluated by the analysis of fatty acids and prostaglandins; *J Chromatogr A* 854 (1999), 1-2: 141-154

Petricoin, E. E., Paweletz, C. P., and Liotta, L. A.; Clinical applications of proteomics: proteomic pattern diagnostics; *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7 (2002a), 4: 433-440

- Petricoin, E. F., Ardekani, A. M., Hitt, B. A., Levine, P. J., Fusaro, V. A. et al.; Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer; *Lancet* 359 (2002b), 9306: 572-577
- Petricoin, E. F., III, Ornstein, D. K., Paweletz, C. P., Ardekani, A., Hackett, P. S. et al.; Serum proteomic patterns for detection of prostate cancer; *J Natl Cancer Inst* 94 (2002), 20: 1576-1578
- Pieper, R., Gatlin, C. L., Makusky, A. J., Russo, P. S., Schatz, C. R. et al.; The human serum proteome: display of nearly 3700 chromatographically separated protein spots on two-dimensional electrophoresis gels and identification of 325 distinct proteins; *Proteomics* 3 (2003a), 7: 1345-1364
- Pieper, R., Gatlin, C. L., McGrath, A. M., Makusky, A. J., Mondal, M. et al.; Characterization of the human urinary proteome: A method for high-resolution display of urinary proteins on two-dimensional electrophoresis gels with a yield of nearly 1400 distinct protein spots; *Proteomics* 4 (2004), 4: 1159-1174
- Pieper, R., Su, Q., Gatlin, C. L., Huang, S. T., Anderson, N. L., and Steiner, S.; Multi-component immunoaffinity subtraction chromatography: An innovative step towards a comprehensive survey of the human plasma proteome; *Proteomics* 3 (2003b), 4: 422-432
- Pusch, W., Flocco, M. T., Leung, S. M., Thiele, H., and Kostrzewa, M.; Mass spectrometry-based clinical proteomics; *Pharmacogenomics* 4 (2003), 4: 463-476
- Rai, A. J., Zhang, Z., Rosenzweig, J., Shih, IeM, Pham, T., Fung, E. T., Sokoll, L. J., and Chan, D. W.; Proteomic approaches to tumor marker discovery; *Arch Pathol Lab Med* 126 (2002), 12: 1518-1526
- Robert-Koch-Institut; Gesundheitsbericht für Deutschland 1998; (2000),
- Rockel, A., Hertel, J., Fiegel, P., Abdelhamid, S., Panitz, N., and Walb, D.; Permeability and secondary membrane formation of a high flux polysulfone hemofilter; *Kidney Int* 30 (1986), 3: 429-432
- Rodewald, H. R. and Friedrich, W.; Blutstammzelltransplantation; *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 45 (2002), 85-w91ed
- Rogers, M. A., Clarke, P., Noble, J., Munro, N. P., Paul, A., Selby, P. J., and Banks, R. E.; Proteomic profiling of urinary proteins in renal cancer by surface enhanced laser desorption ionization and neural-network analysis: identification of key issues affecting potential clinical utility; *Cancer Res* 63 (2003), 20: 6971-6983
- Rohde, E., Tomlinson, A. J., Johnson, D. H., and Naylor, S.; Comparison of protein mixtures in aqueous humor by membrane preconcentration - capillary electrophoresis - mass spectrometry; *Electrophoresis* 19 (1998a), 13: 2361-2370
- Rohde, E., Tomlinson, A. J., Johnson, D. H., and Naylor, S.; Protein analysis by membrane preconcentration-capillary electrophoresis: systematic evaluation of parameters affecting preconcentration and separation; *J Chromatogr B Biomed Appl* 713 (1998b), 301-311
- Rosenblatt, K. P., Bryant-Greenwood, P., Killian, J. K., Mehta, A., Geho, D., Espina, V., Petricoin, E. F., III, and Liotta, L. A.; Serum proteomics in cancer diagnosis and management; *Annu Rev Med* 55:97-112. (2004), 97-112
- Rossing, K., Christensen, P. K., Hansen, B. V., Carstensen, B., and Parving, H. H.; Optimal dose of candesartan for renoprotection in type 2 diabetic patients with nephropathy: a double-blind randomized cross-over study; *Diabetes Care* 26 (2003a), 1: 150-155

Rossing, K., Jacobsen, P., Pietraszek, L., and Parving, H. H.; Renoprotective effects of adding angiotensin II receptor blocker to maximal recommended doses of ACE inhibitor in diabetic nephropathy: a randomized double-blind crossover trial; *Diabetes Care* 26 (2003b), 8: 2268-2274

Rosty, C., Christa, L., Kuzdzal, S., Baldwin, W. M., Zahurak, M. L. et al.; Identification of hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatitis-associated protein I as a biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma by protein biochip technology; *Cancer Res* 62 (2002), 6: 1868-1875

Schmidt, E. and Schmidt, F. W.; Fundamentals and evaluation of enzyme patterns in serum; *Prog Liver Dis* 7:411-28. (1982), 411-428

Schwer, C. and Lottspeich, F.; Analytical and micropreparative separation of peptides by capillary zone electrophoresis using discontinuous buffer systems; *J Chromatogr* 623 (1992), 2: 345-355

Seidel, C., Ringden, O., and Remberger, M.; Increased levels of syndecan-1 in serum during acute graft-versus-host disease; *Transplantation* 76 (2003), 2: 423-426

Serwe, M. and Ross, G.; Peptide Characterization by CE-ESI-MS with Orthogonal Spray; *Chromatographia* 49 (1999), Supplement I: 73-77

Shah, R. S., Wang, Q., and Lee, M. L.; Cycloaliphatic epoxy resin coating for capillary electrophoresis; *J Chromatogr A* 952 (2002), 1-2: 267-274

Sharma, K., Considine, R. V., Michael, B., Dunn, S. R., Weisberg, L. S., Kurnik, B. R., Kurnik, P. B., O'Connor, J., Sinha, M., and Caro, J. F.; Plasma leptin is partly cleared by the kidney and is elevated in hemodialysis patients; *Kidney Int* 51 (1997), 6: 1980-1985

Shihabi, Z. K.; Transient pseudo-isotachopheresis for sample concentration in capillary electrophoresis; *Electrophoresis* 23 (2002), 11: 1612-1617

Sinz, A., Bantscheff, M., Mikkat, S., Ringel, B., Drynda, S., Kekow, J., Thiesen, H. J., and Glocker, M. O.; Mass spectrometric proteome analyses of synovial fluids and plasmas from patients suffering from rheumatoid arthritis and comparison to reactive arthritis or osteoarthritis; *Electrophoresis* 23 (2002), 19: 3445-3456

Sjogren, M., Vanderstichele, H., Agren, H., Zachrisson, O., Edsbacke, M. et al.; Tau and Abeta42 in cerebrospinal fluid from healthy adults 21-93 years of age: establishment of reference values; *Clin Chem* 47 (2001), 10: 1776-1781

Smith, R. D., Olivares, J. A., Nguyen, N. T., and Udseth, H. R.; Capillary zone electrophoresis-mass spectrometry using an electrospray ionization interface; *Anal Chem* 60 (1988a), 5: 436-441

Smith, R. D. and Udseth, H. R.; Capillary zone electrophoresis-MS; *Nature* 331 (1988b), 6157: 639-640

Spahr, C. S., Davis, M. T., McGinley, M. D., Robinson, J. H., Bures, E. J. et al.; Towards defining the urinary proteome using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. I. Profiling an unfractionated tryptic digest; *Proteomics* 1 (2001), 1: 93-107

Spengler, B.: The Basics of Matrix-Assisted Laser Desorption, Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry and Post-Source Decay Analysis; in James, P.; *Proteome Research: Mass Spectrometry* Springer Verlag; Berlin, Heidelberg, New York (2000)

Standl, E., Hauner, H., and Ritz, E.; Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2003; (2004),

Steel, L. F., Shumpert, D., Trotter, M., Seeholzer, S. H., Evans, A. A., London, W. T., Dwek, R., and Block, T. M.; A strategy for the comparative analysis of serum proteomes for the discovery of biomarkers for hepatocellular carcinoma; *Proteomics* 3 (2003), 5: 601-609

Strege, M. A. and Lagu, A. L.; Capillary electrophoretic protein separations in polyacrylamide-coated silica capillaries and buffers containing ionic surfactants; *J Chromatogr* 630 (1993), 337-344

Takatsuka, H., Takemoto, Y., Iwata, N., Suehiro, A., Hamano, T., Okamoto, T., Kanamaru, A., and Kakishita, E.; Oral eicosapentaenoic acid for complications of bone marrow transplantation; *Bone Marrow Transplant* 28 (2001), 8: 769-774

Takatsuka, H., Takemoto, Y., Yamada, S., Wakae, T., Mori, A., Okada, M., Iwata, N., Okamoto, T., Kanamaru, A., and Kakishita, E.; Oral eicosapentaenoic acid for acute colonic graft-versus-host disease after bone marrow transplantation; *Drugs Exp Clin Res* 28 (2002), 4: 121-125

Takatsuka, H., Yamada, S., Okamoto, T., Fujimori, Y., Wada, H., Iwata, N., Kanamaru, A., and Kakishita, E.; Predicting the severity of intestinal graft-versus-host disease from leukotriene B4 levels after bone marrow transplantation; *Bone Marrow Transplant* 26 (2000), 12: 1313-1316

Terabe, S., Otsuka, K., Ichikawa, K., Tsuchuya, A., and Ando, T.; Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries; *Anal Chem* 56 (1984), 111

Thomas, R.; Recent developments in LC-MS-MS for the Identification and Measurement of Nanoscale Amounts of Proteins and Peptides; *Spectroscopy* 1 (2001), 16: 28-37

Thongboonkerd, V., McLeish, K. R., Arthur, J. M., and Klein, J. B.; Proteomic analysis of normal human urinary proteins isolated by acetone precipitation or ultracentrifugation; *Kidney Int* 62 (2002), 4: 1461-1469

Tirumalai, R. S., Chan, K. C., Prieto, D. A., Issaq, H. J., Conrads, T. P., and Veenstra, T. D.; Characterization of the low molecular weight human serum proteome; *Mol Cell Proteomics* . (2003),

Tiselius, A.; Thesis; *Nova Acta Regiae Societarium Upsaliensis* 1930, Ser. IV (1930), Nr. 4

Tsuji, T., Shiozaki, A., Kohno, R., Yoshizato, K., and Shimohama, S.; Proteomic profiling and neurodegeneration in Alzheimer's disease; *Neurochem Res* 27 (2002), 10: 1245-1253

Ueno, I., Sakai, T., Yamaoka, M., Yoshida, R., and Tsugita, A.; Analysis of blood plasma proteins in patients with Alzheimer's disease by two-dimensional electrophoresis, sequence homology and immunodetection; *Electrophoresis* 21 (2000), 9: 1832-1845

