

# **PROTEOMICS und das Dia-Pat-Verfahren**

**in der Diagnostik renaler Erkrankungen**

**Dissertation**

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

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Nora-Maria Müller**

**geboren am 31.05.1981 in Frankfurt am Main**

**Gutachter:**

1. ....

2. ....

3. ....

Tag der öffentlichen Verteidigung: .....

## Abkürzungsverzeichnis

24-h-SU	24-Stunden Sammelurin
Alb	Albumin
benign.	benigne = gutartig
DD	Differential Diagnose
diab./diabet.	diabetisch
DNP	Diabetische Nephropathie
DPNI	Dialysepflichtige Niereninsuffizienz
dysm.	dysmorph
Erys	Erythrozyten (rote Blutkörperchen)
extrakap.	extrakapillär
extrakapill.	extrakapillär
FSGS	fokal-segmentale Glomerulosklerose
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GN	Glomerulonephritis
GP	Glomerulopathie
granul.	Granulierte
GS	Glomerulosklerose
hyal.	hyaline
IDDM	Insulin-dependent-diabetes-mellitus
IgAN	IgA-Nephritis
interst.	interstitiell(e)
k.A.	keine Angaben
Kr.Clear.	Kreatininclearance
Leukos	Leukozyten (weiße Blutkörperchen)
LN	Lupusnephritis
m/w	männlich/weiblich
MCG	Minimal-Change-Glomerulonephritis
membr.	membranös
MGN	Membranöse Glomerulonephritis
nekrot.	nekrotisch / nekrotisierend
NI	Niereninsuffizienz
nodul.	nodulär

NP	Nephropathie
NS	Nephrosklerose
NTX	Nierentransplantation
pathol.	pathologisch
prolif.	proliferierend / proliferativ
PU	Proteinurie
RPNG	rapid-progressiv Nephrosklerose/ rasch-progressive
RR	Blutdruck
segm.	segmental
sog.	sogenannte/sogenanntes
tubuloint.	tubulointerstitiell(e)
TX	steht für Transplantat / Transplantations-...
TX-GP	Transplantatglomerulopathie
Z.n.	Zustand nach

## **Inhaltsverzeichnis:**

Abkürzungsverzeichnis .....	3
Inhaltsverzeichnis:.....	5
1. Zusammenfassung.....	7
2. Einleitung .....	9
2.1 Inzidenz und Epidemiologie chronischer Nierenerkrankungen.....	9
2.2 Die Niere und ihre physiologischen Funktionen.....	10
2.3 Erkrankungen der Niere .....	11
2.3.1 Glomerulonephritiden (GN).....	11
2.3.2 Diabetische Nephropathie (DNP).....	15
2.4 Diagnostische Verfahren bei renalen Erkrankungen.....	16
2.4.1 Urindiagnostik.....	16
2.4.2 Serumdiagnostik.....	19
2.4.3 Bildgebende Verfahren .....	20
2.4.4 Die Nierenbiopsie.....	21
2.5 Proteomics und das DiaPat-Verfahren .....	24
3. Ziele / Fragestellungen der Arbeit.....	28
4. Material und Methoden .....	29
4.1 Patienten .....	29
4.2 Urin und bioptisches Material .....	29
4.3 Analyse der Urinproben mit dem DiaPat-Verfahren.....	30
4.4 Statistische Auswertung .....	34
5. Ergebnisse .....	37
6. Diskussion .....	47

6.1 Interpretation der statistischen Auswertung.....	49
6.2 Diskussion der Ergebnisse .....	50
6.3 Schlussfolgerung .....	63
7. Literaturverzeichnis.....	66
8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	72
Anhang .....	73
Danksagung .....	84
Ehrenwörtliche Erklärung .....	85
Lebenslauf .....	86

## 1. Zusammenfassung

Die Anzahl von Menschen mit chronischen Nierenerkrankungen und Patienten, die eine Nierenersatztherapie benötigen, steigt weltweit kontinuierlich an. Verantwortlich hierfür sind vor allem die Glomerulonephritis, die diabetische Nephropathie und hyperten-vaskulären Nierenerkrankungen. Da die meisten chronischen nephrologischen Erkrankungen keine Frühsymptome zeigen, werden sie häufig erst in einem späten Stadium entdeckt werden, wenn bereits Spätschäden, insbesondere eine chronische Niereninsuffizienz bestehen. Um die definitive, insbesondere die histologische, Diagnose der Nierenerkrankungen stellen zu können, ist eine Nierenbiopsie bisher unumgänglich, ein invasiver Eingriff, welcher für den Patienten ein nicht unerhebliches Risiko birgt.

Ein grosse Herausforderung ist daher die Entwicklung nicht-invasiver diagnostischer Methoden zur Früherkennung und Diagnosesicherung von Nierenerkrankungen.

Eine neue Möglichkeit stellt das DiaPat-Verfahren (von **diagnostic-pattern**, diagnostisches Muster) dar. Auf dem Boden der Proteomanalyse ist es mit dieser Methode gelungen, schnell und reproduzierbar die Proteinzusammensetzung im Urin (und anderen Körperflüssigkeiten) zu bestimmen und anhand des spezifischen Proteinmusters zwischen Urinproben gesunder Probanden und Patienten mit einer nephrologischen Erkrankung zu unterscheiden. Das Prinzip des neuen Verfahrens beruht auf der Kopplung einer kapillarelektrophoretischen Polypeptidtrennung mit einer anschließenden Massenspektrometrie.

Die kapillarelektrophoretisch getrennten Proteine werden elektrisch aufgeladen und danach direkt (online) in ein Massenspektrometer überführt, wo sie anhand ihrer Fluggeschwindigkeit analysiert und identifiziert werden. Die dabei aufgezeichneten Signale werden in einem Computer mit einer speziell entwickelten Software (MosaiquesVisu-Software) analysiert und in zwei- oder dreidimensionaler Abbildung als spezifische „Muster“ dargestellt.

Ziel dieser Arbeit war es, die mit dem DiaPat-Verfahren, einer in Hannover entwickelten nicht-invasiven Methode zur frühen Diagnostik renaler Erkrankungen, erhaltenen Ergebnisse mit denen einer Nierenbiopsie zu vergleichen, um eine Aussage darüber treffen zu können, in wie fern diese Methode in Exaktheit und Zuverlässigkeit der Diagnostik renaler Erkrankungen mit dem Goldstandard der Nierenbiopsie übereinstimmt und damit die grosse Hoffnung der Nephrologen, die Nierenbiopsie durch dieses nicht-invasive Verfahren ersetzen zu können, erfüllt werden kann.

In dieser Arbeit wurden die Ergebnisse der histologischen Untersuchung von Nierenbiopsien von Patienten mit chronischen nephrologischen Erkrankungen mit den Diagnosen verglichen, welche mit Hilfe des DiaPat-Verfahrens durch Proteomanalyse der Urinproben ermittelt wurden. Es wurden die Daten von insgesamt 78 Patienten ausgewertet (50 Männer und 28 Frauen im Alter von 19 bis 82 Jahren, davon 11 Patienten nach Nierentransplantation) die an folgenden chronischen Nephropathien litten: IgA-Nephritis (n = 32), fokal-segmentale Glomerulosklerose (n = 20), membranöse Glomerulonephritis (n = 9), Minimal-Change-Glomerulonephritis (n = 3), Lupusnephritis (n = 7), Transplantatglomerulopathie (n = 2) und benigne Nephrosklerose (n = 2). Hierbei waren teilweise einem Patienten mehr als eine Diagnose zugeordnet. Bei allen Patienten wurde zwischen 2001 und 2003 eine Nierenbiopsie zur Abklärung einer klinisch manifesten renoparenchymatösen Erkrankung durchgeführt. Von den Patienten wurde zeitnah der Biopsie eine Urinprobe gewonnen, die in Hannover mit dem DiaPat-Verfahren untersucht wurde.

Es konnte gezeigt werden, dass mit fast 100%iger Wahrscheinlichkeit eine gesunde von einer pathologischen Urinprobe unterschieden werden kann (48 / 52 pathologische Proben wurden als pathologisch erkannt, Sensitivität 92,3 % und Spezifität 100 %). Die einzelnen Erkrankungen konnten nur teilweise korrekt diagnostiziert werden.

Die besten Ergebnisse wurden für die IgA-Nephritis erzielt: 24 / 29 Proben wurden richtig erkannt (Sensitivität 82,8 %, Spezifität 64,0 %). Für die fokal-segmentale Glomerulosklerose betrug die Erkennungsrate 11 / 18 (Sensitivität und Spezifität je 61,1 %), für die membranöse Glomerulonephritis 2 / 9 (Sensitivität 22,2 %, Spezifität 100 %). Die Minimal-Change-Nephritis wurde nicht erkannt, (Sensitivität 0 %, Spezifität 100 %), ebenso wie die Lupusnephritis, die benigne Nephrosklerose und die Transplantatglomerulopathie. Zum Zeitpunkt der Studie bestand für diese drei Erkrankungen noch kein spezifisches Proteinmuster.

Die Ergebnisse zeigen, dass die exakte und zuverlässige Differenzierung der verschiedenen chronischen Nierenerkrankungen durch das neue Verfahren zum Zeitpunkt dieser Probenauswertung noch nicht die Genauigkeit der Nierenbiopsie erreicht hatte. Allerdings konnte mit dieser Analyse bewiesen werden, dass das DiaPat-Verfahren eine vielversprechende, weiter zu entwickelnde, nicht-invasive Methode darstellt, welche die nephrologische (sowie die internistische und neurologische) Diagnostik zu ergänzen und in Zukunft wahrscheinlich auch sichern kann. Bis dahin ist das Verfahren für einen routinemäßigen Einsatz nicht geeignet, und auf eine Nierenbiopsie zur exakten Differenzierung der chronischen Nephropathie kann nicht verzichtet werden.



## **2. Einleitung**

### **2.1 Inzidenz und Epidemiologie chronischer Nierenerkrankungen**

Die Inzidenz von Nierenerkrankungen zeigt weltweit eine erhebliche Zunahme. Allein in Deutschland leben wahrscheinlich derzeit 1,5 Millionen Menschen, die ohne Diabetes an chronischen Nierenerkrankungen leiden (DiaPat GmbH and mosaiques diagnostics and therapeutics AG). Im Jahr 2005 gab es in Deutschland 63.427 dialysepflichtige Patienten (Prävalenz 769 / Mio. Einwohner), die Tendenz ist steigend. Im Jahr 2004 betrug die Anzahl der neu in die chronische Nierenersatztherapie aufgenommenen Patienten 16.027, im Jahre 2005 waren es 16.766 (Inzidenz: 203 / Mio. Einwohner). Die Zugangsrate der Dialysepatienten beträgt damit ca. 20 % pro Jahr (Frei und Schober 2005 / 2006).

Die hierfür verantwortlichen Erkrankungen sind oft entzündlicher Natur und klinisch meist schlecht voneinander zu differenzieren. Zu den wichtigsten und häufigsten glomerulären chronischen Erkrankungen bei Erwachsenen zählen die IgA-Nephritis, die FSGS (fokale-segmentale Glomerulosklerose), die membranöse Glomerulonephritis und die Minimal-Change-Nephropathie.

Eine zunehmende Bedeutung erhält auch der Diabetes mellitus. Mit einer Prävalenz von ca. sechs Millionen Menschen in Deutschland entwickelt sich dieser zu einer typischen Zivilisationskrankheit, die mit Bewegungsarmut, falscher Ernährung und Übergewicht korreliert (Schneider 2004). Die Zahl der Patienten, die aufgrund einer diabetischen Nephropathie eine dialysepflichtige terminale Niereninsuffizienz entwickeln, steigt jährlich an. Die diabetische Nephropathie steht bezüglich der Prävalenz und der Inzidenz heute an erster Stelle bei den Dialysepatienten (Wüthrich 2001). Aktuell beträgt die Prävalenz der Diabetiker 28 %, die Inzidenz 35 %. „In einigen Dialysezentren sind bereits >60 % aller neu in die Dialyse aufgenommenen Patienten und bis zu 50 % aller in der Dialyse befindlichen Patienten Diabetiker.“ (Stein und Schmechel 2002) .

Die Gründe für die stetig steigende Anzahl von Nierenerkrankungen sind vielfältig.

Grossen Einfluss hat die demographische Entwicklung unserer Gesellschaft. Nicht zuletzt durch die gute medizinische Versorgung steigt die Lebenserwartung der Bevölkerung. Zusammen mit einer zurückgehenden Geburtenrate führt dies zum Anstieg des

Altersdurchschnitts und somit dazu, dass Nierenerkrankungen, deren Inzidenz mit steigendem Alter zunimmt, in ihrer Anzahl steigen.

Ein weiterer Grund ist die Assoziation nephrologischer Erkrankungen mit den immer stärker verbreiteten Volkskrankheiten. Hier sei zunächst der Bluthochdruck erwähnt, der als einer der wichtigsten Risikofaktoren für nephrologische Krankheiten angesehen werden muss. Einflussfaktoren wie Stress, Alkohol, Rauchen, Übergewicht etc., welche in unserer Gesellschaft erheblich zunehmen, führen zu immer mehr Patienten mit Hypertonus.

Neben dem Bluthochdruck steht auch der Diabetes mellitus in direktem Zusammenhang mit dem Risiko, eine Nephropathie bis hin zu einer Niereninsuffizienz zu entwickeln.

Knapp 8 Millionen Diabetiker leben derzeit in Deutschland (Deutsche Diabetes Gesellschaft). Vor allem für den Typ 2-Diabetes und die Folgeerkrankungen im Sinne eines diabetischen Spätsyndroms (diabetische Nephropathie, Retinopathie, Makro- und Mikroangiopathie und Neuropathie) lassen sich in unserer „Überflussgesellschaft“ steigende Tendenzen verzeichnen. Ein großes Problem in der Diagnostik und Behandlung von Nierenerkrankungen besteht darin, dass diese häufig „stumm“ verlaufen. Ohne Frühsymptome und damit ohne ein „Frühwarnsystem“ werden sie oft erst entdeckt, wenn schon Spätschäden vorhanden sind, in manchen Fällen sogar erst im Stadium bereits irreversibler Niereninsuffizienz.

Die rasche Zunahme nephrologischer Erkrankungen bedeutet nicht nur eine Gefahr für die individuelle Gesundheit, sondern führt gleichzeitig auch zu einer immer größeren finanziellen Belastung des Gesundheitssystems.

Umso wichtiger ist es daher, neben Präventionsaufklärung und –maßnahmen zur Senkung bekannter Risikofaktoren, neue und bessere Methoden zu entwickeln, mit denen, möglichst nicht-invasiv und ohne den Patienten zu belasten, Nierenerkrankungen früher und präziser erkannt werden können.

## **2.2 Die Niere und ihre physiologischen Funktionen**

Die Niere des Menschen liegt paarig angelegt im Retrositus des Körpers und gehört durch die Vielfältigkeit ihrer Funktionen zu den lebenswichtigen Organen des menschlichen Organismus. Sie hat verschiedene exokrine Funktionen wie die Ausscheidung von „giftigen“ Stoffwechselabbauprodukten ( z.b. Harnsäure, Harnstoff, Kreatinin und Arzneimittel) und die Regulierung des Säure-Base-Gleichgewichts sowie des Wasser- und Elektrolythaushaltes. Zusätzlich ist die Niere auch für verschiedene endokrine Vorgänge zuständig, beispielsweise

für die Bildung von Erythropoetin (aktiviert die Erythrozytenbildung), Renin (steigert den Blutdruck über zwei verschiedene Mechanismen: 1. Verengung der peripheren Blutgefäße, 2. Freisetzung des Mineralokortikoids Aldosteron in der Nebennierenrinde), Prostaglandinen, Kallikrein (wirkt gefäßerweiternd) und 1,25-Dihydroxychole-Calciferol (entsteht im proximalen Tubulus und stellt die wirksame Form des Vitamin D's dar).

Eine weitere bedeutende Aufgabe der Niere ist die Regulierung des Blutdruckes durch verschiedene Hormone, wie das Renin-Angiotensin-System. Außerdem hilft sie bei der Konservierung lebenswichtiger Stoffe wie zum Beispiel Glukose und Aminosäuren.

Die Niere besteht aus einem feinen und komplizierten System von Glomeruli und Tubuli, in denen der Primärharn zunächst filtriert und später durch Sekretion und Resorption einzelner Bestandteile konzentriert wird. Täglich werden über die Nieren somit etwa 1,8 Liter Harn ausgeschieden.

## **2.3 Erkrankungen der Niere**

Die Erkrankungen der Niere sind sehr vielgestaltig, angefangen von Fehlbildungen (z. B. Beckenniere, Arenalie, Hypoplasie, Hufeisenniere) und erblichen Nierenerkrankungen (z. B. Zystenniere) über infektiöse Erkrankungen wie die oberen und unteren Harnwegsinfektionen bis hin zu raumfordernden Prozessen, Neoplasien, Steinleiden, tubulointerstitiellen Erkrankungen und Mitbeteiligung bei diversen Systemerkrankungen. Dabei spielen die diabetische Nephropathie und die Glomerulonephritiden eine wichtige Rolle.

### **2.3.1 Glomerulonephritiden (GN)**

Glomerulonephritiden sind entzündliche, meist immunpathogenetisch vermittelte, nicht eitrige Erkrankungen, die beide Nieren befallen und die glomerulären Strukturen (Kapillarendothel und Kapillarepithel, kapilläre Basalmembran, Mesangium und Epithel der Bowman-Kapsel) in unterschiedlicher Form (diffus, segmental oder fokal) betreffen (Grabensee 2002).

Sie stellen die häufigste Ursache der chronischen / terminalen Niereninsuffizienz dar.

Man unterscheidet die primären Glomerulonephritiden von den sekundären Glomerulonephritiden, je nachdem, ob es sich um eine eigenständige Erkrankung der Glomeruli handelt, oder ob sich die Entzündung auf dem Boden einer Systemerkrankung, zum Beispiel einem Diabetes mellitus, Kollagenosen oder einer vaskulären Erkrankung, entwickelt. Die strenge Trennung ist allerdings nicht immer möglich, da glomeruläre Veränderungen manchmal die einzige fassbare Manifestation einer Systemerkrankung darstellen.

Differenzialdiagnostisch sind nicht-entzündliche Glomerulopathien abzugrenzen, wie sie beispielweise bei der Amyloidose oder dem Diabetes mellitus auftreten (Lohr und Keppler 2005, Herold 2006).

Nach dem histologischen Bild werden 10 Formen der Glomerulonephritis unterschieden. Von ihnen sind hier diejenigen genannt, die in dieser Studie untersucht wurden:

1.) Die IgA-Nephritis (Syn.: Morbus Berger)

Sie stellt die häufigste Form der Glomerulonephritis im Erwachsenenalter dar. Charakteristisch ist die Ablagerung von Immunglobulinen (IgA, eventuell zusätzlich IgG, IgM und Komplementfaktoren) im Mesangium der Glomeruli, die sich histologisch als Mesangiumproliferation zeigt.

Die IgA-Nephritis ist weltweit die häufigste Glomerulonephritis (in Europa ca. 25 % der GN). In 20-40% der Fälle geht sie innerhalb von 25 Jahren nach Diagnosestellung terminale Niereninsuffizienz über (Lohr und Keppler 2005, Herold 2006).