Vanholder, R., Argiles, A., Baurmeister, U., Brunet, P., Clark, W. et al.; Uremic toxicity: present state of the art; *Int J Artif Organs* 24 (2001), 10: 695-725

Vejda, S., Posovszky, C., Zelzer, S., Peter, B., Bayer, E., Gelbmann, D., Schulte-Hermann, R., and Gerner, C.; Plasma from cancer patients featuring a characteristic protein composition mediates protection against apoptosis; *Mol Cell Proteomics* 1 (2002), 5: 387-393

Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J. et al.; The sequence of the human genome; *Science* 291 (2001), 5507: 1304-1351

Viberti, G. C., Hill, R. D., Jarrett, R. J., Argyropoulos, A., Mahmud, U., and Keen, H.; Microalbuminuria as a predictor of clinical nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus; *Lancet* 1 (1982), 8287: 1430-1432

von Brocke, A., Nicholson, G., and Bayer, E.; Recent advances in capillary electrophoresis/electrospray-mass spectrometry; *Electrophoresis* 22 (2001), 7: 1251-1266

Waterval, J. C., Bestebreurtje, P., Lingeman, H., Versluis, C., Heck, A. J., Bult, A., and Underberg, W. J.; Robust and cost-effective capillary electrophoresis-mass spectrometry interfaces suitable for combination with on-line analyte preconcentration; *Electrophoresis* 22 (2001), 13: 2701-2708

Watzig, H., Degenhardt, M., and Kunkel, A.; Strategies for capillary electrophoresis: method development and validation for pharmaceutical and biological applications; *Electrophoresis* 19 (1998), 16-17: 2695-2752

Weissinger, E. M., Wittke, S., Kaiser, T., Haller, H., Bartel, S. et al.; Proteomic patterns established with capillary electrophoresis and mass spectrometry for diagnostic purposes; *Kidney Int* 65 (2004b), 1-9

Weissinger, E. M., Wittke, S., Kaiser, T., Haller, H., Bartel, S. et al.; Proteomic patterns established with capillary electrophoresis and mass spectrometry for diagnostic purposes; *Kidney Int* 65 (2004a), 6: 2426-2434

Westhuyzen, J., Cross, D. B., Cox, S. V., Frenneaux, M. P., and Fleming, S. J.; Urinary protein excretion following coronary angiography using a non-ionic radiocontrast agent; *Ann Clin Biochem* 33 (1996), Pt 4: 349-351

Wittke, S., Fliser, D., Haubitz, M., Bartel, S., Krebs, R. et al.; Determination of peptides and proteins in human urine with capillary electrophoresis-mass spectrometry, a suitable tool for the establishment of new diagnostic markers; *J Chromatogr A* 1013 (2003), 1-2: 173-181

Wittke, S., Kaiser, T., and Mischak, H.; Differential polypeptide display: the search for the elusive target; *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 803 (2004), 1: 17-26

Wolf, G. and Ritz, E.; Diabetic nephropathy in type 2 diabetes prevention and patient management; *J Am Soc Nephrol* 14 (2003), 5: 1396-1405

Wu, S. L., Choudhary, G., Ramstrom, M., Bergquist, J., and Hancock, W. S.; Evaluation of shotgun sequencing for proteomic analysis of human plasma using HPLC coupled with either ion trap or Fourier transform mass spectrometry; *J Proteome Res* 2 (2003), 4: 383-393

Wu, W., Tang, X., Hu, W., Lotan, R., Hong, W. K., and Mao, L.; Identification and validation of metastasis-associated proteins in head and neck cancer cell lines by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry; *Clin Exp Metastasis* 19 (2002), 4: 319-326

Wulfkühle, J. D., Paweletz, C. P., Steeg, P. S., Petricoin, E. F., III, and Liotta, L.; Proteomic approaches to the diagnosis, treatment, and monitoring of cancer; *Adv Exp Med Biol* 532:59-68. (2003), 59-68

Zhang, B., Liu, H., Karger, B. L., and Foret, F.; Microfabricated devices for capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry; *Anal Chem* 71 (1999), 15: 3258-3264

Anhang I: Ergebnisse der Pattern-Analyse für die 439 zur Definition der Musterlisten verwendeten Proben.

Probe Nr.	Gruppe	Eigenschaften			Musterübereinstimmungen (%)										Diagnosen			
		A/K mg/mg	U-Alb mg/l	DiRe	QC	D1	D2	Nep allg	DN	FSG	MNGN	MCD	DN diff	FSG diff	MNGN diff	MCD diff	D I	D II
1	Kontrolle	-	-	-	89	45	2	3	5	2	7	18	43	44	18	84	X	
2	Kontrolle	-	-	-	81	28	17	10	16	16	6	26	38	37	37	75		
3	Kontrolle	-	-	-	91	27	7	5	12	9	2	7	43	41	13	70		
4	Kontrolle	-	-	-	96	7	6	5	5	14	2	9	43	31	19	72		
5	Kontrolle	-	-	-	84	27	23	14	11	17	10	11	43	31	23	66		
6	Kontrolle	-	-	-	93	25	3	10	8	2	3	22	43	39	22	75		
7	Kontrolle	-	-	-	94	19	12	3	9	8	5	7	43	40	13	74		
8	Kontrolle	-	-	-	87	27	23	15	14	7	-1	11	43	31	13	75		
9	Kontrolle	-	-	-	96	19	13	4	13	9	-1	0	53	40	13	75		
10	Kontrolle	-	-	-	94	19	22	7	6	11	3	8	43	36	13	80		
11	Kontrolle	-	-	-	68	16	51	12	23	13	5	16	43	31	23	74	X	
12	Kontrolle	-	-	-	89	19	34	5	14	-1	5	12	43	39	22	84		
13	Kontrolle	-	-	-	72	25	51	20	23	12	5	12	52	43	21	76	X	
14	Kontrolle	-	-	-	86	28	25	12	16	13	9	10	53	32	22	69		
15	Kontrolle	-	-	-	93	36	11	2	8	6	3	8	43	35	17	79	X	
16	Kontrolle	-	-	-	93	19	12	5	14	5	3	7	33	40	13	79		
17	Kontrolle	-	-	-	94	20	9	1	8	5	-1	4	53	44	22	70		
18	Kontrolle	-	-	-	96	8	28	13	10	5	5	7	43	31	13	79		
19	Kontrolle	-	-	-	94	26	25	6	3	16	2	25	43	42	13	84		
20	Kontrolle	-	-	-	98	7	16	7	8	5	-1	11	43	36	13	84		
21	Kontrolle	-	-	-	98	0	12	9	10	15	5	23	43	43	13	89		
22	Kontrolle	-	-	-	87	16	50	14	20	16	15	20	43	43	21	79	X	
23	Kontrolle	-	-	-	98	27	10	7	6	12	3	13	43	38	13	89		
24	Kontrolle	-	-	-	96	11	16	10	13	11	9	21	43	44	28	81		
25	Kontrolle	-	-	-	96	15	15	20	18	11	8	29	55	30	9	79		
26	Kontrolle	-	-	-	98	16	6	20	13	32	19	39	43	42	33	81		
27	Kontrolle	-	-	-	94	9	13	15	10	5	-1	32	43	34	26	84		
28	Kontrolle	-	-	-	70	27	40	12	19	16	6	7	33	31	22	74		
29	Kontrolle	-	-	-	98	20	3	2	5	6	3	4	43	40	19	80		
30	Kontrolle	-	-	-	93	19	2	2	6	6	2	14	43	44	19	81		
31	Kontrolle	-	-	-	98	19	-1	1	7	3	6	9	43	45	17	86		
32	Kontrolle	-	-	-	98	8	-1	3	15	7	3	19	43	36	22	66		
33	Kontrolle	-	-	-	82	19	18	12	15	15	5	7	33	42	17	71		
34	Kontrolle	-	-	-	89	11	9	7	12	7	3	13	43	40	13	84		
35	Kontrolle	-	-	-	60	17	45	31	35	32	20	26	43	39	30	56		
36	Kontrolle	-	-	-	93	19	5	6	6	3	-1	4	43	35	13	75		
37	Kontrolle	-	-	-	87	11	12	1	10	14	3	11	43	44	19	75		
38	Kontrolle	-	-	-	91	16	2	1	7	17	3	14	43	40	22	75		
39	Kontrolle	-	-	-	96	20	8	2	10	9	6	11	43	40	30	75		
40	Kontrolle	-	-	-	93	36	6	1	13	13	3	17	42	39	23	84	X	
41	Kontrolle	-	-	-	96	24	3	2	11	6	6	11	52	39	13	71		
42	Kontrolle	-	-	-	96	24	3	4	12	3	-1	3	42	39	13	75		
43	Kontrolle	-	-	-	98	24	6	5	10	9	6	16	52	45	22	81		
44	Kontrolle	-	-	-	68	17	46	14	23	28	13	19	33	52	22	66	X	
45	Kontrolle	-	-	-	98	27	2	6	13	7	3	7	43	31	17	75		
46	Kontrolle	-	-	-	91	8	37	29	12	8	9	13	43	36	18	72		
47	Kontrolle	-	-	-	84	19	35	26	11	20	17	15	43	45	13	71		
48	Kontrolle	-	-	-	87	17	32	24	16	12	5	4	43	45	25	76		
49	Kontrolle	-	-	-	98	18	6	15	6	10	7	3	33	45	13	71		
50	Kontrolle	-	-	-	96	7	10	10	12	6	12	16	43	41	13	84		
51	Kontrolle	-	-	-	96	7	-1	12	7	19	10	16	33	52	24	81		
52	Kontrolle	-	-	-	96	7	18	18	16	2	6	22	43	38	26	79		
53	Kontrolle	-	-	-	91	16	6	10	6	18	8	16	33	40	22	81		
54	Kontrolle	-	-	-	98	29	8	25	29	18	16	19	33	45	32	84		
55	Kontrolle	-	-	-	98	8	12	36	27	23	32	34	25	35	19	70		
56	Kontrolle	-	-	-	94	7	32	15	10	14	10	28	33	38	18	84		
57	Kontrolle	-	-	-	87	24	13	13	17	6	13	16	43	39	28	79		
58	Kontrolle	-	-	-	91	7	12	3	13	-1	-1	8	53	34	34	79		
59	Kontrolle	-	-	-	91	7	-1	3	8	10	9	14	33	49	22	80		
60	Kontrolle	-	-	-	72	19	54	15	18	16	7	21	48	38	15	69	X	
61	Kontrolle	-	-	-	75	0	57	15	12	12	8	11	33	43	22	79	X	
62	Kontrolle	-	-	-	67	7	70	18	25	17	14	11	67	38	28	60	X	
63	Kontrolle	-	-	-	25	64	76	37	38	45	29	26	77	56	38	38	X	
64	Kontrolle	-	-	-	53	36	59	22	29	26	17	19	67	46	38	43	X	X
65	Kontrolle	-	-	-	86	27	24	6	6	21	4	14	43	45	22	84		
66	Kontrolle	-	-	-	89	17	15	9	7	9	5	16	33	40	25	86		
67	Kontrolle	-	-	-	87	17	9	7	10	13	2	12	33	40	13	75		
68	Kontrolle	-	-	-	84	19	33	54	62	56	58	37	49	31	9	47		
69	Kontrolle	-	-	-	72	55	60	40	33	26	30	36	41	37	17	67	X	X
70	Kontrolle	-	-	-	87	26	31	22	21	27	23	41	43	41	35	65		
71	Kontrolle	-	-	-	86	8	6	8	10	11	5	25	43	38	13	79		
72	Kontrolle	-	-	-	91	16	47	11	9	15	7	12	33	35	13	76	X	
73	Kontrolle	-	-	-	96	33	32	10	9	10	7	28	33	42	13	79		
74	Kontrolle	-	-	-	89	16	18	8	8	17	14	25	33	44	31	76		
75	Kontrolle	-	-	-	94	17	9	10	6	23	10	15	33	41	13	66		
76	Kontrolle	-	-	-	96	17	23	25	29	22	16	47	53	51	13	56		

Fortsetzung folgende Seite

Anhang I: Ergebnisse der Pattern-Analyse (Fortsetzung).

Probe Nr. Gruppe	Eigenschaften			Musterübereinstimmungen (%)												Diagnosen			
	A/K mg/mg	U-Alb mg/l	DiRe	QC	D1	D2	Nep allg	DN	FSG	MNG	NGN	MCD	MCD	diff	diff	diff	diff	D I	D II
77	Kontrolle	-	-	-	50	64	69	35	41	34	34	26	67	43	38	34			
78	Kontrolle	-	-	-	100	17	18	32	22	43	32	39	33	49	24	70			
79	Kontrolle	-	-	-	94	27	22	7	10	12	8	15	33	43	13	75			
80	Kontrolle	-	-	-	93	36	24	10	8	21	20	32	33	42	25	79	X		
81	Kontrolle	-	-	-	100	17	6	14	4	10	3	17	33	47	13	71			
82	Kontrolle	-	-	-	93	30	25	17	13	21	14	46	33	47	25	79			
83	Kontrolle	-	-	-	94	8	32	37	30	19	29	45	33	48	21	75			
84	Kontrolle	-	-	-	94	36	12	24	19	21	18	44	33	42	28	62	X		
85	Kontrolle	-	-	-	89	43	34	29	17	27	17	49	33	41	28	57	X		
86	Kont./Kind	-	-	-	98	8	18	25	14	27	24	19	43	52	30	76			
87	Kont./Kind	-	-	-	98	8	3	11	9	19	9	21	33	36	18	72			
88	Kont./Kind	-	-	-	96	0	6	17	4	11	3	4	43	48	18	76			
89	Kont./Kind	-	-	-	96	8	19	21	13	14	13	11	41	45	15	75			
90	Kont./Kind	-	-	-	96	16	32	14	5	12	10	12	43	43	30	80			
91	Kont./Kind	-	-	-	93	9	3	17	4	21	6	16	33	53	28	76			
92	Kont./Kind	-	-	-	79	25	35	20	16	17	8	15	52	44	24	71			
93	Kont./Kind	-	-	-	94	24	20	27	7	20	5	21	43	32	23	76			
94	Kont./Kind	-	-	-	84	15	47	18	16	11	-1	7	43	52	22	70			X
95	D1 P0	12	0,01	-	79	45	66	35	37	43	28	25	53	41	34	48	X	X	
96	D1 P0	12	0,01	-	89	42	9	16	15	20	14	25	33	36	37	72	X	X	
97	D1 P0	15	0,01	-	74	64	55	30	23	30	24	32	43	44	34	66	X	X	
98	D1 P0	14	0,01	-	43	91	82	36	39	45	26	31	72	53	30	39			
99	D1 P0	12	0,01	-	81	55	41	19	21	24	18	27	43	37	36	66	X	X	
100	D1 P0	12	0,01	-	75	45	29	21	15	24	16	27	33	52	31	75	X	X	
101	D1 P0	12	0,01	-	87	60	15	18	11	22	11	23	43	57	22	66	X	X	
102	D1 P0	12	0,01	-	87	34	9	13	23	27	15	10	52	58	18	57	X	X	
103	D1 P0	12	0,01	-	43	90	68	36	37	49	33	31	67	61	42	39			
104	D1 P0	12	0,01	-	94	43	24	35	19	27	20	54	33	47	29	62	X	X	
105	D1 P0	12	0,01	-	96	82	42	36	20	34	26	39	43	37	23	77	X	X	
106	D1 P0	12	0,01	-	86	62	36	28	20	24	22	35	43	45	29	70	X	X	
107	D1 P0	12	0,01	-	91	60	28	31	29	44	21	41	42	63	34	57	X	X	
108	D1 P0	12	0,01	-	89	63	12	31	19	34	17	31	33	49	22	67	X	X	
109	D1 P0	12	0,01	-	65	91	42	37	22	44	29	45	33	62	36	59	X	X	
110	D1 P0	12	0,01	-	86	60	15	21	15	31	18	36	43	49	28	62	X	X	
111	D1 P0	12	0,01	-	89	63	46	32	33	40	30	44	43	58	32	53	X	X	
112	D1 P0	12	0,01	-	86	83	29	27	14	42	11	33	33	59	28	62	X	X	
113	D1 P0	12	0,01	-	87	69	12	23	19	28	24	41	33	46	28	62	X	X	
114	D1 P0	22	0,01	-	46	81	68	32	31	45	18	30	67	54	40	34			
115	D1 P0	31	0,01	-	91	52	22	33	9	12	12	27	33	45	21	79	X	X	
116	D1 P0	12	0,01	-	44	60	72	37	40	50	39	35	72	42	30	43			
117	D1 P0	12	0,01	-	82	63	15	26	11	32	10	23	33	42	28	76	X	X	
118	D1 P0	12	0,01	-	91	64	22	29	13	29	8	25	33	61	19	71	X	X	
119	D1 P0	12	0,01	-	93	45	41	28	14	31	21	35	52	51	29	69	X	X	
120	D1 P0	12	0,02	-	63	54	47	29	28	34	29	26	62	54	43	34	X	X	
121	D1 P0	12	0,02	-	94	38	32	27	11	10	9	19	43	42	19	79	X	X	
122	D1 P0	12	0,02	-	74	43	40	35	31	38	29	50	72	55	34	43	X	X	
123	D1 P1	12	0,04	-	79	64	64	30	32	35	26	25	43	44	23	48	X	X	
124	D1 P1	12	0,04	-	32	72	92	38	35	52	26	31	72	51	50	43			
125	D1 P1	12	0,04	-	72	42	62	28	23	30	18	30	33	36	31	61	X	X	
126	D1 P1	60	0,04	-	74	46	37	27	16	24	17	36	43	43	35	70	X	X	
127	D1 P1	12	0,04	-	96	43	30	51	45	52	44	56	47	42	28	44	X	X	
128	D1 P1	12	0,04	-	74	41	50	50	61	65	47	61	55	56	41	44	X	X	diab. N. / FSGS
129	D1 P1	12	0,04	-	75	34	44	32	30	22	19	47	63	51	28	67	X	X	
130	D1 P1	12	0,05	-	77	55	32	33	32	43	18	32	67	67	28	56	X	X	
131	D1 P1	12	0,05	-	93	62	39	46	25	31	16	54	43	43	19	85	X	X	
132	D1 P1	12	0,05	-	87	83	50	36	24	35	16	22	33	53	13	70	X	X	
133	D1 P1	47	0,05	-	81	26	62	40	38	23	21	23	60	39	18	65	X	X	
134	D1 P2	176	0,31	-	65	53	66	66	61	76	58	64	53	63	54	39	X	X	FSGS
135	D1 P2	363	0,42	-	77	34	60	76	74	71	70	59	53	50	31	12	X	X	diab. N.
136	D2 P0	51	0,03	-	93	40	74	68	42	35	47	63	55	26	22	43	X	X	
137	D2 P0	13	0,02	-	89	11	68	35	17	19	15	22	43	48	13	70	X	X	
138	D2 P0	12	0,01	-	77	17	97	96	83	71	67	79	83	33	30	30	X	X	diab. N.
139	D2 P0	12	0,01	-	98	0	46	35	12	28	15	55	43	45	19	95	X	X	
140	D2 P0	15	0,01	-	100	0	44	18	7	15	8	21	39	37	19	84	X	X	
141	D2 P0	33	0,03	-	89	10	75	64	46	42	38	52	64	30	15	52	X	X	
142	D2 P0	22	0,02	-	94	0	62	29	15	22	17	59	33	32	23	86	X	X	
143	D2 P0	27	0,02	-	96	0	38	39	26	32	18	36	54	55	15	75	X	X	
144	D2 P0	13	0,01	X	89	10	54	70	58	68	56	77	48	33	44	40	X	X	
145	D2 P0	12	0,01	-	70	37	60	29	29	15	9	27	43	46	17	75	X	X	
146	D2 P0	12	0,01	X	68	27	58	42	30	14	16	31	58	38	22	79	X	X	
147	D2 P0	12	0,01	-	87	7	72	48	37	22	24	49	48	30	23	74	X	X	
148	D2 P0	62	0,03	X	93	19	62	23	20	13	6	18	55	35	15	74	X	X	
149	D2 P0	12	0,01	X	93	8	29	27	16	25	20	48	43	42	23	76	X	X	
150	D2 P0	12	0,01	-	96	8	41	24	13	8	16	28	43	34	17	75	X	X	
151	D2 P0	12	0,01	-	91	17	57	26	26	20	15	40	43	51	28	74	X	X	
152	D2 P0	20	0,01	-	94	10	48	40	27	11	21	39	43	32	25	80	X	X	

Fortsetzung folgende Seite

Anhang I: Ergebnisse der Pattern-Analyse (Fortsetzung).