2.) Die Fokale-Segmentale-Glomerulosklerose (FSGS)

Hierbei handelt es sich um einen Vernarbungsprozess (Sklerosierung) der Glomeruli, der oft als Verlaufsform einer Minimal-Change-Glomerulonephritis betrachtet wird, aber auch bei anderen Erkrankungen wie zum Beispiel bei einer Refluxnephropathie, der Einzelniere und als Folge eines jahrelangen Bluthockdrucks auftreten kann. Die genaue Pathogenese ist unklar. Die Erkrankung bevorzugt das Jugendalter, ist therapeutisch nur schlecht beeinflussbar und gilt mit ca. 20 % als zweithäufigste Ursache eines Nephrotischen Syndroms im Erwachsenenalter (Lohr und Keppler 2005, Sökeland et al. 2004, Grabensee 2002).

3.) Die membranöse Glomerulonephritis (MGN)

Die MGN gilt als klassische Immunkomplex-Glomerulonephritis. Es finden sich Immunkomplexablagerungen entlang der Außenseite der Basalmembran, die in 80% auf unbekannte Ursachen zurückzuführen sind (idiopathische MGN) und in 20% durch Tumoren, Infektionen (Hepatitis, Malaria), Systemerkrankungen, Toxine oder Medikamente bedingt sind (Lohr und Keppler 2005).

Die MGN ist die häufigste Ursache eines nephrotischen Syndroms im Erwachsenenalter (Grabensee 2002).

Es kommt in etwa 30-60% der Fälle zu einer Spontanheilung, bei den übrigen Patienten führt die MGN nicht selten zu einer dialysepflichtigen Niereninsuffizienz.

4.) Die Minimal-Change-Glomerulonephritis (MCN)

Diese, im Lichtmikroskop weitestgehend unauffällige, Erkrankung zeigt elektronenmikroskopisch Veränderungen der Epithelzellen mit Verschmelzung der Podozytenfortsätze. Die Pathogenese dieser Erkrankung ist unklar. Sie stellt bei (Klein-) Kindern in über 90 % der Fälle die Ursache eines Nephrotischen Syndroms dar, bei Erwachsenen in ca. 25 %. Bei Kindern hat sie durch Sensibilität gegenüber Kortikosteroiden eine günstigere Prognose (Vollremission in ca. 90-95 %) als bei Erwachsenen (Vollremission in etwa 50-80 %) und führt fast nie zu einer terminalen Niereninsuffizienz (Lohr und Keppler 2005, Sökeland et al. 2004, Grabensee 2002).

Die Auswahl dieser Erkrankungen ergibt sich aus der Tatsache, dass sie beim Erwachsenen die häufigsten Formen darstellen, bei denen eine Nierenbiopsie indiziert ist.

Klinische Zeichen der Glomerulonephritis sind:

- Proteinurie: unselektive oder selektive (bei der MCN) Ausscheidung von Plasmaproteinen unterschiedlicher Größe

- Hämaturie: man unterscheidet eine Mikrohämaturie (>5 Erythrozyten pro Gesichtsfeld im Mikroskop bei 400 facher Vergrößerung) von einer Makrohämaturie (>1 ml Blut / Liter Urin). Pathognomonisch ist die Ausscheidung von teilweise dysmorphen (verformten) Erythrozyten im Urin.

Beide Befunde werden hervorgerufen durch eine gestörte Permeabilität der glomerulären Basalmembran.

- Ausbildung von Ödemen durch die Verminderung der Plasmaproteine und den dadurch verringerten onkotischen Druck in den Gefäßen
- Oligurie (Urinmenge <500 ml/d) und Anurie (Urinmenge <100 ml/d) bei gleichzeitiger Verschlechterung der Nierenfunktion

Des Weiteren entwickelt sich durch den gestörten Renin-Angiotensin-Mechanismus ein Bluthochdruck.

Es werden fünf klinische Syndrome, welche sich aus unterschiedlichen klinischen Befunden zusammensetzen, differenziert:

- 1.) Nephrotisches Syndrom: Es kann bei jeder Erkrankung auftreten, bei der die Glomeruli befallen sind. Die häufigsten Formen einer Glomerulonephritis beim nephrotischen Syndrom sind MCN, FSGS, extramembranöse GN, membranproliferative GN. Klinische Zeichen sind große Proteinurie ( $> 3,5 \text{ g/d}$ ), Hypoproteinämie (Serumeiweiß  $< 60 \text{ g/l}$ , Albumin  $< 25 \text{ g/l}$ ), fakultativ Hyperlipoproteinämie, Hyperlipidurie, Ödeme, Gerinnungsstörungen (Stein und Ritz 1995)
- 2.) Akutes nephritisches Syndrom: Die klinischen Zeichen sind auf eine Störung der glomerulären Schrankenfunktion zurückzuführen: Proteinurie, Hämaturie mit dysmorphen Erythrozyten und Erythrozytenzylindern, ggf. renale Hypertonie, renale Ödeme, Natrium-Retention und Störung der exkretorischen Funktion
- 3.) Rasch progrediente Glomerulonephritis (RPGN): medizinischer Notfall, Hämaturie mit dysmorphen Erythrozyten und Erythrozytenzylindern, Proteinurie, Hypertonie, Ödeme, rasche Funktionsverschlechterung und schneller Anstieg der Serumkreatininkonzentration (Stein und Ritz 1995). Die Niereninsuffizienz steht bei dieser Erkrankung oft im Vordergrund. Es sollte schnellstmöglich eine Nierenbiopsie erfolgen.
- 4.) Chronisches nephritisches Syndrom
- 5.) Rezidivierende Hämaturie (asymptomatisch)

### 2.3.2 Diabetische Nephropathie (DNP)

Der für die Entwicklung einer diabetischen Nephropathie verantwortliche Diabetes mellitus wird in 2 Typen unterteilt:

Beim Typ 1 handelt es sich um einen Insulinmangeldiabetes, der auch als IDDM (engl.: insulin-dependent-diabetes mellitus) bezeichnet wird.

Der Typ 2 beruht auf einer im Laufe des Lebens entwickelten Insulinresistenz, wobei sowohl eine Resistenz der Erfolgsorgane auf Insulin, als auch ein verzögertes Ansprechen der insulinproduzierenden B-Zellen der Langerhans'schen Zellen im Pankreas auf Sekretionsreize vorliegen kann. Dieser Diabetestyp steht in deutlichem Zusammenhang mit Übergewicht und tritt meist erst im Erwachsenenalter auf.

Unter einer diabetischen Nephropathie versteht man eine Nierenbeteiligung im Rahmen eines diabetischen Spätsyndroms; sie wird in 5 Stadien eingeteilt. Eine klinisch manifeste diabetische Nephropathie zeigt sich nach etwas 15-20-jähriger Dauer des Diabetes mellitus mit einer Proteinurie  $> 0,5$  g/d und ist meist mit einer diabetischen Retinopathie vergesellschaftet (Göke et al. 2002).

Die diabetische Nephropathie, syn. Glomerulosklerose Kimmelstiel-Wilson, hat in den letzten Jahren als Ursache für die dialysepflichtige Niereninsuffizienz deutlich zugenommen. Sie tritt bei etwa 30-50 % der Patienten mit Diabetes mellitus auf, besonders, wenn die Einstellung des Blutzuckerwertes nicht optimal erfolgt. Meist geht der Entwicklung einer chronischen Niereninsuffizienz eine 10-15 jährige Phase der Hyperglykämie voraus.

Die diabetische Nephropathie ist anhand einer genauen Anamnese und der klinischen Befunde (Mikro-)Albuminurie und Proteinurie frühzeitig zu erkennen. Dies birgt allerdings die Gefahr, andere renale Grunderkrankungen zu übersehen, da nach der Diagnosestellung „Diabetische Nephropathie“ meist auf eine Nierenbiopsie verzichtet wird. Diese ist jedoch indiziert, wenn durch einen untypischen Verlauf oder einen auffälligen Serologiebefund Zweifel an der Diagnose „Diabetische Nephropathie“ bestehen.

Klinisch beinhaltet die diabetische Nephropathie vor allem eine Albuminurie/Proteinurie, einen Bluthochdruck und die fortschreitende Einschränkung der Nierenfunktion durch Manifestation der Mikroangiopathie.

## 2.4 Diagnostische Verfahren bei renalen Erkrankungen

Zur nephrologischen Diagnostik gehören als wichtigste Grundlage aller nachfolgenden Untersuchungen die Anamnese, die Symptomanalyse und die körperliche Untersuchung. Daneben spielen die Urindiagnostik, die Bestimmung der Serumparameter sowie bildgebende Verfahren und die Nierenbiopsie eine entscheidende Rolle. Hiervon seien nachfolgend die wichtigsten genannt (Tabelle1).

### 2.4.1 Urindiagnostik

Die Untersuchung des Urins stellt eines der ältesten laborchemischen Verfahren dar und hat auch heute sowohl im klinischen Alltag, als auch in der hausärztlichen Praxis einen sehr hohen Stellenwert. Verwendet wird entweder Spontanurin (1. oder 2. Morgenurin) oder 24-Stunden-Sammelurin (24-h-SU).

Der Urinstatus dient der quantitativen Bestimmung einzelner Bestandteile (Erythrozyten, Leukozyten, Glukose, Nitrit, Protonen etc.). Das Urinsediment beurteilt die im Urin vorhandenen Zellen mit dem Mikroskop morphologisch und erlaubt somit Hinweise auf Art und Ursache der Organschädigung bzw. der klinischen Symptomatik.

#### Hämaturie:

Hierunter versteht man den Nachweis von Erythrozyten im Urin. Es wird zwischen einer Makrohämaturie (diese ist mit bloßem Auge sichtbar) und einer Mikrohämaturie, welche nur mikroskopisch nachweisbar ist, unterschieden (Stein und Ritz 1995). Der Nachweis einer Hämaturie erfolgt entweder mittels mikroskopischer Untersuchung des Spontanharns innerhalb von 2 Stunden oder mit Hilfe eines Streifentests.

Normwerte: Spontanharn: < 5 Erythrozyten / Gesichtsfeld (GF)

Im zentrifugierten Sammelurin (quantitativ): < 1,5 Mio. Erythrozyten / 24h

Um auf den Ursprungsort der Blutung rückschließen zu können, ist es wichtig, die Erythrozytenform zu beurteilen. Hinweis auf eine glomeruläre Blutungsquelle geben dysmorphe Erythrozyten, Akanthozyten und Erythrozytenzylinder (Stein und Ritz 1995).

Die Ursachen einer Hämaturie sind vielfältig. Sie können sowohl prärenal (z.B. bei Antikoagulanzen-therapie), als auch intrarenal (z.B. Glomerulonephritiden, Tumore, Nieren-



parenchymerkrankungen) oder postrenal (z.B. im Nierenbecken, dem Ureter und der Blase) liegen. Zur diagnostischen Abklärung einer Hämaturie gehören daher neben Anamnese und Klinik weiterführende Untersuchungen wie der Gerinnungsstatus und verschiedene bildgebende Verfahren.

#### Leukozyturie:

Von Leukozyturie spricht man bei Überschreitung eines bestimmten Leukozytengehaltes im Urin. Auch bei Nierengesunden sind Leukozyten im Urin nachweisbar.

Normwerte: bis zu 5 Leukozyten / GF im hochgestellten Spontanharn (hohe Osmolarität)  
< 3 Mio. Leukozyten / 24h in der quantitativen Zählung im Sammelurin

Der Nachweis einer Leukozyturie erfolgt durch makroskopische Beurteilung des Harns (Trübung und Verfärbung deuten auf einen erhöhten Leukozytengehalt hin) und durch die mikroskopische Beurteilung des Harnsediments. Der Befund einer Leukozyturie kann renale, postrenale und systemische Ursachen haben und auf einen bakteriellen Infekt hindeuten. Allerdings ist zu beachten, dass auch bei körperlicher Anstrengung, Fieber und verschiedenen Erkrankungen wie zum Beispiel beim systemischen Lupus der Leukozytengehalt im Urin ansteigen kann (Stein und Ritz 1995).

#### Proteinurie:

Die physiologische Eiweißausscheidung bei nierengesunden Menschen beträgt abhängig von der Harnzeitmenge und der damit verbundenen Konzentrierung des Harns 50-150 mg/24h („physiologische Proteinurie“, v.a. Glykoproteine der Tubulusepithelien und Plasmaproteine). Normwerte: die physiologische Albuminausscheidung liegt bei maximal 30 mg/24h. Liegt der Proteingehalt des Urins darüber, wird dies als Proteinurie bezeichnet. Ab einer Ausscheidung von 1-1,5 g/d spricht man von einer signifikanten, ab >3 g/d von einer großen Proteinurie.

Als Ursache einer Proteinurie kommen verschiedene Mechanismen in Frage. Zum einen ein erhöhter Plasmaspiegel von Paraproteinen, zum anderen eine Steigerung der tubulären Sekretion, sowie die Verminderung tubulärer Rückresorption normal filtrierter Proteine. Die wichtigste Ursache einer Proteinurie ist die veränderte Kapillarpermeabilität bei einer Glomerulonephritis. Die Ladungs- und Größenselektivität der Kapillarmembranporen wird herabgesetzt, was zu einem Proteinverlust über den Urin führt.

Man unterscheidet eine tubuläre von einer glomerulären Proteinurie. Die tubuläre Proteinurie ist durch die vermehrte Ausscheidung von niedermolekularen Plasmaproteinen wie

Präalbumin,  $\beta$ 2-Mikroglobulin,  $\alpha$ 1-Mikroglobulin u.a. gekennzeichnet und wird durch eine verminderte Rückresorption der Proteine im Tubulus bei Tubuluszellschaden bedingt.

Die glomeruläre Proteinurie entsteht durch eine Störung der Durchlässigkeit des glomerulären Filters gegenüber hochmolekularen Plasmaproteinen. Sie wird weiter unterteilt in eine selektive Proteinurie (Ausscheidung von Albumin), die klassischer Weise bei einer Minimal-Change-Glomerulonephritis auftritt, und eine unselektive Proteinurie (Ausscheidung von nieder- und hochmolekularen Proteinen, v.a. Immunglobuline,) welche für einen schweren Basalmembranschaden der Glomeruli spricht. Die Mikroalbuminurie mit einer Proteinausscheidung von ca. 30-300 mg/d ist oft eine Vorstufe der Proteinurie (Naujoks und Wanner 1998).

Der Nachweis einer Proteinurie gelingt mit verschiedenen Methoden. In der ambulanten Praxis wird sie oft als Zufallsbefund beim Screening mit dem Urinteststreifen festgestellt.

Als Untersuchungsmaterial dient der Mittelstrahl-Spontanurin. Bei mehreren positiven Streifenstestergebnissen im Abstand von mehreren Wochen und nach Ausschluss einer passageren Störung (z.b. bei Harnwegsinfektion) ist von einer konstanten und abklärungsbedürftigen Proteinurie auszugehen (Naujoks und Wanner 1998).

Für eine differenzierte Proteinuriediagnostik eignet sich der 24h-Sammelurin. Zum quantitativen Nachweis einer Proteinurie dient die Biuretmethode (Nachweis von Säureamidbindungen), zur Erkennung einer Mikroalbuminurie kann ein Radioimmunassay (RIA) angewendet werden. Außerdem gibt es verschiedene Spezialmethoden wie die Gelelektrophorese, die Immunelektrophorese oder die Bestimmung der Protein-Clearance, mit deren Hilfe man zwischen den unterschiedlichen Proteinurienmustern unterscheiden und spezielle Proteine (z.b. Bence-Jones-Proteine) erkennen kann.

Dem Nachweis und der differenzierten Beurteilung der Proteinurie fällt in der nephrologischen Diagnostik eine große Bedeutung zu. Sie ist nicht nur Folge, sondern auch Ursache fortschreitender Nierenfunktionseinschränkungen und ein wichtiger Faktor für die Progression von Nierenerkrankungen. Je höher die Proteinurie, desto größer ist das Risiko, eine terminale Niereninsuffizienz zu entwickeln.

Die Mikroalbuminurie ist ein wichtiger Parameter besonders zur Früherkennung der diabetischen Nephropathie. Außerdem haben Studien gezeigt, dass sie sowohl bei gesunden, als auch bei bereits renal oder internistisch erkrankten Patienten eine große Rolle als Marker für das Risiko renaler und kardiovaskulärer Erkrankungen spielt. Beide Leiden leiten sich teilweise von den gleichen Risikofaktoren ab und bedingen sich gegenseitig. Patienten mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko weisen auch ein erhöhtes Risiko für chronische

Nierenerkrankungen auf, und umgekehrt (Kaulen 2005). Die Senkung der (Mikro-) Albuminurie stellt einen kardiovaskulären und renalen Schutz dar (Remuzzi et al. 2004); sie könnte somit, neben den bekannten Faktoren wie Bluthochdruck und Cholesterinwert, zu einem wichtigen Risikofaktor für renale und kardiovaskuläre Erkrankungen werden (De Zeeuw 2004, Meier et al. 2005).

## 2.4.2 Serumdiagnostik

Die Kreatininkonzentration und die Harnstoffkonzentration im Serum dienen als endogene Indikatorsubstanzen zur Beurteilung der Nierenfunktion. Mit Hilfe des Serumkreatininwertes lässt sich eine Aussage über die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) treffen. Die Referenzwerte liegen zwischen 44-97  $\mu\text{mol/l}$ . Die Breite des Normbereichs ergibt sich daraus, dass die Serumkreatininkonzentration großen interindividuellen Schwankungen unterliegt. Eine Erhöhung kann Hinweise auf ein akutes Nierenversagen oder eine Niereninsuffizienz geben, kommt aber auch durch Muskelzerfall oder eine Einnahme nephrotoxischer Medikamente zustande.

Ein wichtiges Maß für die Beurteilung der Ausscheidungsfunktion der Niere ist die Kreatininclearance. Sie beschreibt das pro Zeiteinheit von Kreatinin befreite Plasmavolumen mit Referenzwerten zwischen 90-160 ml/min. Zur Berechnung der endogenen Kreatininclearance erfolgt eine Harnsammlung (z.B. 2-h-Sammelurin oder 24-h-Sammelurin), sowie Blutabnahmen zur Bestimmung des Serumkreatinins.

Es gibt 4 verschiedene klinisch gebräuchliche Methoden der Clearancemessung (Ulbricht et al. 2006):

1.) Kreatininclearance im 24h-Sammelurin:

Die Clearance wird nach folgender Formel berechnet:  $C_{cr} = U \times V / S$

Wobei U der Urinkreatininkonzentration ( $\mu\text{mol/l}$  oder mg/dl), V der Harnflussrate (ml/s oder ml/min) und S dem Serumkreatinin ( $\mu\text{mol/l}$  oder mg/dl) entspricht.

2.) Kombinierte Kreatinin- / Harnstoffclearance / 2 im 24h-Sammelurin

3.) Kreatininclearance nach der Cockcroft-Gault-Formel

4.) Kreatininclearance nach der MDRD-Formel (Modification of Diet in Renal Disease)

Die MDRD-Formel berücksichtigt neben der Kreatininkonzentration im Serum auch das Geschlecht und das Alter des Patienten (Kaulen 2005)

Der 24h-Sammelurin stellt allerdings einen recht ungenauen Parameter dar, da die Sammlung von mehreren Faktoren abhängt (Patient, Pflegepersonal, genaue Sammlung, Aufbewahrung) und daher nur selten exakt gelingt. Außerdem ist das Serumkreatinin alleine kein sehr guter Parameter zur Einschätzung der Nierenfunktion.