Probe Nr.	Gruppe	Eigenschaften			Musterübereinstimmungen (%)										Diagnosen				
		A/K mg/mg	U-Alb mg/l	DiRe	QC	D1	D2	Nep allg	DN	FSGM	MNGN	MCD	DN diff	FSGM diff	MNGN diff	MCD diff	D I	D II	Nephropathie
153	D2 P0	12	0,01		86	0	82	62	44	33	44	53	53	27	31	57	X		
154	D2 P0	12	0,01		93	17	57	30	23	18	24	30	43	28	41	74	X		
155	D2 P0	12	0,01		96	7	24	15	5	8	16	24	33	34	27	81			
156	D2 P0	12	0,01		93	7	50	30	19	16	19	22	33	33	13	79	X		
157	D2 P0	12	0,01		94	16	25	21	7	10	8	33	33	43	27	76			
158	D2 P0	14	0,01		100	0	53	48	30	16	26	58	49	35	23	74	X		
159	D2 P0	23	0,02		98	0	68	32	20	26	19	48	43	35	30	65	X		
160	D2 P0	12	0,01		84	15	51	35	31	22	27	42	62	47	30	70	X		
161	D2 P0	22	0,01		75	7	66	38	37	21	23	22	72	36	34	61	X		
162	D2 P0	12	0,01		91	18	62	24	14	18	14	18	33	34	13	74	X		
163	D2 P0	35	0,01		96	7	30	22	14	9	7	18	49	38	9	78			
164	D2 P0	20	0,02		94	7	45	34	17	19	16	31	45	44	19	70			
165	D2 P0	12	0,01		94	7	28	17	7	12	5	26	33	52	36	79			
166	D2 P0	15	0,01		100	7	31	35	11	13	19	33	33	36	24	84			
167	D2 P0	21	0,01		98	7	21	23	7	9	11	14	53	37	19	84			
168	D2 P0	12	0,01		100	16	26	25	7	9	3	31	33	33	25	84			
169	D2 P0	12	0,01		91	7	22	20	11	9	11	23	33	43	18	85			
170	D2 P0	12	0,01		86	46	71	27	15	19	21	16	43	43	17	79	X	X	
171	D2 P0	12	0,01		75	17	74	34	21	20	18	16	43	46	25	75			X
172	D2 P0	12	0,01	X	86	38	78	25	16	29	15	19	43	43	21	73	X	X	
173	D2 P0	12	0,01		86	16	46	12	9	13	7	9	33	43	17	84			X
174	D2 P0	12	0,01		93	27	51	19	10	20	9	32	43	44	30	65			X
175	D2 P0	17	0,01		96	0	38	43	34	40	43	30	63	44	24	47			
176	D2 P0	17	0,01		86	8	48	18	18	23	14	34	62	38	13	70			X
177	D2 P0	61	0,02		86	16	59	62	38	34	41	51	60	25	15	60			X
178	D2 P0	14	0,01		98	16	51	42	17	20	18	48	33	38	35	74	X		X
179	D2 P0	12	0,01		94	17	73	28	9	25	10	33	33	43	24	79	X		X
180	D2 P0	12	0,01		94	7	41	10	4	21	15	15	53	46	19	78			
181	D2 P0	40	0,03		93	7	62	41	38	23	27	27	41	35	10	65	X		X
182	D2 P0	12	0,01		77	30	48	30	13	16	5	12	33	41	23	75	X		X
183	D2 P0	12	0,01		93	16	32	26	8	21	3	26	33	43	37	79			
184	D2 P0	12	0,01		82	16	38	16	21	18	8	25	67	49	29	56			
185	D2 P0	24	0,01	X	94	16	65	31	19	26	11	25	43	38	13	69			X
186	D2 P0	15	0,02	X	89	7	75	34	19	18	16	31	51	25	9	74			X
187	D2 P0	12	0,01		79	15	66	25	22	30	14	22	41	24	4	74	X		X
188	D2 P0	18	0,01		91	25	68	34	21	22	11	27	60	28	18	70	X		X
189	D2 P0	12	0,01	X	82	0	58	14	10	19	2	26	53	41	31	79	X		X
190	D2 P0	12	0,01		77	7	51	8	8	12	7	18	53	42	13	84	X		X
191	D2 P0	36	0,03		84	10	70	67	49	55	58	70	47	23	24	54	X		MCD
192	D2 P0	12	0,01		81	25	70	39	34	22	23	41	53	38	23	70	X		X
193	D2 P0	12	0,01		89	16	39	21	3	29	4	25	53	50	25	76			
194	D2 P0	12	0,01		87	7	59	36	11	5	20	28	53	32	19	84	X		X
195	D2 P0	12	0,01		63	35	89	56	35	37	32	52	53	45	18	52	X	X	MCD
196	D2 P0	12	0,01		98	7	46	22	20	14	9	33	33	42	20	79	X		X
197	D2 P0	20	0,01		58	52	78	65	44	54	41	46	65	26	34	43	X	X	X
198	D2 P0	12	0,01		72	45	61	14	13	12	3	14	33	42	17	79	X	X	X
199	D2 P0	12	0,01		94	8	45	10	6	15	5	17	43	49	24	75			
200	D2 P0	12	0,01		94	0	55	51	19	20	23	56	35	42	24	75	X		MCD
201	D2 P0	17	0,02		53	21	71	48	40	50	38	38	78	46	30	51	X		X
202	D2 P0	12	0,01		86	19	77	29	16	19	3	16	59	50	17	74	X		X
203	D2 P0	12	0,01		77	19	80	34	23	25	11	23	53	42	23	69	X		X
204	D2 P0	17	0,01		94	26	62	52	26	32	34	55	58	28	8	66	X		MCD
205	D2 P0	12	0,01		31	64	83	43	36	52	36	34	67	46	42	43	I		
206	D2 P0	14	0,02		98	7	66	48	40	48	32	54	50	37	4	52			X
207	D2 P0	12	0,01		93	19	77	26	13	16	8	25	43	39	18	84			X
208	D2 P0	12	0,01		62	46	93	58	51	46	42	51	76	37	10	56	X	X	diab. N.
209	D2 P0	12	0,01	X	81	0	87	50	33	31	30	40	54	36	12	65	X		X
210	D2 P0	12	0,01	X	93	7	78	40	11	18	14	29	43	43	24	74	X		X
211	D2 P0	12	0,01		84	17	79	38	24	29	8	36	43	44	19	75	X		X
212	D2 P0	12	0,01		86	25	84	34	17	15	18	41	53	43	13	74	X		X
213	D2 P0	12	0,01		24	63	86	60	39	51	32	35	72	42	34	43	I		
214	D2 P0	22	0,02		75	29	81	36	24	17	11	16	62	43	13	69	X		X
215	D2 P0	12	0,01		96	7	56	25	8	16	8	14	53	36	17	78	X		X
216	D2 P0	12	0,01	X	91	9	75	39	8	22	5	36	33	39	19	84			X
217	D2 P0	12	0,01		39	72	75	33	31	42	24	25	77	42	52	38	I		
218	D2 P0	12	0,01		84	7	74	19	11	27	4	21	43	36	30	75	X		X
219	D2 P0	18	0,03		68	38	93	50	33	37	24	49	83	33	12	56	X	X	
220	D2 P0	12	0,01		70	25	66	32	28	20	20	22	72	34	17	65	X		X
221	D2 P0	12	0,01	X	93	16	70	43	29	35	33	60	35	40	13	65	X		X
222	D2 P0	12	0,01		53	72	72	42	32	47	25	43	62	42	42	43	X	X	
223	D2 P0	12	0,01		91	10	90	72	51	48	64	77	56	15	23	44	X		diab. N.
224	D2 P0	12	0,02	X	87	11	74	46	17	24	7	37	60	39	13	74	X		X
225	D2 P0	12	0,01		68	72	54	30	23	44	18	43	57	48	31	48	X	X	
226	D2 P0	12	0,01		94	29	67	29	19	26	12	22	49	27	9	69	X		X
227	D2 P0	25	0,02		82	11	55	19	17	34	13	23	58	44	13	76	X		X
228	D2 P0	12	0,01		100	8	24	17	4	9	3	14	43	40	13	84			

Fortsetzung folgende Seite

Anhang I: Ergebnisse der Pattern-Analyse (Fortsetzung).

Probe Nr.	Gruppe	Eigenschaften			Musterübereinstimmungen (%)										Diagnosen				
		A/K mg/mg	U-Alb mg/l	DiRe	QC	D1	D2	Nep allg	DN	FSG	MNGN	MCD	DN diff	FSG diff	MNGN diff	MCD diff	D I	D II	Nephropathie
229	D2 P0	12	0,01		79	28	94	34	19	19	8	20	43	33	22	79	X		
230	D2 P0	12	0,01		91	17	58	45	27	34	28	48	39	44	9	63	X		
231	D2 P0	12	0,01		91	26	72	26	9	13	5	12	43	47	18	79	X		
232	D2 P0	17	0,02		96	28	75	68	64	63	57	74	57	47	17	31	X		diab. N.
233	D2 P0	12	0,01		74	17	97	45	30	14	18	29	51	37	-1	66	X		
234	D2 P0	12	0,01		94	35	49	42	45	35	32	62	45	40	13	53	X	X	
235	D2 P0	12	0,01		62	19	100	47	35	35	23	30	53	35	17	65	X		
236	D2 P0	12	0,01		81	26	94	43	28	20	19	18	53	38	17	52	X		
237	D2 P0	12	0,01		67	27	73	30	29	16	26	18	72	43	29	55	X		
238	D2 P0	12	0,01		98	16	55	30	7	22	5	33	43	33	25	71	X		
239	D2 P0	17	0,01		94	0	73	26	12	26	8	35	31	36	4	79	X		
240	D2 P0	12	0,01		86	17	78	38	21	28	19	30	49	24	17	74	X		
241	D2 P0	20	0,01	X	98	7	81	42	24	22	24	37	35	29	20	66	X		
242	D2 P0	12	0,01		96	7	62	35	10	16	12	16	49	43	17	79	X		
243	D2 P0	12	0,01	X	93	34	87	73	64	59	56	63	49	27	17	35	X	X	diab. N.
244	D2 P0	34	0,02		75	38	48	22	24	22	17	20	62	47	21	65	X	X	
245	D2 P0	14	0,01		56	38	80	77	87	68	79	51	75	22	39	12	X	X	diab. N.
246	D2 P0	12	0,01		84	38	91	36	24	25	14	34	59	55	17	68	X	X	
247	D2 P0	12	0,01		100	7	58	25	6	13	16	11	43	53	19	70	X		
248	D2 P0	19	0,03		87	29	84	32	20	26	24	27	43	38	19	70	X		
249	D2 P0	12	0,01		98	7	74	47	26	38	31	48	31	23	10	70	X		
250	D2 P0	92	0,03		96	0	50	71	39	46	48	84	54	24	14	45	X		MCD
251	D2 P0	12	0,01		89	17	50	32	13	36	21	56	43	39	18	63	X		
252	D2 P0	12	0,01		89	19	74	29	19	13	19	15	31	30	12	79	X		
253	D2 P0	12	0,01		98	29	60	24	8	17	12	31	44	43	12	73	X		
254	D2 P0	12	0,01		98	19	58	59	34	48	49	47	42	18	9	62	X		
255	D2 P0	12	0,01		86	19	72	26	13	16	15	27	33	41	17	79	X		
256	D2 P0	12	0,01		87	43	81	50	26	32	28	37	51	36	18	58	X	X	
257	D2 P0	12	0,01		93	16	54	14	15	15	3	19	53	43	28	64	X		
258	D2 P0	82	0,03		100	37	68	67	63	74	75	73	18	52	29	32	X	X	FSGS
259	D2 P0	12	0,01		93	35	80	65	42	50	45	75	31	27	15	49	X	X	MCD
260	D2 P0	12	0,01		93	19	68	27	15	14	15	23	43	36	21	74	X		
261	D2 P0	12	0,01		96	11	51	26	16	9	15	25	49	41	18	79	X		
262	D2 P0	12	0,01		100	56	35	51	37	33	39	62	36	35	19	59	X		MCD
263	D2 P0	12	0,01		100	27	51	30	9	12	11	30	53	39	19	69	X		
264	D2 P0	12	0,01		94	19	65	37	14	28	21	37	41	36	10	69	X		
265	D2 P0	12	0,01		84	19	83	35	19	22	21	27	48	29	23	74	X		
266	D2 P0	82	0,03		89	19	69	42	20	10	9	21	47	33	5	79	X		
267	D2 P0	12	0,01		94	7	72	31	16	14	10	27	59	33	26	79	X		
268	D2 P0	12	0,01		94	7	85	49	22	32	17	39	41	27	18	70	X		
269	D2 P0	19	0,01		81	37	84	32	25	21	14	22	53	45	17	66	X	X	
270	D2 P0	12	0,01		93	46	90	44	21	19	14	37	41	36	12	79	X	X	
271	D2 P0	12	0,01		87	27	77	35	17	21	14	31	43	48	28	66	X		
272	D2 P0	23	0,01		91	19	84	37	16	25	15	14	43	46	19	79	X		
273	D2 P0	12	0,01		79	38	87	26	18	22	10	18	62	38	29	64	X	X	
274	D2 P0	12	0,01		50	35	84	46	36	48	33	31	62	39	31	43	X		
275	D2 P0	15	0,02		81	37	84	39	26	30	18	21	41	38	18	70	X	X	
276	D2 P0	12	0,01		89	26	71	30	19	16	13	7	53	35	22	76	X		
277	D2 P0	12	0,01	X	89	19	71	36	16	22	12	18	43	35	13	79	X		
278	D2 P0	18	0,01		89	29	81	55	32	42	41	48	41	39	14	61	X		
279	D2 P0	12	0,01		93	29	84	31	15	18	19	16	43	36	17	79	X		
280	D2 P0	12	0		98	18	78	35	12	15	14	29	41	36	10	74	X		
281	D2 P0	12	0,01		87	29	57	26	14	15	6	21	52	38	13	84	X		
282	D2 P0	12	0,01		96	11	53	31	14	15	21	16	43	48	28	66	X		
283	D2 P0	12	0,01		93	27	75	38	20	30	16	37	43	47	23	70	X		
284	D2 P0	89	0,02		79	17	87	74	64	57	56	55	62	26	33	38	X		diab. N.
285	D2 P0	12	0,01		91	37	81	43	23	22	21	38	46	31	10	62	X	X	
286	D2 P0	12	0,01		94	8	48	21	18	25	16	27	25	54	15	79	X		
287	D2 P0	12	0,01		91	36	50	19	20	21	18	40	43	43	13	71	X	X	
288	D2 P0	12	0,01		94	7	58	17	14	6	10	16	43	43	18	71	X		
289	D2 P0	15	0,01		94	8	54	55	38	36	43	41	40	31	9	61	X		
290	D2 P0	12	0,01		94	17	73	49	34	30	34	38	31	39	24	70	X		
291	D2 P0	12	0,01		98	0	65	36	20	20	19	23	53	44	9	60	X		
292	D2 P0	12	0,01		46	65	87	35	32	40	16	32	67	46	30	69	X		
293	D2 P0	24	0,01		27	64	83	37	38	45	32	25	77	46	44	43	X		
294	D2 P0	39	0,03		77	16	70	31	28	38	22	26	67	36	28	56	X		
295	D2 P0	12	0,01		79	47	63	21	14	27	7	18	33	31	23	79	X	X	
296	D2 P0	27	0,03		70	26	87	36	17	30	18	19	38	42	23	74	X		
297	D2 P0	12	0,01	X	86	28	62	21	9	18	4	29	48	39	19	76	X		
298	D2 P0	12	0,01		84	20	71	19	7	29	11	20	38	35	19	79	X		
299	D2 P0	12	0,01		91	29	62	23	8	16	6	16	38	44	23	79	X		
300	D2 P0	33	0,01		77	27	78	20	11	25	9	33	48	36	19	70	X		
301	D2 P0	13	0,02	X	84	38	67	24	8	2	3	16	38	39	19	79	X	X	
302	D2 P0	12	0,01	X	77	36	80	24	20	23	9	26	48	31	13	74	X	X	
303	D2 P0	12	0,01		93	11	62	15	9	20	2	23	48	39	13	75	X		
304	D2 P0	12	0,01		46	47	89	34	30	46	27	26	67	39	32	47	X		

Fortsetzung folgende Seite

Probe		Eigenschaften			Musterübereinstimmungen (%)										Diagnosen			
Nr.	Gruppe	A/K	U-Alb	DiRe	QC	D1	D2	Nep allg	DN	FSGS	MNGN	MCD	MCD	D	D	Nephropathie		
		mg/mg	mg/l						diff	diff	diff	diff	I	II				
305	D2 P0	12	0,01		87	29	41	7	6	16	-1	17	38	39	13	84		
306	D2 P0	12	0,01		84	38	84	22	14	13	8	25	38	35	18	84	X	X
307	D2 P0	12	0,01		72	29	71	26	12	19	11	20	38	31	26	84	X	X
308	D2 P0	12	0,01		62	37	78	36	36	38	26	25	53	42	21	48	X	X
309	D2 P0	12	0,01	X	94	24	49	34	11	14	9	47	48	40	13	84	X	X
310	D2 P0	12	0,01		74	46	92	38	24	25	18	29	49	34	39	70	X	X
311	D2 P0	12	0,01		50	100	78	54	49	64	37	51	72	55	40	35	!	
312	D2 P0	12	0,01		96	19	49	16	12	11	10	22	38	33	25	75		X
313	D2 P0	12	0,01	X	87	36	43	17	8	18	11	28	38	39	13	84	X	
314	D2 P0	12	0,01		48	62	73	25	31	38	22	26	67	38	38	43	!	
315	D2 P0	12	0,01		67	28	66	18	21	10	3	8	48	31	17	74		X
316	D2 P0	12	0,01		81	36	83	26	13	25	12	15	43	42	25	79	X	X
317	D2 P0	12	0,01		93	19	58	23	5	21	10	23	38	31	19	84		X
318	D2 P0	12	0,01	X	96	7	40	21	8	14	9	32	38	35	28	83		
319	D2 P0	12	0,01		37	64	79	44	45	55	36	39	72	55	40	43	!	
320	D2 P0	12	0,01		81	65	25	32	15	19	15	36	38	47	25	74	X	
321	D2 P0	12	0,01	X	86	38	45	17	5	17	6	15	38	35	30	84	X	
322	D2 P0	12	0,01		81	25	31	16	5	5	2	29	48	31	22	84		
323	D2 P0	12	0,01		82	16	60	22	9	20	14	18	38	31	31	74		X
324	D2 P0	12	0,01	X	87	19	58	19	10	21	11	18	58	31	22	75		X
325	D2 P0	12	0,01		79	29	24	10	6	13	-1	19	38	38	13	84		
326	D2 P0	12	0,01		93	25	36	14	8	6	5	24	38	36	22	84		
327	D2 P0	12	0,01		41	55	79	36	38	38	20	25	77	43	27	43	!	
328	D2 P0	12	0,01	X	36	63	76	31	36	45	23	31	77	38	27	39	!	
329	D2 P0	12	0,01		89	27	79	25	13	19	9	15	38	37	26	74		X
330	D2 P0	12	0,01		63	26	93	26	16	23	11	14	48	34	13	74	X	X
331	D2 P0	12	0,01		84	47	42	14	13	22	6	19	48	36	21	79	X	
332	D2 P0	12	0,01	X	68	37	76	21	21	19	5	15	38	34	25	79	X	X
333	D2 P0	12	0,01		93	26	41	14	7	6	-1	12	38	31	13	79		
334	D2 P0	12	0,01		51	61	78	44	30	35	20	37	83	36	28	61	X	X
335	D2 P0	12	0,01		43	64	87	31	27	32	20	18	48	43	25	75	!	
336	D2 P0	12	0,01	X	60	46	87	42	41	44	30	34	73	33	29	48	X	X
337	D2 P0	12	0,01		98	24	41	25	7	11	10	36	33	44	13	90		
338	D2 P1	138	0,05		79	17	60	40	42	31	37	39	89	33	31	60		X
339	D2 P1	92	0,06		79	17	70	73	63	44	50	58	91	24	16	38		
340	D2 P1	112	0,06		84	26	56	49	43	27	33	44	72	26	20	74	X	
341	D2 P1	25	0,07		74	36	71	41	35	37	20	42	56	43	19	70	X	X
342	D2 P1	110	0,07		91	35	74	58	45	37	33	43	64	23	9	56	X	X
343	D2 P1	99	0,06	X	93	20	81	86	84	73	89	69	34	27	30	8	X	
344	D2 P1	157	0,05		74	19	81	83	72	77	85	70	58	37	35	21	X	
345	D2 P1	71	0,06		82	29	97	71	60	41	44	44	61	18	17	38	X	
346	D2 P1	42	0,05		100	10	58	75	62	74	81	79	47	20	22	25	X	
347	D2 P1	31	0,04		89	7	61	58	44	33	39	47	48	32	13	44	X	
348	D2 P1	44	0,04		77	26	77	45	35	30	28	24	72	30	34	60	X	
349	D2 P1	198	0,05		53	62	94	48	31	40	21	51	43	43	31	61	X	X
350	D2 P1	42	0,04		98	7	48	36	24	37	19	41	25	42	24	61	X	
351	D2 P2	170	0,17		89	11	74	41	40	27	22	43	73	31	9	66	X	
352	D2 P2	1450	1,62	X	62	38	69	72	67	64	53	41	84	43	30	30	X	X
353	D2 P2	431	0,63		72	28	52	51	47	41	36	33	83	37	27	56	X	
354	D2 P2	4590	3,07		63	10	70	71	64	63	46	53	84	40	39	29	X	
355	D2 P2	223	0,25		77	28	78	72	66	60	50	53	91	30	16	29	X	
356	D2 P2	103	0,28	X	77	15	88	80	72	54	46	53	87	27	14	34	X	
357	D2 P2	182	0,16		86	7	59	79	75	52	66	68	91	17	18	26	X	
358	D2 P2	110	0,15		91	8	62	85	75	51	72	58	67	6	12	35	X	
359	D2 P2	466	1,2		82	0	58	96	90	69	95	63	78	16	39	8	X	
360	D2 P2	283	1,35		51	37	79	92	89	70	76	63	78	32	49	4	X	X
361	D2 P2	1990	3,48		51	36	77	87	85	93	82	70	58	57	59	5	X	X
362	D2 P2	131	0,19		62	38	74	75	73	69	62	51	58	34	31	25	X	X
363	D2 P2	596	0,48		48	35	100	62	52	40	39	44	81	26	-1	51	!	
364	D2 P2	2020	1,21		39	52	94	83	69	72	66	58	80	33	25	25	!	
365	D2 P2	12	0,1		87	43	66	41	24	28	33	43	45	34	10	61	X	X
366	D2 P2	382	0,29		77	27	87	79	75	40	65	56	87	6	13	34	X	
367	D2 P2	175	0,12		65	26	84	89	83	70	77	58	91	14	21	17	X	
368	D2 P2	115	0,2		74	17	81	55	53	39	32	49	87	39	16	47	X	
369	D2 P2	243	0,27		58	37	90	78	75	66	62	75	91	30	16	39	X	X
370	D2 P2	286	0,46	X	65	37	100	98	97	88	90	63	83	23	52	3	X	X
371	D2 P2	221	0,54		56	54	74	79	68	83	57	53	58	66	59	17	X	X
372	D2 P2	165	0,18		89	27	55	29	21	25	13	26	57	42	23	66	X	
373	D2 P2	126	0,1		81	17	73	88	81	68	59	68	83	8	13	24	X	
374	D2 P3	-	-	X	63	56	71	95	82	78	88	64	84	33	69	4	X	X
375	D2 P3	-	-		58	47	89	87	79	84	68	79	51	58	38	24	X	X
376	D2 P3	-	-	X	67	24	74	90	87	82	80	70	64	35	34	12	X	X
377	D2 P3	-	-	X	32	46	96	86	81	56	70	45	83	26	24	13	!	
378	D2 P3	-	-	X	60	30	68	89	82	75	72	65	84	47	58	13	X	
379	D2 P3	-	-	X	84	18	90	94	87	80	74	73	63	38	34	21	X	