Vergleichende Studien haben deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Meßmethoden gezeigt. Bei exakter Sammlung und Auswertung des Urins ist die Kreatininclearance im 24h-Sammelurin eine sehr gute Methode zur Einschätzung der Nierenfunktion. Die MDRD-Formel eignet sich mit Einschränkungen vor allem zur Verlaufskontrolle (Ulbricht et al. 2006).

Die Serumharnstoffkonzentration ist von der glomerulären Filtrationsrate, der Diurese und dem Eiweißabbau des Organismus abhängig und wird von verschiedenen Faktoren wie Eiweißzufuhr, Fieber und einer katabolen Stoffwechsellage beeinflusst. Sie ist nicht geeignet, das Ausmaß einer Nierenfunktionsstörung einzuschätzen, wird aber als wichtiger Indikator einer Urämie herangezogen.

Normwerte: 3,6-8,9 mmol/l bzw. 10-25 mg/dl.

In der Nephrologie spielen auch die Beurteilung des Säure-Basen-Haushaltes und die Konzentration der Serumelektrolyte eine wichtige Rolle. Vor allem die Bestimmung des Kaliumwertes sollte regelmäßig erfolgen, da dieser unter anderem Hinweise auf eine Niereninsuffizienz geben könnte und zur Einschätzung einer Dialysepflichtigkeit dient.

Normwerte: 3,5 – 5,5 mmol/l

### **2.4.3 Bildgebende Verfahren**

Als wichtigstes und häufigstes nicht-invasives bildgebendes Verfahren zur morphologischen Beurteilung der Nieren und des pararenalen Gewebes dient die Nierensonographie, die bei allen Patienten mit nephrologischer Fragestellung durchgeführt werden sollte (Stein und Ritz 1995).

Mit der Sonographie und der Dopplersonographie lassen sich Größe, Form und Struktur der Niere, aber auch der Nierengefäße, darstellen und beurteilen.

Zu den röntgenologischen Verfahren zählen die Abdomenleeraufnahme und die Ausscheidungsurographie mit deren Hilfe man ein genaues Bild von Größe, Kontur und Symmetrie beider Nieren erhält.

Das Computertomogramm (CT) dient der Darstellung der Form und der Gewebedichte mittels Kontrastmittelgabe und gilt als Mittel der Wahl beim Nachweis einer Nephrokalzinose sowie bei der Tumordiagnostik und der Differenzierung zwischen Tumor und Zyste. Bei einem nicht eindeutigen CT-Befund kann ergänzend das Magnetresonanztomogramm (MRT) herangezogen werden.

Zur Abklärung vaskulärer Nierenerkrankungen eignen sich die CT-Angiographie, MRT-Angiographie oder die selektive Nierenangiographie.

Einen geringeren Stellenwert in der nephrologischen Diagnostik und Differentialdiagnostik nimmt heute die Funktionsszintigraphie ein. Stehen Sonographie, CT und Ausscheidungsurographie zu Verfügung, so wird nur noch selten eine Szintigraphie durchgeführt. Allerdings ist sie eine wichtige diagnostische Alternative bei Patienten mit Kontrastmittelallergie und eignet sich außerdem gut zur Beurteilung der Nierendurchblutung, zur Diagnose einer Nierenarterienstenose und bei der Erkennung einer Abstoßungsreaktion nach Organtransplantation (Stein und Ritz 1995).

Zu den neueren Verfahren der bildgebenden Diagnostik in der Nephrologie gehören nuklearmedizinische Verfahren wie die Positronenemissionstomographie (PET) und die Single-Photon-Emissionscomputertomographie (SPECT) sowie die Szintigraphie mit MAG3 als tubulär sezerniertem Tracer. Diese eignet sich zum Beispiel zur seitengetrenten Clearancebestimmung, zur Diagnostik obstruktiver Harnabflussbehinderungen und zur frühzeitigen Erkennung von Abstoßungsreaktionen in der Nachsorge nach Nierentransplantation (Grünwald 2001).

Auch die Radionuklidnephrographie (RNG) zählt zu den neueren diagnostischen Verfahren und dient zur Beurteilung der intra- und postrenalen Funktion sowie der Bestimmung der quantitativen und seitengetrenten Kreatininclearance.

#### **2.4.4 Die Nierenbiopsie**

Um die endgültige histologische Diagnose von Nierenerkrankungen stellen zu können, ist die perkutane Nierenbiopsie, die seit mehr als 50 Jahren angewendet wird, unumgänglich. Sie sollte nach strenger Indikationsstellung und nach Ausschöpfung aller nicht-invasiven Diagnoseverfahren durchgeführt werden. Sie wird vor allem zur Differenzierung unterschiedlicher parenchymatöser Veränderungen des Nierengewebes herangezogen. Bei der Nierenbiopsie handelt es sich um ein invasives Verfahren zur Entnahme einer Gewebeprobe,

welche an der Klinik für Innere Medizin III mit dem sogenannten Biopty-Gerät (Biopty gun, Meditech ASAP 18G) durchgeführt wird. Der gewonnene Gewebszylinder wird im Anschluss sowohl lichtmikroskopisch, als auch elektronenmikroskopisch und immunhistologisch untersucht (Triple-Diagnostik).

Indikationen für eine Nierenbiopsie sind (Sarre et al. 1988, Kuhlmann und Walb 1998):

- Nephrotisches Syndrom
- Differenzierung verschiedener Glomerulonephritiden
- Verdacht auf renale Manifestation systemischer Erkrankungen (z.b. Goodpasture-Syndrom)
- Amyloidose
- akutes Nierenversagen bzw. akute Verschlechterung der Nierenfunktion unklarer Ursache
- unklare persistierende signifikante Proteinurie > 150 mg/d, unklare Oligurie bzw. Anurie
- aktives Harnsediment (>60% dysmorphe Erythrozyten oder Antikörper) in Kombination mit einer Proteinurie oder einer Funktionsstörung
- Schwangerschaftsnephropathie
- Abstoßungsreaktion zw. Funktionsverlust eines Nierentransplantats
- Nichtansprechen der medikamentösen Therapie

Kontraindikationen für eine Nierenbiopsie sind (Sarre et al. 1988, Kuhlmann und Walb 1998):

- nicht beherrschbare Störungen der Blutgerinnung
- unkontrollierte Hypertonie
- funktionelle Einnierigkeit
- Aneurysma der Arteria renalis
- Nierentumoren
- perinephritischer Abszess, Gefäßsklerose im fortgeschrittenen Stadium
- kardiale Dekompensation oder Inoperabilität des Patienten
- chronisch progrediente Niereninsuffizienz
- schwere Nephrokalzinose

Relative Kontraindikationen für eine Nierenbiopsie sind (Sarre et al. 1988):

- schwere Anämie
- arterielle Hypertension >150 mmHg systolisch oder >95 mmHg diastolisch

Eine Nierenbiopsie erfolgt meist unter stationären Bedingungen, der Patient sollte nach dem Eingriff zur Überwachung 24h Bettruhe einhalten und die ersten 4 Stunden auf dem Rücken liegen. Es erfolgt eine engmaschige Kontrolle des Harns, des Blutdrucks und der Herzfrequenz. Bei Komplikationen (s.u.) kann eine postpunktionelle Ultraschallkontrolle angezeigt sein. Außerdem wird der Patient angehalten viel zu trinken, um eine ausreichende Diurese zu gewährleisten.

Komplikationen einer Nierenbiopsie (Kuhlmann und Walb 1998):

- postpunktionelle, reversible Makrohämaturie
- perirenale Hämatombildung, selten Hämatokritabfall, Hypotonie oder Rupturgefahr
- Entzündung der Niere durch Keime, die durch den Stichkanal in den Organismus gelangen
- Bildung einer arteriovenösen Fistel oder eines postbiopsischen Aneurysmas
- Blutung oder Entzündung durch Verletzung des Nierenparenchyms
- Verletzungen umgebender Organe mit nachfolgenden Komplikationen wie Infektionen, Sepsis, Blasentamponade

Diese Komplikationen können in seltenen Fällen zum Funktionsverlust der Niere führen.

Die Mortalitätsrate liegt bei ca. 0,1 % (Kuhlmann und Walb 1998).

Die Nierenbiopsie ist häufig Anlass kontroverser Diskussionen, da es sich hierbei um einen invasiven Eingriff handelt, der einen stationären Aufenthalt von 1-3 Tagen nach sich zieht und nicht unerhebliche Risiken für den Patienten birgt.

Trotzdem gilt die Nierenbiopsie nach Ausschöpfung aller diagnostischen Mittel wie Anamnese, Laboruntersuchungen und bildgebende Verfahren als "Goldstandard" in der Diagnostik von renalen Erkrankungen und ist nach wie vor das einzige Verfahren um chronische Nierenerkrankungen sicher erkennen und voneinander differenzieren zu können und somit essentieller Bestandteil in der Abklärung nephrologischer Fragestellungen.

## 2.5 Proteomics und das DiaPat-Verfahren

Das DiaPat-Verfahren des Labors DiaPat GmbH (Tochtergesellschaft der im Jahre 2002 gegründeten mosaiques diagnostics and therapeutics AG, Hannover) wurde von dem Nephrologen Hermann Haller und dem Chemiker Harald Mischak von der Medizinischen Hochschule Hannover (MMH) entwickelt (Schneider 2004) und ist eine viel versprechende Innovation auf dem Gebiet der nicht-invasiven Diagnostik renaler Erkrankungen, von der man sich erhofft, die Nierenbiopsie ersetzen zu können.

Der Name „DiaPat“ wurde von dem englischen „**diagnostic-pattern**“ abgeleitet und bedeutet auf Deutsch „diagnostisches Muster“.

Das DiaPat-Verfahren ist die weltweit erste Methode um in einer Urinprobe (oder anderer Körperflüssigkeiten) Proteine schnell, verlässlich und reproduzierbar zu bestimmen und somit den Gesundheitszustand eines Organs oder eines Menschen abzubilden. Es beruht auf der Bestimmung krankheitsspezifischer Proteinmuster durch Proteomanalyse und der Erstellung von Proteinkollektionen und Biomarkermustern, die in ihrer Gesamtheit bestimmte Krankheiten widerspiegeln.

Täglich fließen etwa 1700 l Blut durch die Niere.

Der Urin eines gesunden Menschen enthält rund 500-1500 verschiedene Proteine, Botenstoffe aller Organe, die sich durch ihre charakteristische Masse, Konzentration und Migrationszeit unterscheiden. Sie sind wichtig für den Aufbau und die Funktion der Zellen und katalysieren chemische Reaktionen, wobei sie durch Veränderung, Neubildung und Abbau ein Muster von Spuren hinterlassen. Bei krankhaften Veränderungen der Nieren und anderer Organe verändert sich ihre Konzentration, sie können fehlen, in veränderter Form auftreten oder es können sogar neue Proteine nachweisbar sein. Dies kann sowohl Ursache als auch Folge nephrologischer Krankheiten sein (Haubitz et al. 2004). Das DiaPat-Verfahren macht sich diese Veränderung der Konzentration und Verteilung der Proteine bei pathologischen Prozessen zu nutze. Das Proteom (Definition: Gesamtheit aller Eiweißstoffe) einer Zelle ist einer ständigen Dynamik unterworfen, so dass Proteomanalysen eine Momentaufnahme des gegenwärtigen Zustandes eines Organismus darstellen und somit auch Einblicke in die Pathophysiologie verschiedener Gewebe erlauben (Schott 2004).

Der Ausdruck „Proteomics“ bedeutet so viel wie „systematische Proteinanalyse im Hinblick auf ihre Identität, ihre Quantität und ihr Funktion“ (Thongboonkerd 2004). Das Prinzip der Proteomanalyse ist nicht neu, die ersten drei Publikationen zu diesem Thema erschienen bereits 1995, allerdings hat die Methode in den letzten Jahren durch die technische



Verbesserung der Proteinseparation und die Weiterentwicklung der Massenspektrometrie enorme Fortschritte gemacht (Thongboonkerd 2004). Im Gegensatz zur Westernblot-Methode, die durch die Notwendigkeit eines passenden Antikörpers limitiert ist und auch im Vergleich zu anderen Methoden wie zum Beispiel der SELDI-MS (Surface-enhanced laser desorption/ionization) ist durch die Kopplung vom Kapillarelektrophorese und Massenspektrometer (CE-MS) möglich in nur einer Probe valide und reproduzierbar eine große Anzahl von Proteinen Polypeptiden zu identifizieren (Weissinger et al. 2004). Insbesondere im Vergleich der CE-MS mit der SELDI-Technologie zeigt diese einen geringeren Informationsgehalt durch geringere Auflösung und Massengenauigkeit (Mischak 2005).

Während bisher meist nur die Quantität aller Proteine bzw. eines einzelnen Proteins bestimmt werden konnte, ist es durch die oben genannte Online-Kopplung (CE-MS) gelungen, reproduzierbare Muster aus Peptiden und Proteinen in Urinproben gesunder Probanden nachzuweisen, mit deren Hilfe ein „normales Urin-Polypeptid-Muster“ als Proteinprofil gesunder Probanden erstellt werden konnte (Wittke et al. 2003, Weissinger et al. 2004). Das normale Proteinprofil weist im Vergleich mit Proteinmustern renal erkrankter Patienten signifikante Unterschiede auf. Diese Abweichungen sollen sowohl Rückschlüsse auf die Lokalisation und die Pathogenese, als auch Aussagen hinsichtlich der Prognose einzelner Nieren-erkrankungen erlauben.

Darüber hinaus unterscheiden sich auch die Urinpeptidmuster der renalen Erkrankungen untereinander, so dass sich durch jeweils homologe Proteinprofile membranöse Nephropathie, Minimal-Change-Nephropathie, FSGS, IgA-Nephropathie und diabetische Nephropathie differenzieren lassen.

Das DiaPat-Verfahren besteht aus einer Kombination kapillarelektrophoretischer Polypeptid-Trennung (CE) und anschließender Massenspektrometrie (MS; Identifikation der unterschiedlichen Proteine anhand ihrer Masse). Das Kapillarelektrophorese ist der Massenspektrometrie als Hochleitungstrennverfahren vorgeschaltet, da „in einer unfraktionierten Urinprobe zu viele Polypeptide vorhanden sind, um in einer Messung erfasst zu werden.“ (Haubitz et al. 2004). Die kapillarelektrophoretisch getrennten Proteine werden elektrisch aufgeladen und anschließend direkt (online) in ein Massenspektrometer überführt. Hier werden die einzelnen Proteine anhand ihrer Fluggeschwindigkeit analysiert und identifiziert. Die aufgezeichneten Signale werden in einem Computer mit der eigens für diesen Zweck entwickelten MosaiquesVisu-Software analysiert und in zwei- oder dreidimensionaler Abbildung dargestellt. Somit ist es möglich schnell und reproduzierbar

durch Charakterisierung der Proteine anhand ihrer Masse, ihrer Konzentration und ihrer Migrationszeit ein diagnostisches „Proteinmuster“ (DiaPat) des Urins zu erstellen, „welches idealerweise für eine Erkrankung charakteristisch ist“ (Haubitz et al. 2004). Die krankheits-spezifischen Muster werden in einer Datenbank gesammelt und gelten als Referenz bei der Analyse anderer Proben. Die Visu-Datenbank umfasst inzwischen mehr als 3000 unterschiedliche Proteine und Peptide.

Die Konzentration der Peptide und Proteine im Organismus ist sehr variabel und wird nicht nur durch Krankheiten, sondern auch durch körperliche Betätigung, Diät oder Rauchen beeinflusst. Daher wählte das Unternehmen ein breit abgestütztes Polypeptidmuster, um eine möglichst hohe Stabilität der Ergebnisse zu gewährleisten.

So ist beispielsweise ein „diabetisches“ Polypeptidmuster etabliert worden (Haubitz et al. 2004).

Als klinische Konsequenz erhofft man sich zumindest bei einem Teil der Patienten auf den invasiven Eingriff einer Nierenbiopsie und die damit verbundenen Risiken verzichten können. Anwendung findet das DiaPat-Verfahren vor allem bei der Früherkennung zu einem Zeitpunkt, zu dem noch keine Organschäden aufgetreten sind oder die renale Schädigung nur minimal ist sowie in der Diagnostik und der Differentialdiagnostik nephrologischer Erkrankungen.

Die Proteomanalyse erlaubt somit eine schnellere therapeutische Intervention und die Verhinderung von Spätschäden. Eine besonders wichtige Rolle spielt das Verfahren bei Zivilisationskrankheiten, wie dem Diabetes mellitus Typ II, dessen Inzidenz rapide zunimmt und von dem immer mehr junge Menschen betroffen sind.

Außerdem dient die Methode der Erkennung von Komplikationen nach Nieren- und Stammzelltransplantation sowie der Kontrolle und Optimierung medikamentöser Behandlungen und trägt ein hohes Potential zur Aufklärung der Pathogenese bestimmter Erkrankungen (Thongboonkerd und Klein 2004).

In einer Studie zur Nachbehandlung und -betreuung von Patienten nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation konnten durch das DiaPat-Verfahren Polypeptide identifiziert werden, mit deren Hilfe es möglich war, eindeutig zwischen Patienten mit und ohne eine Graft-versus-Host-disease (GVHD) zu unterscheiden und die lebensbedrohliche Komplikation bis zu zehn Tagen früher festzustellen als bisher (Schneider 2005). Die Spezifität in dieser Studie betrug 82 % (Kaiser et al. 2004), die positive Vorhersagekraft mehr als 90% (Mischak 2005).

In einer anderen Studie zur nicht-invasiven Diagnostik des Urothelkarzinoms konnte durch Proteomanalyse der Urinproben von Patienten mit Urothel-Karzinom (n=31), gesunden Probanden (n=11) und Patienten mit einer anderen malignen urogenitalen Erkrankung ein Urothel-Karzinom-typisches diagnostisches Muster aus 22 Polypeptiden identifiziert werden (Theodorescu 2006).

Auch in der Pulmonologie findet die Proteomanalyse bereits Anwendung (Korfei et al. 2007).

Außerdem ist die Verknüpfung zwischen Proteinpattern und bestimmten Erkrankungen auch auf dem Gebiet der Onkologie (z.B. beim Ovarialkarzinom, bei Brustkrebs, Prostatakrebs und beim Astrozytom) gelungen (Bischoff und Luider 2004).

Durch das Zusammenspiel von Herz und Nieren ist es möglich, die Proteomanalyse indikativer Polypeptide für eine koronare Herzkrankheit im Urin (Biomarker) auch in der kardiologischen Diagnostik und der Therapiebeobachtung einzusetzen (Geppert et al. 2007).

DiaPat soll in Zukunft außerdem auch auf dem Gebiet der Neurologie (bei Morbus Alzheimer und Multipler Sklerose), in der Psychiatrie (bei der Schizophrenie) und bei weiteren Krebserkrankungen diagnostisch nutzbar werden.

In der Nephrologie liegt die große Hoffnung in das DiaPat-Verfahren vor allem darin, eines Tages die invasive Nierenbiopsie ersetzen zu können. Zum jetzigen Zeitpunkt allerdings ist es noch zu früh für einen routinemäßigen Einsatz des DiaPat-Verfahrens, so dass es momentan lediglich im Rahmen klinischer Studien eingesetzt wird und die Nierenbiopsie noch nicht ersetzen kann (Neumeier 2004).

Diese neue Methode, mit welcher anhand der Proteinzusammensetzung im Urin exakte und differentialdiagnostische Rückschlüsse auf Nierenerkrankungen gezogen werden sollen, befindet sich noch in der Evaluierungsphase. Bisher wurden zu diesem Thema erst wenige Studien veröffentlicht, besonders in Bezug auf einen direkten Vergleich zwischen dem bisherigen Goldstandard der Diagnostik, der Nierenbiopsie, und dem neuen Verfahren, der Urin-Proteomanalyse. In dieser Studie werden die bei der Nierenbiopsie gewonnenen Ergebnisse den mit dem DiaPat-Verfahren ermittelten Diagnosen direkt gegenüber gestellt, so dass mit Hilfe der statistischen Parameter Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer Vorhersagewert eine Aussage über die diagnostische Exaktheit des DiaPat-Verfahrens getroffen werden kann, in der Hoffnung, einen Beitrag zur Optimierung der nicht-invasiven Nierendiagnostik zu leisten.

### **3. Ziele / Fragestellungen der Arbeit**

- Wie weit stimmen die Ergebnisse des DiaPat-Verfahrens mit den durch die Nierenbiopsie gewonnenen Diagnosen überein?
- Ist das DiaPat-Verfahren für die Früherkennung und Diagnostik einer Nierenerkrankung besonders sensibel?
- Wie hoch sind Sensitivität, Spezifität, positiver Vorhersagewert und negativer Vorhersagewert für einzelne Krankheiten?
- Reicht die Sensitivität des Verfahrens aus, um in Zukunft eine Nierenbiopsie ersetzen zu können?
- In welchem Bereich der nephrologischen Diagnostik könnte das DiaPat-Verfahren in Zukunft sinnvoll eingesetzt werden?

## **4. Material und Methoden**

### **4.1 Patienten**

In die retrospektive Studie wurde eine Gruppe von insgesamt 78 Patienten einbezogen, bei denen in den Jahren 2001 bis 2003 eine Nierenbiopsie zur Abklärung einer klinisch manifesten renoparenchymatösen Erkrankung durchgeführt wurde. Von den Patienten wurde zeitnah der Biopsie eine Urinprobe gewonnen, die im Labor der Klinik für Innere Medizin III, Jena, tiefgefroren asserviert wurde.

Das Patientenkollektiv bestand aus 50 männlichen und 28 weiblichen Personen im Alter von 19 bis 82 Jahren.

Elf Patienten, 4 Frauen und 7 Männer, waren nierentransplantiert.

Als Datenquelle dienten die Patientenakten der Nephrologischen Station der Klinik für Innere Medizin III, Jena. Mittels dieser wurde eine Tabelle erarbeitet (Tabelle 1), in welche neben den Initialen und der zugeordneten Nummer Alter, Geschlecht, Biopsiedatum, Blutdruck am Tag der Nierenbiopsie, Gewicht und Größe jedes Patienten klinische Daten wie der Serumkreatininwert, das Urinsediment, die Proteinurie und die Kreatininclearance aufgenommen wurden.

Außerdem sind in der Tabelle die Ergebnisse der histologischen Untersuchung, die Medikation der Patienten und die Information darüber, ob ein Patient eine Nierentransplantation hatte, enthalten.

### **4.2 Urin und bioptisches Material**

Von allen Patienten wurde einen Tag nach der Biopsie eine Urinprobe aus einem 24-h-Sammelurin entnommen. Zu diesem Zeitpunkt waren bei der Mehrheit der Patienten noch keine therapeutischen Maßnahmen begonnen worden. So konnte gewährleistet werden, dass die Urinprobe nicht durch pharmakologische Substanzen beeinflusst war.

Die Proben wurden zentrifugiert um Zellbestandteile zu separieren, der Überstand wurde portioniert und bei  $-80\text{ °C}$  eingefroren und gelagert.

Die Urinproben wurden kryokonserviert und anonymisiert an das Institut Mosaiques Diagnostics and Therapeutics AG der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) geschickt, wo sie mit dem DiaPat-Verfahren untersucht wurden.

Die Nierenbiopsien wurden am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg von Prof. Dr. Gröne untersucht und befundet.

Die Ergebnisse der Auswertung des Proteomic-Verfahrens in Hannover sowie die Diagnosen, der Nierenbiopsie wurden gegenübergestellt (Tabelle 2) und mit statistischen Verfahren ausgewertet.

#### **4.3 Analyse der Urinproben mit dem DiaPat-Verfahren**

Die kryokonservierten Urinproben wurden nach dem Eintreffen in Hannover bis zur weiteren Analyse bei  $-20\text{ °C}$  gelagert. Nach dem schonenden Auftauen wurden sie einer Präparation unterzogen, die der Reinigung dient. Um Beeinflussungen der Analyse durch Matrixbestandteile zu minimieren und den Proteingehalt des Analysats zu erhöhen, wurden 2ml einer Probe in eine  $C_2$  Säule gefüllt, um störende Strukturen wie Harnsäure, Elektrolyte und vor allem Salze zu entfernen. Anschließend wurden die Polypeptide der Lösung mit 50%igem Acetonitril (einem organischen Lösungsmittel, Sigma-Aldrich, Deutschland) in HPLC-Wasser (Roth, Deutschland), welches 0,5 % Ameisensäure enthält, gelöst. Die so präparierten Proben wurden trockengefroren und zur Analyse in 20  $\mu\text{l}$  HPLC-grade water (besonders gereinigtes Wasser, das den Reinheitsgrad für die Verwendung mit HPLC erfüllt) resuspendiert.

Zur Analyse wurde das vom Institut selbst entwickelte CE-MS-System verwendet. Dieses besteht aus der Online-Kopplung einer Kapillarelektrophorese (CE) (Gerät: Beckman P/ACE MDQ, Hersteller: Beckman-Coulter, Fullerton, CA, USA, Abb. 1, 2 und 4) und einem Massenspektrometer (MS) (Gerät: Mariner time-of-flight (TOF) Massenspektrometer, Hersteller: Applied Biosystems, Farmington, MA, USA, Abb. 3 und 4)



Abb.1 und 2 :Beckman Coulter Kapillarelektrophorese

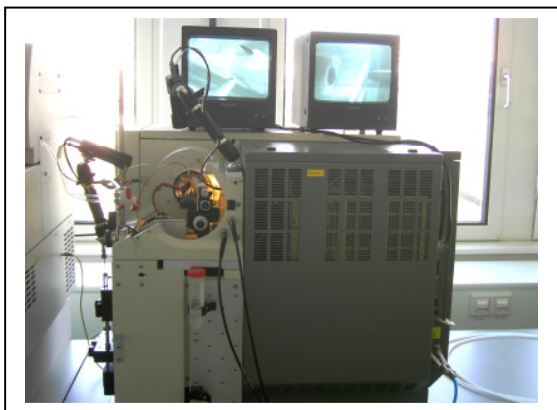


Abb.3: Das Massenspektrometer

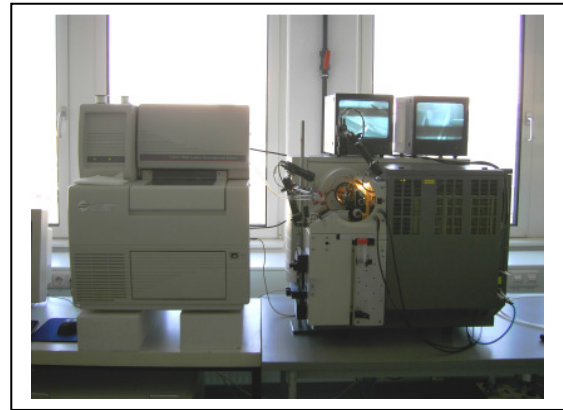


Abb.4: Kapillarelektrophorese und Massenspektrometer

Die Probe wurde zunächst in die unbehandelte Beckmannkapillare des Kapillarelektrophorese-Systems eingefüllt. Diese ist ca. 90 cm lang und enthält einen sauren Laufpuffer, eine Mischung aus Methanol und Ameisensäure, mit einem pH-Wert von 2,4. Die Temperatur der Kapillare betrug konstant 35 °C. Anschließend wurde ein elektrisches Feld mit 30 kV Spannung und einem leichten Druck von ca. 1,4 kPa angelegt, und es erfolgte ein Protoneneinstrom, der den einzelnen Molekülen je nach Aufnahmekapazität eine spezifische Ladung verlieh. Die geladenen Teilchen wanderten im elektrischen Feld Richtung Kathode. Je mehr Ladung ein Molekül besitzt, desto schneller wandert es im elektrischen Feld und

desto kürzer ist somit seine Migrationszeit. Ein Lauf dauerte ca. 60 Minuten, das Zeitfenster in dem die Proteine am Ende der Kapillare eintreffen betrug etwa 30 Minuten. Aus dieser relativ engen Zeitspanne ergibt sich die Tatsache, dass mehrere Moleküle gleichzeitig die Ionisationskammer (das Übergangsstück zwischen CE-System und MS) erreichen, da sie die gleiche oder eine sehr ähnliche Migrationszeit besitzen, obwohl sie sich in ihrer Masse unterscheiden.

In der Ionisationskammer floss ein so genannter „Sheath-Flow“ (Fluss / Strömung in der Ummantelung der Kapillare) außen in entgegengesetzter Richtung mit ca. 5 µl/min an der Kapillare vorbei und stellte erneut Protonen zu Verfügung, um die Ladung der Teilchen zu intensivieren. In der Ionisationskammer herrschte zwischen Kapillarelektrophorese und Massenspektrometer eine Spannung von ca. 4 kV, welche die Teilchen in Richtung MS wandern ließ. Mit Hilfe eines Curtain-Gases, das mit ca. 160 °C aus dem MS ausströmt, wurde die Flüssigkeit um die Moleküle herum zum Verdampfen gebracht (Ionisierung) und die einzelnen Teilchen wurden in das Massenspektrometer eingezogen. Das Massenspektrometer ermittelte anhand einer bekannten Flugstrecke (Strecke zwischen MS-Eingang und Detektor) und der errechneten Flugzeit der einzelnen Proteine deren spezifische Masse, die es in Form eines Peaks an den angeschlossenen PC weiterleitete (Abb.5)

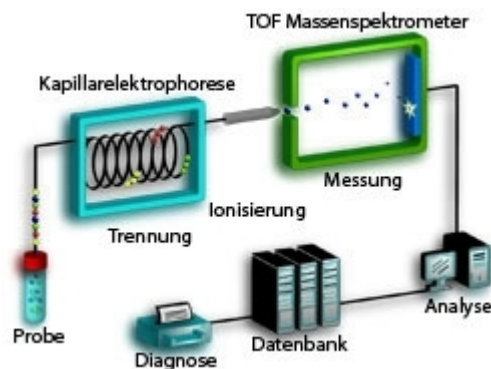


Abb.5: Schematische Darstellung der DiaPat-Technologie

(Quelle: <http://www.mosaiques-therapeutics.com/diapatcms>)



Die Auswertung der im Massenspektrometer ermittelten Daten erfolgte mittels einer von Mosaiques Diagnostics and Therapeutics entwickelten Software, genannt „MosaiquesVisu“. Kommt ein Molekül in mehreren Ladungszuständen vor, so zeigt es mehrere Peaks (Spitzen, Signale), welche von dem Computer zu einem zusammengefasst werden. Außerdem werden Störsignale (Signale mit einer relativen molekularen Masse <1000) herausgefiltert. Es entstand eine Peak-Liste, in der alle Moleküle mit Masse und Signalintensität aufgeführt wurden. Zur Visualisierung, Darstellung und Präsentation der Proteinzusammensetzung der Urinprobe wurden 3D-Bilder, so genannte Protein-Plots angefertigt. (Abb. 6)

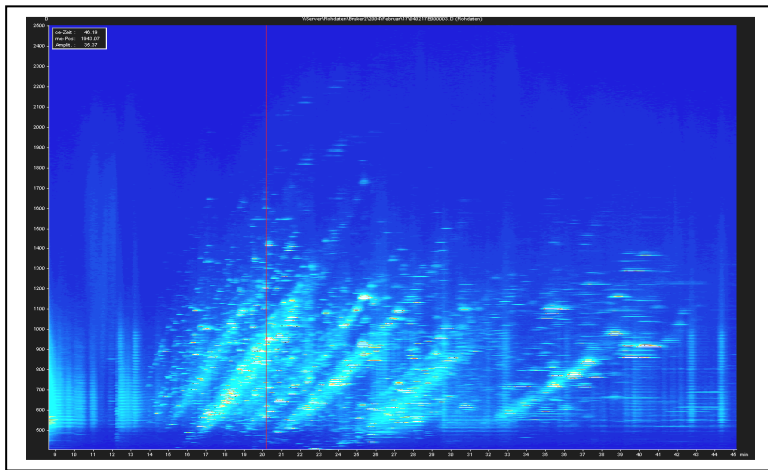


Abb. 6: CE-MS Daten der Urinanalyse eines gesunden Probanden  
Masse pro Ladung auf der Y-Achse und CE-Migrationszeit auf der X-Achse ( Zeit in Minuten) (Kolch et al.2004)

Die Muster von etwa 300-500 Analysen werden anschließend zu „Durchschnittsmustern“ zusammengefasst (Kompilieren der Daten), die einen direkten Vergleich zwischen gesunden Probanden und Patienten mit nephrologischen Erkrankungen ermöglichen.

#### 4.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem SPSS-Statistikprogramm.

Hierzu wurde zunächst eine Kreuztabelle erstellt, in welcher die Ergebnisse der Nierenbiopsie (J 1-10) den Ergebnissen des DiaPat-Verfahrens aus Hannover (H 1-10) gegenübergestellt wurden. Hierbei bedeutete 1, dass bei dem Patienten die jeweilige Erkrankung diagnostiziert wurde und 0, dass die Erkrankung nicht diagnostiziert wurde.

(Abb. 7: Beispiel einer Kreuztabelle)

Mit Hilfe des SPSS-Programms wurden für jede einzelne nephrologische Krankheit, sowie für die Erkennung einer pathologischen Urinprobe im Allgemeinen (J10 / H10), die **Sensitivität**, die **Spezifität**, der positive und der negative **Vorhersagewert** des DiaPat-Verfahrens berechnet und in tabellarischer Form dargestellt. Hierbei galt das Ergebnis der Nierenbiopsie in Jena als Goldstandard / Referenz.

		Jena		
		0 nicht pathol.	1 pathologisch	
Hannover	0 nicht pathol.	A	b	
	1 pathologisch	C	d	

Abb.7: Beispiel einer Kreuztabelle

Sensitivität: Anteil der in Hannover als pathologisch erkannten Proben unter den in Jena als pathologisch erkannten Proben  
d.h.: Anteil der Testpositiven in Hannover unter den Kranken in Jena

$$\frac{d}{b + d}$$

Spezifität: Anteil der in Hannover als nicht-pathologisch erkannten Proben unter den in Jena als nicht-pathologisch erkannten Proben

d.h.: Anteil der Testnegativen in Hannover unter den Gesunden in Jena

$$\frac{a}{a + c}$$

Positiver Vorhersagewert: Anteil der in Jena als pathologisch erkannten Proben unter den in Hannover als pathologisch erkannten Proben

d.h.: Welcher Anteil der in Hannover als pathologisch erkannten Patienten ist tatsächlich krank (= in Jena pathologisch)?

$$\frac{d}{c + d}$$

Negativer Vorhersagewert: Anteil der in Jena als nicht-pathologisch erkannten Proben von den in Hannover als nicht-pathologisch erkannten Proben

d.h.: Welcher Anteil der in Hannover als gesund erkannten Patienten ist tatsächlich gesund (= in Jena nicht pathologisch)?

$$\frac{a}{a + b}$$

Zusammenfassend wird oft die Treffsicherheit als relativer Anteil der richtigen (positiven und negativen) Befunde an allen Befunden angegeben:  $(a+b) / (a+b+c+d)$

Dies hat allerdings den Nachteil, dass die Treffsicherheit von der Prävalenz der Kranken in der untersuchten Stichprobe abhängt und damit nicht verallgemeinerbar ist (Guggenmoos-Holzmann und Wernecke 1996).

Als zusammenfassende Maßzahl wurde daher der **Youden-Index Y** verwendet:

$$Y = \text{Sensitivität} + \text{Spezifität} - 1$$

Es ergeben sich Werte zwischen  $-1$  und  $+1$ , wobei  $Y$  auf jeden Fall positiv sein und möglichst in der Nähe von  $+1$  liegen sollte, um ein Verfahren als valide / gut einzuschätzen.

Bei  $Y = 0$  stellt das Verfahren keinen Nutzen dar (Guggenmoos-Holzmann und Wernecke 1996).

Zusätzlich wurde der **McNemar-Test** durchgeführt. Mit diesem wurde folgende Null-Hypothese geprüft:

- **H<sub>0</sub>**: „Die Erkennungshäufigkeit für eine bestimmte Erkrankung ist bei beiden Testverfahren (d.h. in Jena und in Hannover) gleich“

In diesem Vergleich wurden beide Verfahren als gleichberechtigt erachtet.

Interpretation des McNemar-Tests:

Die Null-Hypothese wurde bei einem  $p$ -Wert  $\leq 0,05$  ( Signifikanzniveau  $\alpha = 0.05$ ) angelehnt, was bedeutet, dass eine bestimmte Erkrankung mit einem der beiden Verfahren häufiger erkannt wurde, als mit dem anderen.

**p-Wert**  $< 0,05$ : es besteht ein signifikanter Unterschied in der Erkennungshäufigkeit beider Verfahren.

Das bedeutet insbesondere:

J>H: zu viele „falsch-negative“ Ergebnisse in Hannover, d.h. die Erkrankung konnte mit dem DiaPat-Verfahren nicht immer erkannt werden

H>J: zu viele „falsch-positive“ Ergebnisse in Hannover, d.h. die Erkrankung wurde mit dem DiaPat-Verfahren häufiger diagnostiziert als sie tatsächlich vorhanden war.

**p-Wert**  $> 0,05$ : es besteht kein signifikanter Unterschied in der Erkennungshäufigkeit beider Verfahren. Allerdings die Anzahl der richtig erkannten Proben beider Verfahren trotzdem variieren, nur ist die Differenz nicht groß genug, um sich durch den  $p$ -Wert signifikant niederzuschlagen.

## 5. Ergebnisse

Es wurden 59 Proben nach Hannover geschickt, 5 Proben konnten nicht ausgewertet werden. Bei zwei dieser Proben lag die Proteinkonzentration unter der Nachweisgrenze von 2 smol. Bei zwei weiteren Proben verstopfte bei der Auswertung die Kapillare, einmal aufgrund eines zu hohen Fettgehaltes, das andere Mal durch eine zu hohe Albuminkonzentration der Probe. Bei der fünften Probe lag ein technischer Fehler der Kapillare vor, so dass eine Auswertung nicht möglich war.

Damit wurden 54 Proben ausgewertet. Die Ergebnisse der Nierenbiopsie und des DiaPat-Verfahrens wurden in Tabelle 2 gegenübergestellt.