Fortsetzung folgende Seite

Anhang I: Ergebnisse der Pattern-Analyse (Fortsetzung).

Probe Nr.	Gruppe	Eigenschaften			Musterübereinstimmungen (%)										Diagnosen				
		A/K mg/mg	U-Alb mg/l	DiRe	QC	D1	D2	Nep allg	DN	FSGS	MNGN	MCD	MCD	MCD	MCD	D I	D II	Nephropathie	
380	D2 P3	-	-	X	58	46	73	91	88	86	81	63	63	23	38	8	X	X	diab. N.
381	D2 P3	-	-	X	67	10	83	91	87	90	78	68	80	42	58	12	X	X	diab. N.
382	D2 P3	-	-	X	65	46	66	94	77	91	76	72	63	48	70	12	X	X	diab. N./MNGN
383	D2 P3	-	-	-	65	56	79	92	77	86	72	78	66	48	47	13	X	X	diab. N.
384	D2 P3	-	-	X	84	7	65	69	67	52	60	51	91	18	19	38	X	X	diab. N.
385	D2 P3	-	-	X	63	28	87	85	82	80	81	57	56	47	38	13	X	X	diab. N.
386	D2 P3	-	-	X	68	56	68	89	73	94	73	61	68	83	47	26	X	X	FSGS
387	D2 P3	-	-	X	62	57	78	94	88	85	87	54	70	20	44	13	X	X	diab. N.
388	D2 P3	-	-	X	70	45	81	83	74	58	54	49	81	15	17	34	X	X	diab. N.
389	D2 P3	-	-	-	72	39	80	96	87	79	81	68	74	17	25	13	X	X	diab. N.
390	D2 P3	-	-	X	62	21	80	85	91	75	88	61	74	15	13	17	X	X	diab. N.
391	D2 P3	-	-	X	74	26	81	89	78	68	68	70	83	6	21	34	X	X	diab. N.
392	D2 P3	-	-	X	81	17	74	91	79	100	87	65	43	31	58	13	X	X	MNGN
393	D2 P3	-	-	X	53	52	83	84	79	67	78	54	74	17	21	16	X	X	diab. N.
394	D2 P3	-	-	X	65	36	94	96	89	86	85	58	74	25	34	3	X	X	diab. N.
395	D2 P3	-	-	-	62	55	87	85	80	84	80	56	64	26	58	4	X	X	diab. N.
396	D2 P3	-	-	-	44	35	86	91	83	88	87	61	47	48	47	8			
397	FSGS	-	-	-	77	43	55	81	69	96	77	71	64	82	78	12	X	X	FSGS
398	FSGS	-	-	-	51	53	82	90	77	88	80	78	83	66	47	8	X	X	diab. N.
399	FSGS	-	-	-	75	47	93	92	84	88	80	63	72	56	49	17	X	X	diab. N.
400	FSGS	-	-	-	94	15	47	35	23	45	24	68	33	73	18	73	X	X	MCD
401	FSGS	-	-	-	94	27	6	15	9	33	12	29	33	73	17	74			
402	FSGS	-	-	-	65	53	61	88	82	100	83	85	72	61	64	5	X	X	diab. N.
403	FSGS	-	-	-	65	36	52	85	74	97	79	62	55	91	63	21	X	X	FSGS
404	FSGS	-	-	-	91	8	28	25	10	36	10	51	43	55	17	85			MCD
405	FSGS	-	-	-	96	16	47	86	76	87	85	70	53	72	58	8	X	X	FSGS
406	FSGS	-	-	-	72	27	76	93	78	80	83	55	80	56	50	12	X	X	diab. N.
407	MNGN	-	-	-	24	55	86	87	70	72	82	60	78	49	58	21			
408	MNGN	-	-	-	89	19	74	94	88	93	96	73	63	14	65	4	X	X	diab. N./MNGN
409	MNGN	-	-	-	56	47	76	93	79	89	91	65	72	35	89	0	X	X	diab. N./MNGN
410	MNGN	-	-	-	87	30	79	96	91	85	100	72	83	30	68	4	X	X	diab. N./MNGN
411	MNGN	-	-	-	68	10	45	92	83	93	94	55	55	54	74	13			MNGN
412	MNGN	-	-	-	77	0	52	79	77	83	88	71	72	64	80	23	X	X	diab. N./MNGN
413	MNGN	-	-	-	39	37	76	81	60	68	63	53	72	39	53	26			
414	MNGN	-	-	-	81	27	61	96	95	85	95	63	66	41	60	4	X	X	diab. N./MNGN
415	MNGN	-	-	-	79	10	55	91	86	80	79	89	78	37	68	33	X	X	diab. N./MNGN
416	MNGN	-	-	-	93	19	44	89	76	64	87	84	33	17	83	23			MNGN
417	MNGN	-	-	-	82	27	59	96	84	100	94	75	64	41	100	19	X	X	MNGN
418	MNGN	-	-	-	74	27	49	86	80	94	91	66	64	53	83	4	X	X	MNGN
419	MNGN	-	-	-	74	27	86	92	88	82	94	68	80	26	64	4	X	X	diab. N./MNGN
420	MNGN	-	-	-	84	27	46	96	88	83	90	81	64	42	89	10	X	X	MNGN
421	MNGN	-	-	-	91	44	52	94	90	90	100	78	55	26	100	14	X	X	MNGN
422	MNGN	-	-	-	91	0	25	75	75	63	85	65	68	30	89	13			MNGN
423	MNGN	-	-	-	94	26	11	53	43	60	59	78	35	57	51	77			MCD
424	MNGN	-	-	-	56	63	66	83	75	91	77	61	58	62	69	12	X	X	Nephro ???
425	MCD	-	-	-	74	11	75	90	77	89	76	78	53	40	47	21	X	X	diab. N./MNGN
426	MCD	-	-	-	75	39	69	50	43	35	27	64	69	46	17	77	X	X	MCD
427	MCD	-	-	-	94	33	5	9	16	21	14	49	33	54	23	95			
428	MCD	-	-	-	91	35	38	61	49	48	35	72	53	53	38	63	X	X	MCD
429	MCD	-	-	-	86	38	56	82	78	73	84	100	27	34	35	43	X	X	MCD
430	MCD	-	-	-	84	18	79	94	93	93	92	83	55	42	62	19	X	X	MNGN
431	MCD	-	-	-	84	19	26	20	8	23	5	43	33	48	18	85			
432	MCD	-	-	-	74	30	74	98	85	91	96	84	72	49	94	10	X	X	MNGN
433	MCD	-	-	-	93	0	49	53	25	41	30	70	43	45	30	100	X	X	MCD
434	MCD	-	-	-	98	8	16	66	46	48	65	72	49	32	19	80			MCD
435	MCD	-	-	-	89	33	18	31	22	29	24	53	33	57	26	100			MCD
436	MCD	-	-	-	94	8	18	62	47	55	66	90	43	33	39	76			MCD
437	MCD	-	-	-	96	0	34	61	67	61	70	74	43	24	34	55			MCD
438	MCD	-	-	-	91	25	3	5	7	16	16	38	33	44	17	100			
439	MCD	-	-	-	98	10	38	32	17	33	17	51	43	45	13	85			MCD

Erläuterungen: A/K = Albumin/Kreatinin-Quotient, soweit dieser bestimmt worden ist. U-Alb. = Urin-Albumin-Konzentration. DiRe = Diabetische Retinopathie (X=positiv). QC = Quality Control Pattern. D1 = Pattern Diabetes Typ I. D2 = Pattern Diabetes Typ II. Nep allg. = Pattern Nephropathie allgemein. DN = Pattern diabetische Nephropathie. FSGS = Pattern FSGS. MNGN = Pattern MNGN. MCD = Pattern MCD. Der Zusatz „diff“ bezeichnet die jeweiligen differenzialdiagnostischen Pattern. Diagnosen D I = Diabetes Typ I positiv diagnostiziert. D II = Diabetes Typ II positiv diagnostiziert. Nephropathie = spezifische Nephropathie positiv diagnostiziert. Zeilen, die unter Diagnose ein Ausrufungszeichen (!) führen, kennzeichnen Proben bei den das Kontrollpattern (QC) einen zu geringen Wert aufweisen (dort in kursiv dargestellt). Diese Proben wurden nicht weiter betrachtet.