Tabelle 2: Gegenüberstellung der Diagnosen aus Jena (Histologie) und Hannover (DiaPat)

Nr.	Init.	Alter	Diagnose der Nierenbiopsie (Jena)	J	Ergebnis Mosaiques (Hannover)	H
1	AD	67	IgA-Nephritis	3	NP, am ehesten IgA	3
2	AU	40	membranöse GN (MGN)	2	IgA + FSGS	3+4
3	AR	72	IgA-Nephritis	3	IgA	3
4	BS	40	membranöse GN Stad.I (MGN)	2	FSGS	4
5	BS	47	IgA-Nephritis	3	NP, am ehesten IgA	3
6	DS	38	IgA-Nephritis + FSGS	3+4	IgA + FSGS	3+4
7	DR	56	IgA-Nephritis	3	IgA	3
8	EJ	41	membranöse GN Typ I (MGN)	2	FSGS	4
9	EE	76	membranöse GN (MGN) + FSGS	2+4	IgA	3
10	FK	53	IgA-Nephritis + FSGS	3+4	keine NP	5
11	GA	48	benigne Nephrosklerose + FSGS	8+4	NP, sonst kein Befund	9
12	GM	64	IgA-Nephritis	3	IgA + FSGS	3+4
13	GS	38	IgA-Nephritis + MCN	3+6	IgA + FSGS	3+4
14	GP	29	Lupusnephritis IVd, Aktivität 18, Chronizität 1	1	IgA	3
15	GU	8	Inkomplette minimal-changeGN (MCN)	6	FSGS	4
16	GA	54	Lupusnephritis Typ Va, membranös	1	NP, am ehesten IgA	3
17	HP	55	FSGS	4	FSGS	4
18	HM	17	IgA-Nephritis + FSGS	3+4	IgA + FSGS	3+4
19	HL	75	Membr.GN (MGN)	2	MGN	2
-	HR	18	IgA-Nephritis + FSGS	3+4	K.E., Kapillarverstopfung, Probe zu fett	0
-	IU	79	IgA-Nephritis	3	K.E. , Kapillardefekt	0

20	JG	53	geringe IgA-Nephritis	3	IgA	3
21	JP	45	Kontrollprobe, kein pathologischer Befund	5	Kontrollprobe, kein pathologischer Befund	5
22	KP	66	Minimal-Change GN (MCN) + FSGS	6+4	FSGS	4
23	KA	39	FSGS	4	FSGS	4
24	KA	37	IgA-Nephritis	3	FSGS	4
25	KB	45	IgA-Nephritis + FSGS	3+4	IgA + FSGS	3+4
26	KH	47	IgA-Nephritis + benigne NS	3+8	IgA	3
27	MC	67	reaktive FSGS (Hochdruckschaden)	4	NP border, Nierenfunktion o.B.	9
28	MH	67	IgA-Nephritis	3	keine NP	5
29	MF	21	IgA-Nephritis	3	IgA + FSGS	3+4
30	NA	70	kein pathologischer Befund	5	kein pathologischer Befund	5
31	NC	64	membranöse GN Typ II (MGN) + FSGS	2+4	MGN + FSGS	2+4
-	NE	44	IgA-Nephritis	3	K.E., PK zu niedrig (<2smol)	0
32	PHP	39	IgA-Nephritis	3	IgA + FSGS	3+4
33	RG	73	membranöse GN Stad.I (MGN)	2	IgA	3
34	RV	52	IgA-Nephritis	3	IgA	3
35	RS	30	Lupusnephritis Typ IVa, membranös I-III	1	IgA	3
36	SM	63	FSGS, TX-GP	4+7	FSGS + IgA	4+3
37	SE	65	IgA-Nephritis	3	IgA	3
38	SH	47	IgA-Nephritis	3	IgA + FSGS	3+4
39	SG	47	IgA-Nephritis	3	FSGS	4
40	SA	36	IgA-Nephritis	3	IgA + FSGS	3+4
41	SKH	58	IgA-Nephritis	3	IgA	3
42	SM	30	Lupus Nephritis, mesangiokapillär	1	IgA	3
43	SJ	74	IgA-Nephritis	3	IgA	3
44	SH	60	IgA-Nephritis	3	FSGS	4
-	SL	46	FSGS	4	K.E., PK zu niedrig (<2smol)	0
45	SR	56	Lupus Nephritis Typ IVc	1	keine NP	5
46	SH	43	FSGS	4	FSGS	4
47	TG	60	membranöse GN Typ I,II (MGN)	2	IgA + FSGS	3+4
48	UH	59	TX-GP + FSGS	7+4	nur NP, sonst kein Befund	9
-	VN	19	Lupusnephritis IVd, Aktivität 15, Chronizität 4	1	K.E., Albuminkonz. zu hoch: Kapillarverstopfung	0
49	WR	67	IgA-Nephritis + FSGS	3+4	IgA + FSGS	3+4
50	WW	47	IgA-Nephritis + FSGS	3+4	IgA	3
51	WA	65	IgA-Nephritis	3	IgA	3
52	WM	28	MGN + FSGS + geringe IgA	4+3+2	FSGS + IgA	4+3
53	WJ	34	IgA-Nephritis + FSGS	3+4	IgA	3
54	ZA	47	Lupusnephritis Typ Ib	1	keine NP	5

Legende zu Tabelle 2: J = Diagnose (als Nummer) der histologischen Untersuchung (**J**ena)  
H= Diagnose (als Nummer) des DiaPat-Verfahrens (**H**annover)  
K.E. = Kein Ergebnis  
NP = Nephropathie  
PK = Proteinkonzentration

Die beiden Kontrollproben wurden richtig als gesund erkannt (Abbildung 8).

Die restlichen 52 Proben wurden ihrem Proteinmuster entsprechend ausgewertet (Tabelle 2).

Zum Zeitpunkt der Probenanalyse bestanden für folgende Erkrankungen spezifische Pattern:

- IgA-Nephritis
- Fokal-Segmentale-Glomerulosklerose (FSGS)
- Membranöse Nephritis (MGN)
- Minimal-Change-Nephritis (MCN)
- diabetische Nephropathie (DNP)

Für die anderen Erkrankungen (Lupusnephritis, benigne Nephrosklerose und Transplantat-Glomerulopathie) lag noch kein spezifisches Muster vor, so dass diese nach der Ähnlichkeit der Proteinzusammensetzung im Urin als die Erkrankung erfasst wurden, zu der die Proteinzusammensetzung am ehesten passte.

Dies gilt vor allem für die Fälle mit einer Lupusnephritis, deren Proteinmuster dem einer IgA-Nephritis sehr ähnlich ist. So wurden 4 der 6 Lupusnephritis-Proben als IgA-Nephritis identifiziert. Die anderen beiden Proben mit einer Lupusnephritis wurden als gesund diagnostiziert (Abbildung 9).

Abbildung 8: Pathologisch erkannte Proben und 2 Kontrollproben

**H10 \* J10 Kreuztabelle**

			J10		
			nicht als pathologisch erkannt	als pathologisch erkannt	Gesamt
H10	Nicht als pathologisch erkannt	Anzahl	2	4	6
		% von H10	<b>33,3%</b>	66,7%	100,0%
		% von J10	<b>100,0%</b>	7,7%	11,1%
	Als pathologisch erkannt	Anzahl	0	48	48
		% von H10	,0%	<b>100,0%</b>	100,0%
		% von J10	,0%	<b>92,3%</b>	88,9%
	Gesamt	Anzahl	2	52	54
		% von H10	3,7%	96,3%	100,0%
		% von J10	100,0%	100,0%	100,0%

Abbildung 8 zeigt, dass von den pathologischen Proben (n = 52) 48 mit dem DiaPat-Verfahren als pathologisch erkannt wurden. Das entspricht einer Sensitivität von 92,3 % und einer Spezifität von 100 % für die Erkennung eines pathologischen Proteinmusters einer Urinprobe.

Der Youden-Index betrug  $Y = 0,923$

Der positive Vorhersagewert für die Erkennung einer pathologischen Urinprobe liegt somit bei 100 %, der negative Vorhersagewert beträgt 33,3 %. Daraus ergibt sich, dass 7,7 % der Proben (4/52: 1x FSGS + IgA-Nephritis, 1x IgA-Nephritis und 2x Lupusnephritis) mittels Proteomanalyse nicht als pathologisch, und somit als falsch negativ, eingestuft wurden.

Daneben lässt sich aus Darstellung 1 entnehmen, dass die beiden Kontrollproben mit einer Sensitivität von 100 % auch mit dem DiaPat-Verfahren als nicht-pathologische Proben erkannt wurden.

Der McNemar Test erbrachte keine Signifikanz (p-Wert: 0,125)



Abbildung 9: Lupusnephritis (LN)

**H1 \* J1 Kreuztabelle**

			J1		Gesamt
			nicht LN	LN	
H1	Nicht LN	Anzahl	48	6	54
		% von H1	88,9%	11,1%	100,0%
		% von J1	100,0%	100,0%	100,0%
Gesamt	Gesamt	Anzahl	48	6	54
		% von H1	88,9%	11,1%	100,0%
		% von J1	100,0%	100,0%	100,0%

Abbildung 9 zeigt die Auswertung für die Proben mit einer Lupusnephritis. Diese wurden durch das neue Verfahren nicht erkannt (Sensitivität 0 %, Spezifität 100 %), da zu dem Zeitpunkt der Auswertung noch kein lupusspezifisches Proteinmuster existierte. Der Test konnte nicht durchgeführt werden.

Der Youden-Index betrug  $Y = 0$

Abbildung 10: Membranöse Glomerulonephritis (MGN)

**H2 \* J2 Kreuztabelle**

			J2		Gesamt
			Nicht MGN	MGN	
H2	nicht MGN	Anzahl	45	7	52
		% von H2	<b>86,5%</b>	13,5%	100,0%
		% von J2	<b>100,0%</b>	77,8%	96,3%
MGN	MGN	Anzahl	0	2	2
		% von H2	,0%	<b>100,0%</b>	100,0%
		% von J2	,0%	<b>22,2%</b>	3,7%
Gesamt	Gesamt	Anzahl	45	9	54
		% von H2	83,3%	16,7%	100,0%
		% von J2	100,0%	100,0%	100,0%

**Chi-Quadrat-Tests**

	Wert	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)	Punkt-Wahrscheinlichkeit
McNemar-Test Anzahl der gültigen Fälle	54	<b>,016(a)</b>	,008(a)	,008(a)

In Abbildung 10 sind die Ergebnisse für die Proben mit einer membranösen Glomerulonephritis (MGN) dargestellt. Zwei von 9 Proben mit einer MGN wurden mit dem DiaPat-Verfahren erkannt. Das ergibt eine Sensitivität von 22,2 % und eine Spezifität von 100 % für die Erkennung einer membranösen Glomerulonephritis. Der Youden-Index betrug  $Y = 0,222$ . Der positive Vorhersagewert lag bei 100 %, der negative bei 86,5 %.

Mit dem Mc Nemar-Test wurde ein p-Wert von 0,016 ermittelt, so dass ein signifikanter Unterschied in der Erkennungshäufigkeit der beiden Verfahren nachgewiesen werden konnte. Mittels Nierenbiopsie wurden alle 9/54 Proben mit einer MGN erkannt, mittels DiaPat nur 2/54, so dass das Proteomanalyseverfahren für die Erkennung einer MGN nicht so sensitiv ist wie die Nierenbiopsie. Das heißt, die Empfindlichkeit des DiaPat Verfahrens in Hannover ist signifikant niedriger als die der Nierenbiopsie.

Abbildung 11: IgA-Nephritis

**H3 \* J3 Kreuztabelle**

			J3		Gesamt
			nicht IgA	IgA	
H3	nicht IgA	Anzahl	16	5	21
		% von H3	<b>76,2%</b>	23,8%	100,0%
		% von J3	<b>64,0%</b>	17,2%	38,9%
	IgA	Anzahl	9	24	33
		% von H3	27,3%	<b>72,7%</b>	100,0%
		% von J3	36,0%	<b>82,8%</b>	61,1%
Gesamt	Anzahl	25	29	54	
	% von H3	46,3%	53,7%	100,0%	
	% von J3	100,0%	100,0%	100,0%	

Die besten Ergebnisse wurden bei der Diagnose einer IgA-Nephritis erzielt (Abbildung 11).

Es wurden 24 von 29 Proben richtig erkannt.

Dies ergibt eine Sensitivität von 82,8 % und eine Spezifität von 64,0 % für die IgA-Nephritis.

Der Youden-Index betrug  $Y = 0,468$

Der positive Vorhersagewert lag bei 72,7 %, der negative bei 76,2 %.

Der McNemar Test ergab mit einem p-Wert von 0,424 keinen signifikanten Unterschied in der Erkennungshäufigkeit der beiden Verfahren für eine IgA-Nephritis.

Abbildung 12: Fokale-Segmentale-Glomerulosklerose (FSGS)

**H4 \* J4 Kreuztabelle**

			J4		Gesamt
			nicht FSGS	FSGS	
H4	nicht FSGS	Anzahl	22	7	29
		% von H4	<b>75,9%</b>	24,1%	100,0%
		% von J4	<b>61,1%</b>	38,9%	53,7%
	FSGS	Anzahl	14	11	25
		% von H4	56,0%	<b>44,0%</b>	100,0%
		% von J4	38,9%	<b>61,1%</b>	46,3%
Gesamt	Anzahl	36	18	54	
	% von H4	66,7%	33,3%	100,0%	
	% von J4	100,0%	100,0%	100,0%	

Abbildung 12 zeigt die Auswertung für die fokale-segmentale-Glomerulosklerose (FSGS). Diese wurde durch das DiaPat-Verfahren mit einer Sensitivität und einer Spezifität von je 61,1 % richtig diagnostiziert.

Der Youden-Index betrug  $Y = 0,222$

Der positive Vorhersagewert lag bei 75,9 %, der negative bei 44,0 %.

Der McNemar Test erbrachte mit einem p-Wert von 0,189 keinen signifikanten Unterschied in der Erkennungshäufigkeit der beiden Verfahren für die fokale-segmentale-Glomerulosklerose.

Abbildung 13: Minimal-change Glomerulonephritis (MCN)

**H6 \* J6 Kreuztabelle**

			J6		Gesamt
			Nicht MCN	MCN	
H6	Nicht MCN	Anzahl	51	3	54
		% von H6	94,4%	5,6%	100,0%
		% von J6	100,0%	100,0%	100,0%
Gesamt	Gesamt	Anzahl	51	3	54
		% von H6	94,4%	5,6%	100,0%
		% von J6	100,0%	100,0%	100,0%

Abbildung 13 kann man die Ergebnisse für die 3 Proben mit einer Minimal-Change-Glomerulonephritis entnehmen. Keine der 3 Proben ist in Hannover erkannt worden, obwohl zu dem Zeitpunkt der Studie ein Proteinmuster für die MCN vorlag.

Hieraus ergeben sich eine Sensitivität von 0 % und eine Spezifität von 100 %.

Der Youden-Index betrug  $Y = 0$

Abbildung 14: Transplantat-Glomerulopathie (TX-GP)

**H7 \* J7 Kreuztabelle**

			J7		Gesamt
			nicht TX-GP	TX-GP	
H7	nicht TX-GP	Anzahl	52	2	54
		% von H7	96,3%	3,7%	100,0%
		% von J7	100,0%	100,0%	100,0%
Gesamt	Gesamt	Anzahl	52	2	54
		% von H7	96,3%	3,7%	100,0%
		% von J7	100,0%	100,0%	100,0%

Abbildung 14 entspricht der Auswertung für die Transplantat-Glomerulopathie (TX-GP).

Für sie gab es zum Zeitpunkt der Analyse noch kein spezifisches Pattern, so dass eine TX-GP mit Hilfe des DiaPat-Verfahrens nicht erkannt werden konnte

(Sensitivität 0 %, Spezifität 100 %).

Der Youden-Index betrug  $Y = 0$

Dies gilt ebenso für die in Abbildung 15 aufgezeigte benigne Nephrosklerose.

Abbildung 15: Benigne Nephrosklerose (benigne NS)

**H8 \* J8 Kreuztabelle**

			J8		Gesamt
			nicht benigne NS	benigne NS	
H8	nicht benigne NS	Anzahl	52	2	54
		% von H8	96,3%	3,7%	100,0%
		% von J8	100,0%	100,0%	100,0%
Gesamt		Anzahl	52	2	54
		% von H8	96,3%	3,7%	100,0%
		% von J8	100,0%	100,0%	100,0%

Von 52 pathologischen Proben wurden insgesamt 48 Proben mit dem DiaPat-Verfahren als pathologisch erkannt (**92,3 %** der Proben wurden richtig als pathologisch eingestuft).

Dabei wurde allerdings nur bei 31 der 48 als pathologische identifizierten Proben die richtige Diagnose gestellt (**64,5 %** Zuordnung der richtigen Diagnose für eine als krankhaft erkannte Probe) Die anderen 17 Proben wurden zwar als pathologisch eingestuft, ihnen wurde aber eine falsche Diagnose zugeordnet.

Betrachtet man nur die Proben, für deren Krankheit zum Zeitpunkt der Studie bereits ein spezifisches Proteinpattern existierte (IgA-Nephritis, Minimal-Change-Glomerulonephritis, Membranöse Nephritis und FSGS, n = 45), so kommt man zu dem Ergebnis, dass den 45 Proben in 31 Fällen die richtige Diagnose zugeordnet wurde (**68,8 %** Zuordnung der richtigen Diagnose).

In Tabelle 2 ist zu erkennen, dass drei Proben mit der Diagnose „Nephropathie“ (NP, sonst kein pathologischer Befund) bezeichnet wurden. Es wurde zwar ein pathologisches Proteinmuster festgestellt, das jedoch keiner genauen Diagnose zugewiesen werden konnte.

Die histologischen Diagnosen der Proben lauteten:

- 1.) benigne Nephrosklerose (hierfür war kein Pattern bekannt) + FSGS
- 2.) (relative) FSGS
- 3.) TX-GP (hierfür war kein Pattern bekannt) + FSGS

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine pathologische Proteinzusammensetzung im Urin mit sehr hoher Sensitivität und Spezifität (92,3 % und 100 %) von dem DiaPat-Verfahren erkannt wurde.

Das Zuordnen der richtigen Diagnose bei vorhandenem Pattern gelang in 68,8 % (31/45).

Für die Erkrankungen, für die bereits ein krankheitsspezifisches Proteinmuster vorlag, wurden folgende Ergebnisse erzielt:

<u>IgA-Nephritis:</u>	Sensitivität: 82,8 %	Spezifität: 64,0 %
	pos. Vorhersagewert: 72,7 %	neg. Vorhersagewert: 76,2 %
	Y = 0,468	

<u>FSGS:</u>	Sensitivität: 61,1 %	Spezifität: 61,1 %
	pos. Vorhersagewert: 44,0 %	neg. Vorhersagewert: 75,9 %
	Y = 0,222	

<u>Membranöse GN:</u>	Sensitivität: 22,2 %	Spezifität: 100 %
	pos. Vorhersagewert: 100 %	neg. Vorhersagewert: 86,5 %
	Y = 0,222	

## **6. Diskussion**

Nierenerkrankungen stellen in Deutschland ein relevantes Problem der Medizin dar.

Etwa 3-5 % der Bevölkerung leiden an chronischen Nierenerkrankungen (Mischak 2005).