Anhang II: Ergebnisse der Pattern-Analyse für die 104 „unbekannten“ Proben

Probe Nr.	Gruppe	Eigenschaften			QC	D1	D2	Nep allg	Musterübereinstimmungen (%)							MCD	Diagnosen	
		A/K mg/mg	U-Alb mg/l	DiRe					DN	FSGM	MNGN	MCD	DN	FSGM	MNGN		MCD	D
1	Kontrolle	-	-	-	70	17	65	44	36	50	27	58	52	47	25	67	X	
2	Kontrolle	-	-	-	56	36	58	48	38	39	29	66	63	61	34	68	X	
3	Kontrolle	-	-	-	63	27	58	67	64	63	59	79	58	32	48	46	X	Nephropathie
4	Kontrolle	-	-	-	77	37	64	51	28	45	24	61	52	56	17	75	X	
5	Kontrolle	-	-	-	81	26	60	41	31	26	17	51	42	40	31	77	X	
6	Kontrolle	-	-	-	74	8	65	51	28	36	25	45	52	43	41	67	X	
7	Kontrolle	-	-	-	79	47	58	63	41	57	29	75	42	53	21	73	X	MCD
8	Kontrolle	-	-	-	60	36	75	48	46	40	30	68	58	55	21	72	X	
9	Kontrolle	-	-	-	77	26	54	29	25	25	13	56	52	53	13	82	X	
10	Kontrolle	-	-	-	65	16	75	40	29	22	17	29	63	49	18	65	X	
11	Kontrolle	-	-	-	67	46	71	45	31	28	20	26	64	34	13	74	X	
12	Kontrolle	-	-	-	81	37	69	42	28	27	13	49	33	47	13	69	X	MCD
13	Kontrolle	-	-	-	84	30	42	68	57	58	56	68	50	51	49	40		
14	Kontrolle	-	-	-	84	7	56	38	28	32	17	59	52	57	31	80	X	
15	Kontrolle	-	-	-	48	46	74	46	41	41	22	31	78	54	32	47		
16	Kontrolle	-	-	-	72	18	59	45	27	42	27	42	63	53	30	71	X	
17	Kontrolle	-	-	-	74	38	48	35	24	28	13	49	52	48	36	79	X	
18	Kontrolle	-	-	-	53	43	75	43	37	35	14	45	63	43	35	77	X	
19	Kontrolle	-	-	-	58	65	65	41	41	35	33	36	63	56	35	46	X	
20	Kontrolle	-	-	-	77	38	50	32	25	28	14	60	52	53	31	81	X	
21	Kontrolle	-	-	-	82	16	44	23	20	23	5	55	52	52	26	84		
22	Kontrolle	-	-	-	81	17	48	38	28	33	18	66	44	49	34	76	X	
23	Kontrolle	-	-	-	68	11	55	54	40	51	47	63	69	24	50	58	X	
24	Kontrolle	-	-	-	87	7	19	26	21	22	5	39	52	43	32	76		
25	Kontrolle	-	-	-	79	24	72	69	57	51	42	56	82	22	26	38	X	diab. N.
26	Kontrolle	-	-	-	84	38	66	47	33	42	39	69	44	47	45	67	X	
27	Kontrolle	-	-	-	86	16	28	20	14	23	2	52	52	52	13	86		
28	Kontrolle	-	-	-	70	39	64	55	56	58	53	63	59	57	34	52	X	
29	Kontrolle	-	-	-	89	7	48	29	27	37	9	60	44	48	31	80	X	
30	Kontrolle	-	-	-	81	46	46	41	36	54	28	70	54	60	44	59	X	
31	Kontrolle	-	-	-	81	16	25	16	19	13	5	27	43	38	22	81		
32	Kontrolle	-	-	-	72	26	68	56	31	40	27	58	58	37	32	67	X	
33	Diabetiker	14	0,02		70	27	61	21	19	20	8	18	63	31	28	79	X	
34	Diabetiker	12	0,01		77	16	25	10	15	12	5	9	63	43	13	79		
35	Diabetiker	12	0,01		82	27	18	15	12	21	5	23	52	39	19	80		
36	Diabetiker	12	0,01		82	19	31	11	12	12	2	3	52	39	13	74		
37	Diabetiker	12	0,01	X	91	47	35	12	10	16	8	13	63	48	13	79	X	
38	Diabetiker	14	0,01		82	17	52	15	12	22	8	22	52	31	22	84	X	
39	Diabetiker	12	0,01		79	24	36	16	15	20	2	21	59	38	19	84		
40	Diabetiker	154	0,13		75	30	74	65	61	58	59	49	57	20	40	34	X	diab. N.
41	Diabetiker	12	0,01		81	36	9	7	12	16	2	14	63	35	25	84	X	
42	Diabetiker	21	0,01		84	36	51	25	18	31	12	27	49	33	19	70	X	
43	Diabetiker	12	0,01		87	7	35	11	9	23	7	16	42	38	27	79		
44	Diabetiker	12	0,01		84	36	16	12	13	15	2	20	63	35	28	84	X	
45	Diabetiker	21	0,01		91	36	26	22	17	29	10	34	49	40	28	76	X	
46	Diabetiker	12	0,01		86	16	7	8	10	9	2	9	43	31	19	80		
47	Diabetiker	12	0,01		81	28	18	9	9	6	6	9	62	31	28	78		
48	Diabetiker	19	0,01		77	7	19	16	12	13	5	16	72	37	28	78		
49	Diabetiker	45	0,02		84	27	52	40	35	23	23	43	65	18	23	57	X	
50	Diabetiker	12	0,01		89	24	42	21	18	35	13	48	49	36	13	89		
51	Diabetiker	12	0,01		81	17	42	12	15	20	4	16	42	39	30	79		
52	Diabetiker	551	0,72		62	29	80	54	42	45	33	43	90	20	31	43	X	diab. N.
53	Diabetiker	53	0,1	X	53	38	82	58	45	45	30	27	74	24	45	56	X	diab. N.
54	Diabetiker	136	0,1		60	29	81	44	38	35	23	31	74	21	27	56	X	
55	Diabetiker	68	0,13		51	17	77	50	46	40	24	38	90	28	27	38	X	
56	Diabetiker	59	0,03		82	19	57	53	40	38	36	42	75	17	27	49	X	
57	Diabetiker	12	0,01		77	7	45	25	16	28	11	25	63	35	22	76		
58	Diabetiker	254	0,22		75	27	65	79	78	70	83	73	49	34	54	9	X	Nephropathie
59	Diabetiker	34	0,02		81	26	27	17	17	9	2	17	52	31	22	80		
60	Diabetiker	12	0,01		79	19	34	14	17	16	5	20	63	31	13	70		
61	Diabetiker	30	0,02		79	25	55	29	23	25	13	25	72	37	18	56	X	
62	Diabetiker	29	0,02		81	16	32	29	22	26	30	35	63	28	41	62		
63	Diabetiker	12	0,01		72	16	48	23	21	23	10	36	63	38	26	79	X	
64	Diabetiker	12	0,01		63	28	28	10	16	10	9	16	63	35	32	79		
65	Diabetiker	12	0,01		77	24	11	16	18	17	13	39	63	36	32	81		
66	Diabetiker	49	0,1		65	27	58	45	43	38	28	47	78	22	37	42	X	
67	Diabetiker	49	0,08		77	16	58	46	38	42	26	54	58	26	37	57	X	
68	Diabetiker	12	0,01	X	68	16	57	30	21	24	5	10	52	42	22	69	X	
69	Diabetiker	12	0,01		79	16	42	22	13	14	7	24	52	41	26	75		
70	Diabetiker	12	0,01		79	8	36	34	27	32	27	44	63	18	30	66		
71	Diabetiker	35	0,02	X	77	27	26	16	21	9	7	11	64	31	38	75		
72	Diabetiker	12	0,01	X	77	0	36	31	21	18	16	48	63	37	36	81		
73	Diabetiker	12	0,01		63	19	45	20	18	9	5	11	52	40	31	79		
74	Diabetiker	12	0,01		75	16	13	16	18	18	11	25	52	38	26	79		
75	Diabetiker	12	0,01		68	28	36	15	16	24	5	15	63	31	32	79		
76	Diabetiker	12	0,01		79	20	17	19	17	17	9	22	63	35	31	88		

Fortsetzung folgende Seite

Anhang II: Ergebnisse der Pattern-Analyse (Fortsetzung).

Probe Nr.	Gruppe	Eigenschaften			Musterübereinstimmungen (%)											Diagnosen			
		A/K mg/mg	U-Alb mg/l	DiRe	QC	D1	D2	Nep allg	DN	FSGS	MNGN	MCD	DN diff	FSGS diff	MNGN diff	MCD diff	D I	D II	Nephropathie
77	Diabetiker	69	0,03		77	37	39	27	22	20	15	26	75	25	30	75	X		
78	Diabetiker	12	0,01		84	29	16	11	16	23	14	20	63	40	23	80			
79	Diabetiker	12	0,01		68	36	33	17	19	20	12	11	63	36	41	75	X		
80	Diabetiker	12	0,01		63	20	47	26	17	19	12	7	52	39	30	75		X	
81	Diabetiker	12	0,01		53	26	59	23	24	26	12	19	72	51	26	69		X	
82	Diabetiker	12	0,01		86	18	36	22	18	12	8	26	42	39	17	84			
83	Diabetiker	226	0,2		58	27	86	84	72	78	73	68	75	18	43	20		X	diab. N.
84	Diabetiker	537	0,7		54	28	81	78	66	81	68	74	61	42	44	13		X	diab. N.
85	Diabetiker	12	0,01		79	45	66	51	35	41	38	52	61	40	35	53	X	X	
86	Diabetiker	12	0,01		84	16	19	32	15	12	5	32	52	31	28	81			
87	Diabetiker	12	0,01		79	46	57	47	24	32	26	43	52	48	31	79	X	X	
88	Diabetiker	15	0,01		86	28	49	44	33	47	40	53	69	36	47	62		X	
89	Diabetiker	12	0,01	X	79	8	71	59	40	40	27	64	81	28	18	71		X	
90	Diabetiker	12	0,01		72	38	65	56	42	48	39	51	66	42	22	61	X	X	
91	Diabetiker	95	0,05		79	39	37	58	52	58	47	79	60	34	30	58	X		
92	Diabetiker	12	0,01		72	16	62	35	32	19	16	20	69	34	17	74		X	
93	Diabetiker	12	0,01		86	16	30	25	18	15	11	7	58	35	13	71			
94	Diabetiker	12	0,01		77	15	55	21	16	18	11	14	63	43	13	74		X	
95	Diabetiker	12	0,01		72	25	53	33	24	23	22	23	52	53	27	79		X	
96	Diabetiker	12	0,01		68	25	68	51	36	37	25	35	72	45	23	55		X	
97	Diabetiker	12	0,01		82	24	39	28	25	25	7	25	63	39	42	79			
98	Diabetiker	12	0,01		81	8	52	41	18	36	13	44	52	48	22	74		X	
99	Diabetiker	27	0,02		81	26	46	58	51	54	47	71	54	50	48	57	X		Nephropathie
100	Diabetiker	12	0,01		86	7	40	25	18	20	14	38	42	56	13	79			
101	Diabetiker	12	0,01		75	8	42	35	23	25	16	33	42	42	26	74			
102	Diabetiker	12	0,01		81	17	55	23	14	14	17	29	63	36	26	75		X	
103	Diabetiker	12	0,01		84	26	45	31	24	25	14	44	63	40	13	74			
104	Diabetiker	12	0,01		72	34	62	21	16	11	13	20	52	42	31	74	X	X	

Erläuterungen: A/K = Albumin/Kreatinin-Quotient, soweit dieser bestimmt worden ist. U-Alb. = Urin-Albumin-Konzentration. DiRe = Diabetische Retinopathie (X=positiv). QC = Quality Control Pattern. D1 = Pattern Diabetes Typ I. D2 = Pattern Diabetes Typ II. Nep alg. = Pattern Nephropathie allgemein. DN = Pattern diabetische Nephropathie. FSGS = Pattern FSGS. MNGN = Pattern MNGN. MCD = Pattern MCD. Der Zusatz „diff“ bezeichnet die jeweiligen differenzialdiagnostischen Pattern. Diagnosen D I = Diabetes Typ I positiv diagnostiziert. D II = Diabetes Typ II positiv diagnostiziert. Nephropathie = spezifische Nephropathie positiv diagnostiziert. Zeilen, die unter Diagnose ein Ausrufungszeichen (!) führen, kennzeichnen Proben bei den das Kontrollpattern (QC) einen zu geringen Wert aufweisen. Diese Proben wurden nicht weiter betrachtet.

Tabellarischer Lebenslauf

Thorsten Kaiser
 Bollnäser Str. 15a
 30629 Hannover
 geb. am 11. Mai 1968 in Unna
 deutsch
 verheiratet, 1 Tochter

Schulbildung

1974 - 1978	Grundschule in Unna
1978 - 1987	Geschwister-Scholl-Gymnasium in Unna Abschluss: Abitur

Zivildienst

12/1987 - 07/1989	Zivildienst beim Caritasverband in Unna
-------------------	---

Hochschulausbildung

12/1989 - 07/1997	Studium der Biotechnologie an der Technischen Universität Berlin Abschluss: Diplom-Ingenieur Biotechnologie, Note "gut"
03/1996 - 02/1997	Diplomarbeit bei der Bioverfahrenstechnik GbR Thema: Etablierung einer Reinigungsstrategie für monoclonale IgG der Subklasse 1 aus einem biotechnischen Produktionsprozess, Note "sehr gut"
03/2001 – 03/2002	Doktorand am Fraunhofer Institut Toxikologie und Aerosolforschung, Abteilung Pharmaforschung und medizinische Biotechnologie, in Hannover, Arbeitsgruppe „Proteomics“
seit 04/2002	Weiterführung der Doktorarbeit bei der mosaiques diagnostics GmbH in Hannover, Thema: „Proteomuntersuchungen von Körperflüssigkeiten mittels onlinegekoppelter Kapillarelektrophorese – Massenspektrometrie als Routineverfahren in der Diagnostik“

Berufserfahrung

04/1990 - 06/1990	Praktikum bei der Schering AG im mikrobiologischen Produktionsbetrieb des Werkes Bergkamen
03/1991 - 04/1991	Aushilfsarbeit in der Mikrobiologischen Produktion und Aufarbeitung bei der Schering AG, Werk Bergkamen
02/1994 - 04/1994 u.	Praktikum bei der Schering AG in der Abteilung

08/1994 - 09/1994	Biologischer Umweltschutz in den Werken Berlin-Charlottenburg und Berlin-Wedding
03/1995 - 02/1996	Studentische Hilfskraft (Tutor) am Institut für Bioverfahrenstechnik der TU Berlin; Mitarbeit am DFG Forschungsprojekt "Grundlagenuntersuchungen über Eigenschaften und Einsatz-Möglichkeiten von Polyelektrolytmikrokapseln in der Biotechnik"
09/1997 - 12/1999	Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Bioverfahrenstechnik GbR in Berlin Zuständig für Produktion und Aufarbeitung rekombinanter Proteine aus Zellkulturen und Mikroorganismen; Entwicklung, Etablierung und Markteinführung eines "ready-to-use" Zytotoxizitätstestsystems (Vorstellung auf der Biotechnica '99, Sieger beim Wettbewerb "Teltow-Fläming Innovativ '99")
01/2000 – 02/2001	Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Alpha Bioverfahrenstechnik GmbH in Luckenwalde Leiter der Produktion "Zellkulturtechnik" Leiter des Projektes "AlphaTox" Mitarbeit an den Arbeiten zum anstehenden GMP-Audit

Weiterbildung

12/1999 - 05/2000	6 teiliges, modulares Seminar, jeweils 1 Tag, zum Thema Pharma-GMP beim Berufsbildungszentrum Chemie der Nordostchemie in Berlin
05/2000	4 tägiges Seminar „Patentierung in der Biotechnologie – Rechtlicher Schutz von Technologieentwicklungen“ beim Biotechnologieverbund Berlin-Brandenburg
03/2001	3 tägiger Kurs „2D Elektrophorese“ beim Institut für Biologie und Medizin in Köln

Besondere Kenntnisse

EDV
sehr gute PC-Anwender- und Programmierkenntnisse u.a. Word, Excel, Access, FrontPage, PowerPoint, Project, Lotus Word Pro, Microcal Origin, PDQuest, Pascal, Visual Basic

Fremdsprachen
Englisch - fließend in Wort und Schrift

Publikationsliste

Thorsten Kaiser
Bollnäser Str. 15a
30629 Hannover

Wissenschaftliche Publikationen

Kaiser, T., Herrmann, A., Kielstein, J.T., Wittke, S., Bartel, S., Krebs, R., Hausadel, F., Hillmann, M., Golovko, I., Koester, P., Haller, H., Weissinger, E.M., Fliser, D., Mischak, H.

Capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry to establish polypeptide patterns in dialysis fluids

Journal of Chromatography A, 1013 (2003) 1-2: 157-171

Kaiser, T., Kamal, H., Rank, A., Kolb, H.J., Holler, E., Ganser, A., Hertenstein, B., Mischak, H., Weissinger, E.M.

Proteomics applied to the follow up of patients after allogeneic stem cell transplantation

Blood, in press, published online 30.04.2004

Kaiser, T., Wittke, S., Just, I., Krebs, R., Bartel, S., Fliser, D., Mischak, H., Weissinger, E.M.

Capillary electrophoresis coupled to mass spectrometer for automated and robust polypeptide determination in body fluids for clinical use

Electrophoresis (2004), in press

Wittke, S., Fliser, D., Haubitz, M., Bartel, S., Krebs, R., Hausadel, F., Golovko, I., Koester, P., Haller, H., Kaiser, T., Mischak, H., Weissinger, E.M.

Determination of peptides and proteins in human urine with capillary electrophoresis – mass spectrometry, a suitable tool for the establishment of new diagnostic markers

Journal of Chromatography A, 1013 (2003) 1-2: 173-181

Wittke, S., Kaiser, T., Mischak, H.

Differential polypeptide display: The search for the elusive target

Journal of Chromatography B, 803 (2004), 1: 17-26

Weissinger, E.M., Wittke, S., Kaiser, T., Haller, H., Bartel, S., Krebs, R., Golovko, I., Haubitz, M., Hecker, H., Fliser, D., Mischak, H.

Proteomic patterns established with capillary electrophoresis and mass spectrometry for diagnostic purposes

Kidney International, 65 (2004), 6: 2426-2434

Neuhoff N., Kaiser, T., Wittke, S., Krebs, R., Pitt, A., Burchard, A., Sundmacher, A., Schlegelberger, B., Kolch, W., Mischak, H.

Mass spectrometry for the detection of differentially expressed proteins: a comparison of surface enhanced laser desorption/ionization and capillary electrophoresis/mass spectrometry

Rapid Communication Mass Spectrometry, 18 (2004), 2: 149-156

Meier, M., Kaiser, T., Hermann, A., Knueppel, S., Hillmann, M., Koester, P., Danne, T., Haller, H., Fliser, D., Mischak, H.

Identification of urinary protein pattern in Type 1 diabetic adolescents with early diabetic nephropathy by a novel combined proteome analysis

Manuscript submitted.

Mischak, H., Kaiser, T., Hillmann, M., Wittke, S., Herrmann, A., Knueppel, S., Haller, H., Fliser, D.

Proteomic analysis for early detection of diabetic renal damage

Manuscript submitted.

Poster

Wittke, S., Bartel, S., Golovko, I., Haller, H., Haubitz, M., Hausadel, F., Kaiser, T., Krebs, R., Mischak, H., Weissinger, E.M.

Proteomics for clinical diagnostics and establishment of new markers and therapeutic targets: 1. Determination of proteins and peptides in urine with CE-MS.

22nd International Symposium on the Separation of Proteins, Peptides and Polynucleotides, Heidelberg, November 2002

Kaiser, T., Bartel, S., Golovko, I., Haller, H., Koester, P., Krebs, R., Mischak, H., Weissinger, E.M., Wittke, S.

Proteomics for clinical diagnostics and establishment of new markers and therapeutic targets: 2. Determination of proteins and peptides in dialysate with CE-MS.

22nd International Symposium on the Separation of Proteins, Peptides and Polynucleotides, Heidelberg, November 2002

Weissinger, E.M., Wittke, S., Kaiser, T., Fliser, D., Bartel, S., Krebs, R., Hausadel, F., Hillmann, M., Golovko, I., Koester, P., Haubitz, M., Mischak, H., Haller, H.

Proteomic patterns in urine of patients with primary renal disease

World Congress of Nephrology, Berlin 2003

Kaiser, T., Herrmann, A., Bartel, S., Golovko, I., Haller, H., Haubitz, M., Hausadel, F., Hillmann, M., Koester, P., Krebs, R., Weissinger, E.M., Wittke, S., Fliser, D., Mischak, H.

Proteom Analysis of Dialysis Fluids: Towards the Identification of Uremic Toxins

World Congress of Nephrology, Berlin 2003

Hillmann, M., Kaiser, T., Mischak, H.

Optimierung der Präparation von Serumproben für die CE-MS-Messung

12. Deutscher MTA Kongress, Berlin 2003

Weitere Publikationen

Kaiser, T.

Zellkulturtest statt Tierversuch

Life Science Technologien, Vogel Verlag, Februar 2000

Kaiser, T.

Ready-to-use für die Zytotoxizitätsbestimmung

Laborpraxis, April 2000

Referent: Prof. Dr. B. Otto

Korreferent: Prof. Dr. H. Mischak

Tag der Promotion: 27. August 2004