Glomerulonephritiden (IgA-Nephritis, Minimal-Change-Glomerulonephritis, membranöse Glomerulonephritis), die fokal-segmentale-Glomerulosklerose, die hyperten-vaskulären Nierenerkrankungen und die diabetische Nephropathie gehören zu den häufigsten chronischen Nierenerkrankungen.

Eine Verschlechterung der Nierenfunktion macht sich selten durch Schmerzen oder typische Frühsymptome bemerkbar; chronische Nierenerkrankungen verlaufen oft blande.

Hinzu kommt, dass derzeit keine sensible Screeningmethode für chronische Nierenerkrankungen existiert. Die nephrologische Diagnostik basiert auf der Anamnese und den klinischen Befunden sowie verschiedenen laborchemischen Untersuchungen und bildgebenden Verfahren. Den Goldstandard für die exakte Diagnose der Glomerulonephritiden stellt nach wie vor die Nierenbiopsie dar. Allerdings ist die Hemmschwelle für die Durchführung einer solchen Untersuchung verhältnismäßig hoch, da der Eingriff mit einem Klinikaufenthalt verbunden ist und das Risiko verschiedener, teils schwerwiegender, Nebenwirkungen und Komplikationen birgt.

Die fehlenden Frühsymptome und die strenge Indikationsstellung der Nierenbiopsie führen dazu, dass chronische Nierenerkrankungen meist erst spät entdeckt werden, obwohl eine rechtzeitige Therapie einen hohen Behandlungserfolg haben könnte und Spätschäden wie ein terminales Nierenversagen oder die Dialysepflichtigkeit verhindert werden könnten.

Ein wichtiges Ziel in der Nephrologie ist es daher, ein nicht-invasives Verfahren zu etablieren, welches differentialdiagnostische Rückschlüsse auf die verschiedenen chronischen nephrologischen Erkrankungen erlaubt und in seiner Genauigkeit der Nierenbiopsie vergleichbar ist. An ein solches Verfahren werden unterschiedliche Ansprüche gestellt:

Eine Nierenerkrankung sollte im Frühstadium erkennbar sein, um eventuelle Spätschäden durch frühen Therapiebeginn verhindern zu können. Die Methode sollte eine reproduzierbare, schnelle und kosteneffektive, nicht-invasive Alternative zur Nierenbiopsie darstellen und universell unkompliziert einsetzbar sein.

Die Vorteile des Urins gegenüber anderen Materialien wie Liquor, Blut/Serum oder Gewebeprobe sind deutlich:

- leichte, nicht-invasive, schmerzfreie und risikofreie Gewinnung
- Konservierbarkeit ohne Informationsverlust bei  $-18^{\circ}\text{C}$  über ca. 10 Jahre
- Höhere Stabilität und Haltbarkeit als Blut
- Praktische Handhabbarkeit
- Urin kann vom Patienten selbst schnell und fast uneingeschränkt gewonnen werden, so dass der zeitliche und hygienische Aufwand zur Materialgewinnung deutlich niedriger ist, als bei der Gewinnung von Blut / Serum

Außerdem beinhaltet der Urin einen großen Informationsgehalt über den Status verschiedener Organe (z.B. Niere, Blase Prostata etc.). Durch einen Mix aus renalen Proteinen (ca. 70 %) und Plasmaproteinen (ca. 30 %) (Thongboonkerd und Malasit 2005) bietet der Urin die Möglichkeit, durch Proteinanalyse Aufschluss über den Gesundheitszustand des Organismus zu gewinnen. Der Urin repräsentiert sozusagen das „Endprodukt“ der Nieren, so dass die in ihm enthaltenen Polypeptide relativ genauen Aufschluss über den Status dieses Organs geben sollten (Weissingen und Haubitz 2004).

Die Messung der Proteine im Urin wird seit langem in der Diagnostik renaler Erkrankungen eingesetzt. In den letzten Jahren wird die Proteomanalyse als neue Methode der klinischen Nephrologie erprobt und hat bereits eine Reihe interessanter Befunde gezeigt (González-Buitrago et al. 2007).

Hierbei wird nicht die Quantität der Proteine im Urin untersucht, wie bei vielen herkömmlichen Methoden der Proteinuriediagnostik (z.B. Screening mittels Urinteststreifen, Koch- und Biuretmethod, Gelelektrophorese, Immunelektrophorese oder Radioimmunoassays), sondern es wird unabhängig von der Größe oder dem Vorhandensein einer Proteinurie das Urin-Proteom analysiert.

Um Biomarker für unterschiedliche nephrologische Erkrankungen zu identifizieren ist es notwendig, ein normales Proteom des untersuchten Materials, hier des Urins, zu kennen, um anschließend im Vergleich mit den Proteinmustern von Patienten mit nephrologischen Erkrankungen die Proteine herauszufiltern, die signifikant und reproduzierbar differieren.

Einen hoffnungsvollen Ansatz zur nicht-invasiven Diagnostik von Nierenerkrankungen bietet das DiaPat-Verfahren, welches im Gegensatz zu bisherigen Methoden nicht die einzelnen Bestandteile des Urins betrachtet, sondern mit Hilfe von Massenspektrometrie und Kapillarelektrophorese ein komplexes Proteinmuster identifiziert, welches sich bei verschiedenen Nierenerkrankungen in spezifischer Weise von dem Proteinmuster gesunder



Patienten unterscheiden soll. Dies schafft eine neue Plattform der In-vitro-Diagnostik und lässt die Hoffnung, „den Gesundheitszustand über Proteomanalyse zu definieren in den Bereich des Möglichen rücken“ (Mischak 2005).

Besonders wichtig ist die Evaluierung und Validierung des DiaPat-Verfahrens im Vergleich zur Nierenbiopsie.

Im Hinblick darauf wurden in dieser Studie die Urinproben von 52 Patienten mit histologisch gesicherter nephrologischer Erkrankung mittels der DiaPat - Technologie in Hannover untersucht. Die Proben wurden einen Tag nach der Biopsie gewonnen, kryokonserviert und anonymisiert an das DiaPat GmbH Labor in Hannover geschickt.

Die Ergebnisse beider Verfahren (Nierenbiopsie und Proteomanalyse durch das DiaPat-Verfahren) wurden in Tabelle 2 gegenübergestellt und mit Hilfe statistischer Tests ausgewertet. Hierbei galt die durch die Nierenbiopsie gewonnene histologische Diagnose als Referenz für die Ergebnisse der Proteomanalyse.

Bisher wurden in der Literatur keine Untersuchungen dieser Art mitgeteilt, in der im direkten Vergleich zur histologischen Diagnose, mit Hilfe des DiaPat-Verfahrens aus einem Pool unterschiedlicher chronischer Nierenerkrankungen die richtige Diagnose ermittelt werden sollte.

## **6.1 Interpretation der statistischen Auswertung**

Zur Einschätzung und Validierung eines neuen Testverfahrens sind vor allem die Maßzahlen der Sensitivität und Spezifität ausschlaggebend.

Je höher die Sensitivität, desto größer der Anteil der kranken Patienten (oder der pathologischen Proben), die auch als krank erkannt wurden und desto niedriger der Prozentsatz derjenigen Patienten, die fälschlicherweise als gesund identifiziert wurden. Von großer Bedeutung ist dies vor allem bei Erkrankungen, die chronische oder irreparable Folgeschäden verursachen, damit kein Patient übersehen wird.

Eine hohe Spezifität besagt, dass ein großer Anteil der gesunden Probanden auch als gesund erkannt wurde. Je niedriger die Spezifität, desto mehr gesunde Patienten wurden irrtümlicherweise als krank (testpositiv) eingestuft.

Die Sensitivität stellt in dieser Studie die wichtigste Maßzahl da und sollte bei ca. 80 % liegen, damit das DiaPat-Verfahren für die jeweilige Erkrankung als gute diagnostische Methode bezeichnet werden kann. Die Spezifität sollte > 50 % betragen.

Als zusammenfassende Maßzahl für Sensitivität und Spezifität gilt der Youden-Index Y, welcher, möglichst hohe positive Werte zwischen 0 und 1 ergeben sollte, um ein Verfahren als gut und valide einstufen zu können.

Der positive Vorhersagewert drückt aus, welcher Anteil der mit dem DiaPat-Verfahren als pathologisch eingestuften Patienten auch tatsächlich krank ist, mit anderen Worten, wie hoch ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein positives Testergebnis auch tatsächlich eine pathologische Probe und somit eine krankhafte Veränderung der Niere widerspiegelt.

Bei der Interpretation der statistischen Ergebnisse ist es wichtig, dass der Gesamtpool der Probanden, mit Ausnahme der beiden Kontrollproben, aus Patienten bestand, die an einer histologisch gesicherten nephrologischen Krankheit litten. Das bedeutet, dass eine als "gesund" bezeichnete Probe immer nur im Hinblick auf die jeweils untersuchte Diagnose als gesund galt, in Wahrheit aber eine andere nephrologische Erkrankung beinhaltete.

## 6.2 Diskussion der Ergebnisse

Für das **Erkennen einer pathologischen Probe** durch das DiaPat-Verfahren konnte mit Hilfe statistischer Tests eine Sensitivität von 92,3 % und eine Spezifität von 100 % ermittelt werden. Dies bedeutet, dass die Urinprobe eines Patienten mit einer Nierenerkrankung mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit als pathologisch erkannt wird.

Bereits 2002 gelang es Thongboonkerd et al. aus Urinproben von fünf gesunden Probanden mit Hilfe verschiedener Trenn- und Isolierungstechniken ein initiales Proteinmuster zu erstellen. Dies gab einen ersten Anhalt für die Möglichkeit, mittels Proteomanalyse krankheitsspezifische Proteine zu erforschen und den Mechanismus renaler Erkrankungen besser zu verstehen. In dieser Untersuchung wurden zwei unterschiedliche Techniken benutzt, um die Proteine zu isolieren: Die Azetonpräzipitation und die Ultrazentrifugation. Man stellte fest, dass sich die Azetonpräzipitation besser eignet, um saure und hydrophile Proteine zu isolieren, während durch Ultrazentrifugation vor allem basische, hydrophobe und Membranproteine gelöst werden konnten. Durch anschließende zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-Page) und MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser

Desorption Ionization - Time of Flight Mass Spectrometry) konnten die unterschiedlichen Proteine identifiziert und zu einem Muster für gesunden Urin zusammengefasst werden (Thongboonkerd et al. 2002).

In einer 2004 durchgeführten Studie wurden 57 Proben gesunder Probanden sowie 44 pathologische Urinproben untersucht: 16 Patienten mit einer Minimal-Change-Glomerulonephritis (MCN), 18 Patienten mit einer membranösen Glomerulonephritis (MGN) und 10 Patienten mit einer fokalen-segmentalen-Glomerulosklerose (FSGS). Aufgrund der geringen Anzahl an FSGS-Patienten und MCN-Patienten, wurden die Patienten mit FSGS und MCN gemeinsam betrachtet. Die CE-MS-Analyse (Kopplung von Kapillarelektrophorese und Massenspektrometrie) erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie in dieser Studie, die Geräte waren ebenfalls die gleichen. Die Untersuchung der 57 Urinproben gesunder Probanden ergab vergleichbare Proteinmuster, bestehend aus 500 - 1500 Polypeptiden mit einem Molekulargewicht von 800 - 65000 Dalton. Hieraus wurde ein Polypeptidmuster gesunder Probanden erstellt (Abb.16). Im Anschluss daran wurden die Urinproben der Patienten untersucht und untereinander verglichen. Für die einzelnen Erkrankungsgruppen ergab sich ein homologes Polypeptidmuster, das einen signifikanten Unterschied zu dem von gesunden Probanden aufwies (siehe Abb.16).

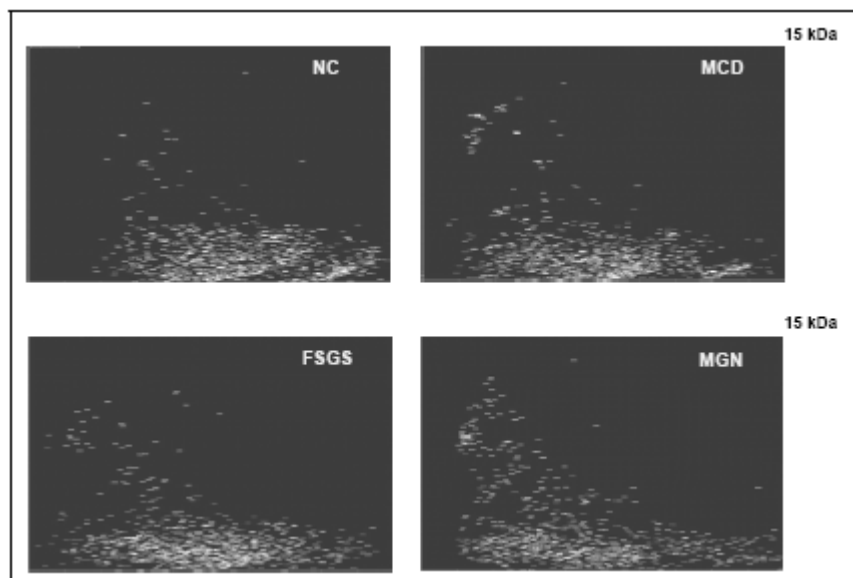


Abb.16: Polypeptidmuster im Urin für gesunde Probanden (NC), Patienten mit Minimal-Change-Glomerulo-nephritis (MCN), fokaler-segmentaler-Glomerulosklerose (FSGS) und membranöser Glomerulo-nephritis (MGN) (Weissinger et al. 2004)

Mit einer Genauigkeit von 96,5 % konnte zwischen einer gesunden Urinprobe und einer Probe eines Nierenkranken unterschieden werden. Nach einer Kreuzvalidierung ergab sich eine Sensitivität von 81,3 % und eine Spezifität von 94,3 % für die Differenzierung gesunder und pathologischer Urinproben (Weissinger et al. 2004, Haubitz et al. 2004). Daraus wurde geschlossen, dass als klinische Konsequenz zumindest bei einem Teil der Patienten auf eine Nierenbiopsie zur Diagnostik einer Glomerulonephritis verzichtet werden könnte (Haubitz et al. 2004).

Diese Ergebnisse der Differenzierung zwischen pathologischen und „normalen“, gesunden Urinproben spiegeln in etwa die in unserer Studie gewonnenen Werte wieder.

In einer weiteren 2005 veröffentlichten Publikation wurde berichtet, dass auf der Basis des DiaPat-Verfahrens mit etwa 90 %iger Erfolgsquote eine Aussage darüber getroffen werden kann, „ob bei einem Patienten eine Nierenerkrankung vorliegt oder nicht“ (Schneider 2005).

Auch dieses Ergebnis konnte durch die in dieser Studie ermittelten Ergebnisse bestätigt werden.

Das bedeutet, das DiaPat-Verfahren stellt eine zuverlässige neue, nicht-invasive Methode dar, um anhand der Proteinzusammensetzung im Urin zwischen „normalen“ Urinproben von Gesunden und Proben nephrologisch erkrankter Patienten zu differenzieren.

Herkömmliche Methoden zur Erkennung pathologischer Urinproben basieren größtenteils auf dem Nachweis einer Proteinurie (>150 mg/d) oder einer Mikroalbuminurie (>30 mg/d). Das DiaPat-Verfahren weist eine pathologische Urinprobe unabhängig von einer Proteinurie durch Analyse des veränderten Proteoms dar. Die untere Nachweisgrenze liegt bei einer Proteinkonzentration von 2 fmol.

Interessant ist dies vor allem bei der Diagnostik einer diabetischen Nephropathie, da diese meist erst durch das Auftreten einer Mikroalbuminurie erfasst wird. Mit dem DiaPat-Verfahren könnte es möglich sein, eine diabetische Nephropathie bereits in viel früherem Stadium zu diagnostizieren, wenn noch keine irreversible Schädigung der Niere zu einer Mikroalbuminurie geführt hat.

Anhaltspunkte hierfür finden sich in einer 2005 veröffentlichten Studie von Meier et al, in der Urinproben von 44 Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 und einer Krankheitsdauer von über 5 Jahren mittels CE-MS analysiert und anschließend mit Urinproben von neun gesunden Probanden verglichen wurden. Die Diabetes-Patienten wurden anhand ihrer ACR („albumin-to-creatinin-ratio“) und bezüglich einer Mikroalbuminurie in drei Subgruppen unterteilt: Eine Gruppe ohne Mikroalbuminurie (P0), eine Gruppe mit intermittierender Mikroalbuminurie (P1) und eine Gruppe mit persistierender Mikroalbuminurie (P2). Es gelang, typische

Polypeptidmuster für jede Gruppe sowie für die Kontrollproben (Gruppe K0) zu erstellen. Resultierend daraus wurden 88 Polypeptide identifiziert, mit deren Hilfe zwischen Patienten mit einer frühen diabetischen Nephropathie (P2) und Patienten ohne diabetische Nephropathie (P0) unterschieden werden konnte. Polypeptide, welche wiederholt in Proben von Patienten mit Mikroalbuminurie gefunden wurden, nicht aber in den Kontrollproben oder in den Proben der Gruppe P0 (ohne Mikroalbuminurie) könnten somit als mögliche Biomarker für eine frühe diabetische Nephropathie gelten.

Der interessanteste Aspekt dieser Studie ist allerdings die Tatsache, dass bereits das Polypeptidmuster von Typ 1 Diabetikern ohne Mikroalbuminurie (Gruppe P0) signifikante Unterschiede zu den gesunden Kontrollproben (Gruppe K0) aufwies. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass mit Hilfe der CE-MS-Technologie bestimmte Polypeptide isoliert werden, die als Risikofaktoren für die Entwicklung einer diabetischen Nephropathie gelten könnten, noch bevor sich ein irreversibler Nierenschaden durch eine Mikroalbuminurie bemerkbar macht (Meier et al. 2005).

Die wichtigste Anforderung, die an ein neues nicht-invasives Diagnoseverfahren gestellt wird, ist, dass mit Hilfe der neuen Methode differentialdiagnostisch exakt zwischen einzelnen Erkrankungen der Niere unterschieden werden kann und Aussagen über das Stadium der jeweiligen Krankheit möglich sind.

Zu diesem Zweck wurde in dieser Studie mit Hilfe der statistischen Maßzahlen Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer Vorhersagewert geprüft, mit welcher Sicherheit durch das DiaPat-Verfahren unterschiedliche chronische Nierenerkrankungen aus einem Pool von Patienten mit verschiedenen histologisch klassifizierten nephrologischen Diagnosen richtig erkannt werden.

Für einige Krankheiten (Lupusnephritis n = 6, Transplantatglomerulopathie n = 2 und benigne Nephrosklerose n = 2) bestand zum Zeitpunkt der Analyse noch kein spezifisches Proteinmuster, so dass diese mit dem DiaPat-Verfahren nicht erkannt wurden.

Die Sensitivität betrug bei allen drei Erkrankungen 0 %. Die Spezifität von 100 % zeigt, dass alle Patienten, die nicht an einer der drei Krankheiten litten als „gesund“ erkannt wurden.

Teilweise wurden die Proben der oben genannten Erkrankungen aufgrund der Ähnlichkeit des Urinproteinprofils einer Diagnose zugeordnet, für die ein Muster vorhanden war. Dies gilt vor allem für die Proteinprofile der Lupusnephritis und der IgA-Nephritis, was erklärt, warum 4 der 6 Proben mit einer Lupusnephritis fälschlicherweise als IgA-Nephritis identifiziert wurden.

Mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese konnten 2004 repräsentative 2D-Gelbilder von Urinproteinen von Patienten mit diabetischer Nephropathie, FSGS und Lupusnephritis Klasse V erstellt werden. Im Vergleich der einzelnen Gel-Bilder untereinander und im Vergleich mit nicht-pathologischen Urinproben konnte festgestellt werden, dass Leichtketten- und Schwereketten-Immunglobuline in den Proben von Patienten mit Lupusnephritis Klasse V stärker exprimiert waren, als in den Proben gesunder Probanden und den Proben von FSGS-Patienten oder Patienten mit einer diabetischen Nephropathie (Abb.17) (Thongboonkerd und Malasit 2005, Thongboonkerd 2004).

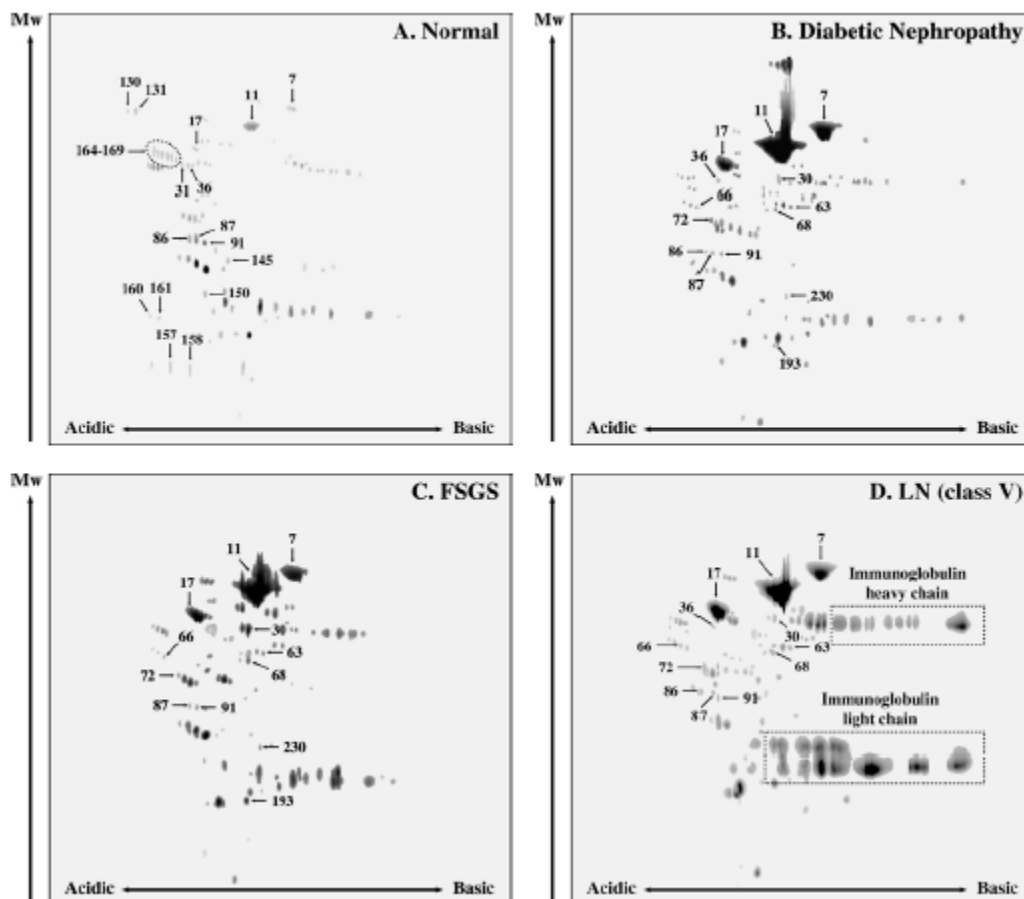


Abb.17: 2-D-Gelbilder für gesunde Urinproben (A), Urinproben von Patienten mit diabetischer Nephropathie (B), Patienten mit fokaler-segmentaler-Glomerulosklerose (C) und Patienten mit einer Lupusnephritis Klasse V(D) (Thongboonkerd 2004)

Zwar handelt es sich hierbei um 2D-Gel-Elektrophoresebilder und nicht um Proteinmuster, die mit Hilfe des DiaPat-Verfahrens gewonnen wurden, aber die unterschiedliche Ausprägung bestimmter Proteine in Urinproben von Patienten mit einer Lupusnephritis lässt darauf schließen, dass auch für diese Erkrankung ein spezifisches Pattern identifiziert werden kann. Zum Zeitpunkt unserer Studie war dies noch nicht geschehen, womit oben genannte Ergebnisse erklärt sind.

Nach persönlicher Mitteilung von Herrn Stefan Wittke besteht seit 2005 ein DiaPat-Proteinmuster für die Lupusnephritis, welches allerdings bis jetzt noch nicht publiziert wurde. Es ist auch nicht möglich, unsere Proben nachmessen zu lassen, da die Methode inzwischen optimiert wurde und ein Vergleich mit den Ergebnissen zu anderen Erkrankungen somit nicht mehr möglich wäre.

Nach einer Nierentransplantation kommt es häufig zu Transplantatabstoßungen. Eine nicht-invasive Methode wie die DiaPat-Technologie wäre von großem Vorteil für die Früherkennung einer solchen Abstoßungsreaktion, welche bezüglich der Pathogenese bisher nur durch eine Nierenbiopsie festgestellt werden kann. Zum Zeitpunkt der Probenanalyse unserer Studie lag noch kein spezifisches Proteinpattern für eine akute oder chronische **Transplantatglomerulopathie** vor.

In einer Untersuchung von Weissinger et al wurden Urinproben von 20 Patienten analysiert, die 2 Monate zuvor eine Nierentransplantation erhalten hatten. Obwohl keiner der Patienten zu diesem Zeitpunkt Komplikationen entwickelt hatte, unterschieden sich die Proteinmuster der Proben von denen gesunder Probanden. Die Gründe hierfür liegen wahrscheinlich in einer gestörten tubulären Funktion und / oder Filtration, können aber auch in Zusammenhang mit der Immunsuppression oder anderen medikamentösen Einflüssen stehen. Gleichzeitig wurden Urinproben von Patienten mit histologisch gesicherter Abstoßungsreaktion untersucht. Es resultierte ein Proteinmuster, welches sich signifikant von dem unterschied, welches aus den Proben der Patienten ohne Komplikationen gewonnen wurde. Somit konnten Polypeptide identifiziert werden, die auf eine Abstoßungsreaktion hindeuten, was impliziert, dass die CE-MS-Technologie auch in der Nachsorge von organ- / nieren-transplantierten Patienten zu einer wichtigen Methode werden könnte (Weissinger und Mischak, 2004).

Auf der Internetseite des DiaPat-Institutes, die Informationen über das Verfahren für Patienten und fachkundige Personen enthält, wurde 2004 bestätigt, dass durch regelmäßige DiaPat-Tests ein Transplantat-Monitoring möglich ist.

([www.mosaiques-therapeutics.com/diapatcms](http://www.mosaiques-therapeutics.com/diapatcms): „Durch den DiaPat®-Tests ist der frühzeitige Beginn des Abstoßungsprozesses, besonders von so genannten "stummen" Abstoßungsprozessen, schon im Ansatz zu erkennen. Damit ist sehr viel früher als bisher eine Behandlung möglich. Da lediglich eine Urinprobe erforderlich ist, muss keine Transplantatbiopsie durchgeführt werden. Mittels regelmäßiger DiaPat®-Tests kann der Zustand des transplantierten Organs regelmäßig und nebenwirkungsfrei kontrolliert werden“).

In einer Untersuchung von Wittke et al. wurde 2005 das DiaPat-Verfahren als nicht-invasive Methode zur Diagnostik von Transplantatabstoßungsreaktionen nach Nierentransplantation geprüft. Hierzu wurden die Urinproben von nierentransplantierten Patienten untersucht: 19 Patienten mit klinischer (n=6) oder subklinischer (n=13) Abstoßungsreaktion, 10 Patienten mit urogenitaler Infektion und 29 Patienten ohne Anhalt für eine der beiden Komplikationen. Zusätzliche wurden 66 Urinproben von gesunden Patienten ohne Nierentransplantation in die Studie aufgenommen, um durch Erstellen eines „normalen“ Proteinmusters die Unterschiede in den Mustern zwischen transplantierten und nicht-transplantierten Patienten aufzuzeigen. Um ein allgemeines Transplantat-Muster zu erstellen wurden die Proben der transplantierten Patienten zunächst analysiert, ohne zwischen Abstoßungsreaktion, Infektion und Nicht-Abstoßung zu unterscheiden (Abb.18 ).

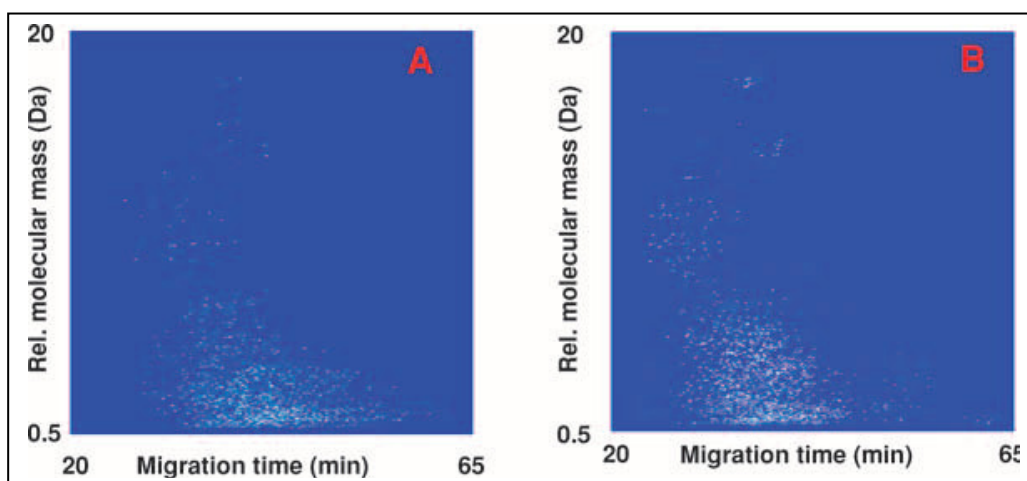


Abb. 18: Counterplots (Proteinmuster) von gesunden nicht-transplantierten Probanden (A) und Patienten mit Nierentransplantat unabhängig von einer Abstoßungsreaktion oder einer Infektion (B) (Wittke et al. 2005)



Der Vergleich der beiden Proteinmuster erlaubte die Identifizierung von 17 Polypeptiden zur Differenzierung zwischen gesunden Probanden und nierentransplantierten Patienten.

Im Vergleich der 58 Proben von Patienten nach einer Nierentransplantation konnten außerdem Muster identifiziert werden, mit denen zwischen akuter tubulointerstitieller Abstoßung, urogenitaler Infektion und Patienten ohne eine der beiden Komplikationen unterschieden werden kann. Weitere Studien sind notwendig, um ein Muster für vaskuläre Abstoßungsreaktionen zu finden und um zu prüfen, ob die Veränderung des Urin-Proteoms schon vor den histologischen Veränderungen auftritt (Wittke et al. 2005).

Von großem Interesse waren in dieser Studie die Ergebnisse für die Erkrankungen, für die es zum Analysezeitpunkt ein spezielles Proteinmuster gab:

- Minimal-Change-Glomerulonephritis
- FSGS
- Membranöse Glomerulonephritis
- IgA-Nephritis

Die **Minimal-Change-Nephritis** (MCN, n=3) wurde in keinem der drei Fälle erkannt, was sich in einer Sensitivität von 0 % widerspiegelt. Die Spezifität von 100 % besagt, dass alle nicht an einer MCN erkrankten Probanden als „gesund“ eingestuft wurden. Dies bedeutet, dass mit Hilfe des DiaPat-Verfahrens eine Minimal-Change-Nephritis mit 100 %iger Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden konnte, andererseits eine MCN nicht erkannt wurde.

Die **membranöse Glomerulonephritis** (MGN, n = 9) wurde in unserer Studie nur in 22,2 % der Fälle (2 von 9 Proben) richtig erkannt (Sensitivität 22,2 %). Zusammen mit einer Spezifität von 100 % bedeutet das, dass alle im Bezug auf eine MGN gesunden Patienten auch als gesund erkannt wurden, allerdings wurden zusätzlich pathologische Proben in 77,8 % der Fälle fälschlicherweise als testnegativ (gesund) eingestuft. Von den als testpositiv (an einer MGN leidend) eingestuften Patienten waren alle Patienten auch tatsächlich an einer membranösen Glomerulonephritis erkrankt, was sich in einem positiven Vorhersagewert von 100 % widerspiegelt. In der Zusammenschau der Ergebnisse lässt sich also sagen, dass eine MGN zwar durch das DiaPat-Verfahren in unserer Studie nicht gut erkannt wurde, wenn der Test positiv ausfiel bestand allerdings eine 100 %ige Sicherheit, dass der Patient auch tatsächlich an einer MGN litt.

In einer 2004 veröffentlichten Untersuchung von Neuhoff et al. wurden zwei unterschiedliche Methoden genutzt, um aus Urinproben von acht Patienten mit einer membranösen Glomerulonephritis (MGN) und acht gesunden Probanden krankheitsspezifische Proteinmuster zu extrahieren: die SELDI-MS („surface enhanced laser desorption ionization“) und, wie in unserer Studie, die Kopplung von Kapillarelektrophorese und Massenspektrometrie (CE-MS) mit anschließender Auswertung der Ergebnisse durch die MosaiquesVisu-Software. Es stellte sich heraus, dass mit Hilfe der SELDI-Technik nur etwa drei potentielle Biomarker für die membranöse Glomerulonephritis gefunden werden konnten, während es mittels der CE-MS-Methode gelang, etwa 200 potentielle Biomarker der MGN zu identifizieren. Die Analyse derselben Probe durch die SELDI-Technik war also weniger akkurat und ergab ein wesentlich weniger komplexes Proteinmuster. Außerdem erfordert diese Technik eine hohe Proteinkonzentration. Unter anderen Untersuchungsbedingungen könnte es zwar möglich sein, mit der SELDI-MS die gleiche Anzahl an Biomarkern zu extrahieren, allerdings wäre dies wesentlich zeitaufwendiger und nur fraglich reproduzierbar, so dass für die Analyse einer großen Anzahl von unterschiedlich exprimierten Proteinen (hier im Falle einer membranösen Glomerulopathie) die CE-MS als Methode der Wahl gilt (Neuhoff et al. 2004).

Proben von Patienten mit einer **fokal-segmentalen-Glomerulosklerose** (FSGS, n = 18) wurden mit der Proteomics-Methode mit einer Sensitivität und einer Spezifität von jeweils 61,1 % richtig diagnostiziert. Die fokale-segmentale-Glomerulosklerose wurde in 11 von 18 Fällen richtig erkannt. Allerdings kann man Tabelle 2 entnehmen, dass die Diagnose „FSGS“ auch mehrere Male festgestellt wurde (vor allem zusätzlich zu einer IgA-Nephritis), obwohl sie nach dem Biopsieverfahren nicht vorlag. Das bedeutet, dass es im Hinblick auf die FSGS zu viele falsch-positive Ergebnisse und nicht genügend richtig-positive Ergebnisse gab, was durch die relativ niedrige Spezifität zum Ausdruck kommt. Der relativ hohe negative Vorhersagewert mit 75,9 % bringt zum Ausdruck, dass viele der testnegativen Proben (Proben, die im Bezug auf FSGS als gesund eingestuft wurde) auch tatsächlich gesund waren. Eine spezielle Studie zur fokalen-segmentalen-Glomerulosklerose steht derzeit kurz vor der Veröffentlichung.

Die besten Ergebnisse für die Erkennung einer chronischen Nierenerkrankung konnten bei der **IgA-Nephritis** (n = 29) erzielt werden. Hier wurden von den 29 Proben 27 richtig erkannt. Dies bedeutet eine Sensitivität von 82,8 % und eine Spezifität von 64,0%.

Die IgA-Nephritis ist die am weitesten verbreitete chronische glomeruläre Erkrankung bei Erwachsenen. Sie geht in etwa 30% in eine chronische Niereninsuffizienz über, in etwa 5 % entwickelt sich ein terminales Nierenversagen (Haubitz et al. 2005).

Die exakte Ätiologie und Pathogenese der Erkrankung ist bis heute nicht genau geklärt.

Um eine „Protein-Mappe“ für die IgA-Nephritis zu erstellen, wurde 2006 in einer Studie von Park et al Mittelstrahlurin von 13 Patienten mit einer histologisch gesicherten IgA-Nephritis und 12 Kontrollproben gesammelt und mittels 2- DE (zweidimensionale Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese: die Trennung der Proteine erfolgt anhand des isoelektrischen Punktes (pI) und des Molekulargewichts (MG)) und MALDI-TOF MS analysiert und verglichen. Dabei konnten etwa 216 Protein-Spots (Punkte, die bei der Gelelektrophorese einzelne Proteinspezies darstellen) identifiziert werden, die bei den Proben der IgA-Patienten anders ausgeprägt waren, als in den Proben der gesunden Probanden. Anhand dieser Ergebnisse konnte ein Proteinmuster für die IgA-Nephritis erstellt werden, die insgesamt aus 84 Spots bestand, die 59 Proteine repräsentierten (Park et al. 2006).

In einer 2005 veröffentlichten Studie von Haubitz et al wurde der Urin von 45 IgA-Nephritis-Patienten mittels CE-MS-Kopplung auf bestimmte Proteinmuster analysiert. Die Ergebnisse wurden anschließend mit denen von 57 gesunden Personen und 13 Patienten mit einer membranösen Glomerulonephritis verglichen. Hierbei fand sich ein deutlicher Unterschied zwischen dem Polypeptidmuster der IgA-Patienten und dem, welches bei einer Patienten mit einer MGN oder bei gesunden Probanden gefunden wurden, so dass man von einem spezifischen „IgA-Proteinmuster“ sprach (Haubitz et al. 2005). Die Urinproben der IgA-Patienten beinhalteten, selbst im Bereich physiologischer Proteinausscheidung, ein Proteinmuster, das sich signifikant von denen unterschied, die aus Kontrollproben und Urinproben von Patienten mit einer membranösen Glomerulonephritis gewonnen wurden. Es gelang, 22 Polypeptide mit sehr hoher diskriminativer Eigenschaft zu identifizieren, anhand derer eindeutig zwischen gesunden Probanden und Patienten mit IgA-Nephritis oder MGN

unterschieden werden konnte. Allerdings war es nicht möglich, mit Hilfe dieser Marker zwischen den beiden Erkrankungen IgA-Nephritis und MGN zu differenzieren, so dass sie nur als Marker einer renalen Schädigung im Allgemeinen angesehen werden konnten.

Die Differenzierung zwischen IgA-Nephritis und gesunden Probanden erfolgte mit einer Sensitivität von 100 % und einer Spezifität von 90 %. In der Unterscheidung zwischen IgA-Nephritis und MGN konnten eine Sensitivität von 77 % und eine Spezifität von 100 % erreicht werden. Der Vergleich mit Proteinmustern, die in früheren Analysen von Patienten mit Minimal-Change-Nephritis, FSGS und diabetischer Nephropathie gewonnen wurden, ergab eine Sensitivität und Spezifität von jeweils 100 %.

Die Werte für Sensitivität und Spezifität bezüglich der IgA-Nephritis sind in dieser Studie mit 82,8 % und 64,0 % niedriger als die im oben genannten Versuch, allerdings ist zu beachten, dass unser Untersuchungsgut sich aus 52 pathologischen Proben verschiedener Erkrankungen zusammensetzte (Lupusnephritis n=6, membranöse Glomerulonephritis n=9, IgA-Nephritis n=29, FSGS n=18, Minimal-Change-Nephritis n=3, Transplantat-glomerulopathie n=2 und benigne NS n=2), so dass aus einem anonymen Pool unterschiedlicher nephrologischer Erkrankungen mittels DiaPat die richtige Diagnose ermittelt werden sollte. In der Studie von Haubitz et al wurden zunächst 45 Patienten mit einer bekannten IgA-Nephritis bezüglich ihres Proteinmusters im Urin untersucht, anschließend wurden die Muster mit denen anderer bekannter Erkrankungen verglichen. Die höhere Sensitivität ist damit zu erklären, dass die Differenzierung zwischen gesunden Probanden und IgA-Patienten in der Studie von Haubitz et al einfacher war, da sich die Proteinmuster von gesunden Urinproben und Urinproben von Patienten mit einer IgA-Nephritis deutlicher voneinander unterscheiden, als die Proteinmuster der einzelnen chronischen Nierenerkrankungen untereinander.

Dies bestätigt auch die Tatsache, dass für die Erkennung einer pathologischen Probe höhere Werte für Sensitivität und Spezifität ermittelt wurden, als für die differenzierte Diagnostik der unterschiedlichen nephrologischen Erkrankungen.

Diese Überlegungen bezüglich der Zusammensetzung des Patientenpools gelten auch für die Ergebnisse der anderen untersuchten Erkrankungen. Es ist zu vermuten, dass Sensitivität und Spezifität für die einzelnen Diagnosen besser ausgefallen wären, wenn sie nur von gesunden Probanden differenziert worden wären.

Auch der Vergleich zwischen den Proteinmustern bekannter Erkrankungen wie der IgA-Nephritis, MCD, FSGS und DNP stellt niedrigere Anforderungen an das neue Verfahren, als die Identifizierung unterschiedlicher Diagnosen aus einem Pool unbekannter nephrologischer

Krankheiten, was die hohen Werte für Sensitivität und Spezifität von 100 % in der Studie von Haubitz et al im Gegensatz zu denen in unserer Studie erklärt. In dieser Studie wurde nicht die Diagnose einer chronischen Nierenerkrankungen evaluiert, sondern die Möglichkeit geprüft, mit dem Verfahren der Proteomanalyse definierte chronisch-nephrologische Erkrankungen aus einem Pool herauszufiltern und richtig zu erkennen.

Interessant ist die Tatsache, dass in der Studie von Haubitz et al. von einer Veränderung der Proteinmuster nach Therapie berichtet wird. Dies könnte implizieren, dass das Proteinmuster im Urin auch einen therapeutischen Effekt widerspiegelt und das DiaPat-Verfahren so zu Kontrolle und Beurteilung therapeutischer Maßnahmen herangezogen werden kann (Haubitz et al. 2005).

Die Schlussfolgerungen von Haubitz et al, dass die Proteomanalyse mittels CE-MS-Kopplung die Identifikation eines IgA-Patterns erlaubt und somit die Abgrenzung pathologischer Urinproben von gesunden und eventuell die Abgrenzung zu anderen chronischen renalen Erkrankungen, kann durch unsere Untersuchungen nur teilweise bestätigt werden.

Zum Zeitpunkt unserer Studie befand sich das DiaPat-Verfahren noch im Anfangsstadium. Inzwischen wurde eine optimierte Methode der Probenpräparation etabliert.

In früheren Studien zeigte sich, dass der Albumingehalt in Urinproben von Patienten mit schweren nephrologischen Erkrankungen und Proben von älteren Patienten mit verminderter renaler Funktion besonders hoch ist. Mit der ursprünglichen Technik, die auch in unserer Studie verwendet wurde, resultierte daraus bei der Proteomanalyse oft ein prominenter Albuminfleck, neben dem fast keine anderen Proteine mehr zu erkennen waren (Abb.19 A).

Daher wurde nach einer Möglichkeit gesucht das Albumin, welches in hohem Maße an andere Proteine und Peptide gebunden ist, während der Präparation durch Ultrazentrifugation zu eliminieren, ohne dabei die Konzentration der anderen Polypeptide zu beeinflussen und dadurch wertvolle Informationen zu verlieren. Dies gelang mit Hilfe zweier Zusätze: dem Agens UREA und dem Detergenz SDS (Theodorescu et al. 2005).

Um einen direkten Vergleich zwischen der neuen und der herkömmlichen Technik zu gewinnen, wurden in der Untersuchung von Theodorescu et al. 515 Urinproben mit beiden Verfahren analysiert. Während bei vielen Proben mit der alten Methode gar keine oder nicht zufriedenstellende Ergebnisse ermittelt wurden, konnten mit Hilfe der verbesserten Probenpräparation vor allem Proben mit einem hohen Albumingehalt schnell, leicht und mit reproduzierbarem Ergebnis untersucht werden. Mittels Ultrazentrifugation konnten wesentlich

mehr Polypeptide identifiziert werden, vor allem die Anzahl der Peptide mit einer Masse <20 kDa nahm zu.

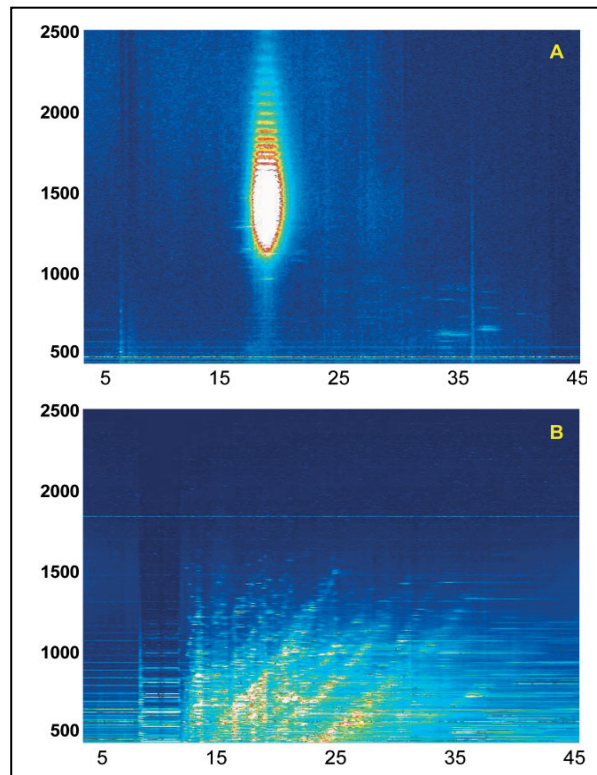


Abb.19: Daten einer CE-MS Analyse der Urinprobe eines Patienten, der an einer membranösen Glomerulonephritis litt. A: Analyse einer Probe mittels der herkömmlichen Methode. Neben dem prominenten Albuminfleck sind nur etwa 150 zusätzliche Proteine zu erkennen  
B: Analyse der Probe mittels Ultrazentrifugation, es sind etwa 1400 Polypeptide zu erkennen (Theodorescu et al. 2005)

### 6.3 Schlussfolgerung

Die Proteomanalyse ist eine neue Herausforderung der heutigen Forschung und der klinischen Nephrologie. In den letzten Jahren hat sich die Identifikation von Biomarkern auf der Basis der Proteomanalyse von Urinproben in verschiedenen Gebieten der Medizin bewährt.

Die Erfassung immer mehr körpereigener Proteine und die Untersuchungen hinsichtlich ihrer Veränderung bei pathologischen Prozessen führt zum besseren Verständnis der Physiologie und Pathophysiologie verschiedener Organe und der Pathogenese vieler Krankheiten. Die begründete Hoffnung in die Proteomanalyse und das in Hannover entwickelte DiaPat-Verfahren besteht nicht nur darin, in Zukunft nicht-invasiv und frühzeitig krankhafte Veränderungen der Nieren und anderer Organe erfassen und damit invasive Verfahren wie die Nierenbiopsie ablösen zu können, sondern auch darin, einen neuen Weg der Therapiekontrolle und der Patientennachsorge zu beschreiten. So könnte früher therapeutisch interveniert werden, um nicht nur das Fortschreiten von Krankheiten zu unterbinden, „sondern auch eine Rückbildung der Schädigung zu erreichen“ (Haubitz et al. 2004).

Obwohl die Proteomanalyse im Vergleich zu herkömmlichen Methoden viele Vorteile hat, gibt es auch limitierende Aspekte. Es ist schwierig höhermolekulare Proteine ohne vorgeschaltete Schritte wie beispielsweise die proteolytische Verdauung abzubilden. Hierfür eignet sich besser die 2D-Gelelektrophorese, allerdings erfordert sie einen hohen Zeitaufwand, so dass sich daraus keine klinische Relevanz ergibt (Mischak 2005).

Außerdem besteht bei der 2D-Gel Proteinanalyse die Schwierigkeit, dass es nicht möglich ist, integrale Membranproteine und membranassoziierte Proteine darzustellen. Hierzu greift man besser auf konventionelle immunologische Methoden zurück (Thongboonkerd 2004).

„Im Moment können wir nur die Spitze des Eisberges der renalen Proteine im Urin untersuchen“ (Thongboonkerd und Malasit 2005).

Unsere Ergebnisse beweisen, dass die DiaPat-Technologie ein geeignetes Verfahren zu Differenzierung zwischen pathologischen und gesunden Urinproben darstellt. Es gibt bereits unterschiedliche diagnostische Methoden, mit denen durch Nachweis einer geringen Proteinurie >150 mg/d oder einer Mikroalbuminurie >30 mg/d eine pathologische Urinprobe identifiziert werden kann. Wichtiger ist daher, ob das neue Verfahren ermöglicht, differentialdiagnostisch zwischen einzelnen chronischen Nierenerkrankungen zu unterscheiden. Im Hinblick auf die diabetische Nephropathie ist es vor allem interessant, ob nach der Untersuchung von Meier et al. 2005, bereits **vor** Auftreten einer Mikroalbuminurie /

Proteinurie, und damit in einem sehr frühen Krankheitsstadium ohne irreversible Organschädigung mit Hilfe der Proteomanalyse durch das DiaPat-Verfahren Urinproben als pathologisch erkannt werden. Dies birgt die Hoffnung, in Zukunft früher intervenieren und damit Spätschäden verhindern zu können.

Zum Zeitpunkt unserer Probenanalyse und Datenauswertung war es leider noch nicht möglich, korrekt und mit hoher Zuverlässigkeit mittels DiaPat zwischen einzelnen chronischen Nierenerkrankungen zu unterscheiden. Das lag zum einen daran, dass für einige Diagnosen wie Lupusnephritis, Transplantat-Glomerulopathie und benigne Nephrosklerose noch kein spezielles Proteinmuster vorlag, zum anderen an der Tatsache, dass sich das neue Verfahren noch in der Anfangsphase befand. Inzwischen ist die Technologie weiterentwickelt worden (Theodorescu et al. 2005). Seit 2005 existiert auch ein Proteinmuster für den systemischen Lupus erythematodes, allerdings wurde dieses noch nicht publiziert. Auch in der Nachsorge von nierentransplantierten Patienten hat das Verfahren große Fortschritte gemacht (Wittke et al. 2005).

Wir konnten mit unseren Ergebnissen beweisen, dass das DiaPat-Verfahren eine vielversprechende Möglichkeit darstellt, durch Proteomanalyse Biomarker im Urin zu identifizieren und anhand von krankheitsspezifischen Proteinmustern die Diagnostik nephrologischer Erkrankungen zu ermöglichen.

Allerdings kann DiaPat nach den in dieser Studie gewonnenen Ergebnissen nur als ergänzende Methode zur Nierenbiopsie eingesetzt werden, da die Zuverlässigkeit und Exaktheit des Verfahrens zum Zeitpunkt unserer Studie noch nicht dem Standard der Nierenbiopsie entsprechen. Es ist nicht gelungen mittels DiaPat alle histologisch gesicherten Diagnosen richtig zu erkennen oder gar die einzelnen Krankheitsstadien zu bestimmen. Diese Einschätzung unterstützt ein zum gleichen Zeitpunkt mit Herrn Professor Hermann Haller, Hannover, geführtes Interview der Zeitschrift CARDIOVASC. Er bestätigt, dass zwar schon sehr gute Ergebnisse mit hoher Trennschärfe besonders für die IgA-Nephritis vorliegen, auf die Nierenbiopsie zu diesem Zeitpunkt aber noch nicht verzichtet werden kann, so dass die DiaPat-Technologie lediglich im Rahmen klinischer Studien eingesetzt wird, da es „für den routinemäßigen Einsatz des Verfahrens im Alltag“ noch zu früh sei (Neumeier 2005).



In einem 2007 veröffentlichten Artikel über die Rolle der Proteomanalyse zur Erkennung und Therapieevaluierung der diabetischen Nephropathie und kardiologischer Erkrankungen wie der koronaren Herzkrankheit wurde bestätigt, dass die Proteomanalyse heute bereits als „aussagekräftiges diagnostisches Hilfsmittel eingesetzt werden kann“ und in Zukunft durch weitere internationale Studien die individuelle Diagnostik und Therapie auf der Grundlage der Proteomanalyse möglich gemacht werden könnte (Mischak et al 2007).

Auf der aktuellen Internetseite des DiaPat-Institutes wird bestätigt, dass „eine exakte Stadienbestimmung“ sowie eine genaue Differenzialdiagnose der einzelnen Nephropathieformen / -unterformen (z.B. der verschiedenen IgA-Nephropathien) derzeit noch nicht möglich ist. Somit stellt das DiaPat-Verfahren eine Ergänzung zu den bisherigen diagnostischen Methoden dar und kann nur als Alternative zu einer Nierenbiopsie eingesetzt werden, falls ein genauer histologischer Befund für die Therapie nicht relevant ist.

Es ist abzusehen, dass das DiaPat-Verfahren in naher Zukunft eine wichtige Rolle in der klinischen Nephrologie spielen wird. Um die Methode universell einsetzbar zu machen und dem Wunsch, eines Tages die Nierenbiopsie durch dieses nicht-invasive Verfahren ersetzen zu können ein Stück näher zu kommen, sind weitere Studien dieser Art und eine enge Zusammenarbeit zwischen Klinikern und Analysespezialisten notwendig (Fliser et al. 2007). Vor einem Einsatz der Proteomanalyse in der Klinik ist die Einhaltung standardisierter Protokolle für Entnahme, Lagerung, Vorbereitung und Zentrifugation der Proben Voraussetzung, um reproduzierbare Proteommuster zu erstellen, da die individuellen Muster durch präanalytische Einfluss- und Störgrößen beeinflusst werden (Ceglarek et al. 2005).

Wichtig ist hierbei auch, dass ein einheitlicher Studienaufbau gefunden wird, um die Ergebnisse der einzelnen Analyse vergleichbar zu machen. Ein Vorschlag hierfür wurde bereits veröffentlicht (Mischak et al. 2007).

## **7. Literaturverzeichnis**

Bischoff R., Luider T.M.: Methodological advances in the discovery of protein and peptide disease markers, J. Chromatogr. B 2004; 803: 27-40

Ceglarek U., Fiedler G.M., Baumann S., Lembcke J., Leichtle A., Thiery J.: Klinische Proteomics – Chance für die Labormedizin?, Laborwelt 2005; 6: 15-15

De Zeeuw D. : Albuminuria, not only a cardiovascular/renal risk marker, but also a target for treatment ? , Kidney Int. 2004; 66: (Suppl. 92) pp.S2-S6

Fliser D., Novak J., Thongboonkerd V., Ariles A., Jankowski V., Girolami M.A., Jankowski J., Mischak H.: Advances in urinary proteome analysis and biomarker discovery, J Am Soc Nephrol. 2007; 18: 1057-1071

Frei U., Schober-Halstenberg H.-J.: Nierenersatztherapie in Deutschland, Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland, QUASI NIERE 2005 / 2006, Jahresvergleiche 1995-2005,

Geppert H.-G., von zur Mühlen C., Mischak H.: Proteomanalyse zur Erkennung und Evaluierung der koronaren Herzkrankheit, journal of preventive medicine 2007; 3: 160-168

Göke B., Parhofer K., Otto C.: Diabetes mellitus, Urban & Fischer Verlag, München Jena, 1. Auflage 2002, S. 129 -131

González-Buitrao J.M., Ferreira L., Loranzo I.: Urinary proteomics, Clin Chim Acta 2007; 375: 49-56

Grabensee B.: Nephrologie, Thiemeverlag 2002, 2. Auflage, S.103-124

Grünewald F.: Nuklearmedizinische Diagnostik und Therapie – Aktuelle Bedeutung für die klinische Medizin-, Hessisches Ärzteblatt 2001; 3: 105-111

- Guggenmoos-Holzmann J., Wernecke K.-D.: Medizinische Statistik, Blackwell  
Wissenschafts-Verlag Berlin Wien, 1996; S. 149
- Haubitz M., Fliser D., Haller H.: Proteomanalyse- eine neue Perspektive für die klinische  
Diagnostik, Dt. Ärzteblatt 2004; 101: A1514-1517
- Haubitz M., Wittke S., Weissinger E.M., Walden M., Rupprecht H.D., Floege J., Haller H.,  
Mischak H.: Urine protein patterns can serve as diagnostic tools in patients with  
IgA nephropathy, Kidney Int. 2005; 67: 2313-2320
- Herold G.: Innere Medizin – Eine vorlesungsorientierte Darstellung, Gerd Herold, Köln 2006,  
S. 529-535
- Kaiser Th., Kamal H., Rauk A., Kolb H-J., Holler E., Ganser A., Hertenstein B., Mischak H.,  
Weissinger E.: Proteomics applied to the clinical follow-up of patients after  
allogenic haematopoietic stem cell transplantation, BLOOD 2004; 104: 340-349
- Kaulen H.: Nierenleiden oft vernachlässigt – Noch viele Mängel bei der Vorbeugung und  
Früherkennung, Frankfurter Allgemeine Zeitung 2005; 220: 1
- Klotz Th., Zafari A.M., Schupp M.: Innere Medizin in Frage und Antwort, Urban und Fischer  
Verlag, München Jena, 2005; S.179-180
- Kolch W., Mischak H., Chalmers M.J., Pitt A., Marshall A.G.: Clinical proteomics : a  
question of technology, Rapid Commun Mass Spectrom. 2004; 18: 2365-2366
- Korfei M., Ruppert C., Schmitt S., Wygrecka M., Markart P., Lang G., Preissner K.T., Seeger  
W., Günther A.: Proteomanalyse von Lungengewebe von Patienten mit  
Idiopathischer Pulmonaler Fibrose (IPF), Med Klin 2007; 102: Abstract-Band  
237 S.26
- Kuhlmann U., Walb D., Luft F.C.: Nephrologie, Pathophysiologie – Klinik – Praxis, Thieme  
Verlag, Stuttgart, 1998; S.23-25

Lohr M., Keppler B.: Innere Medizin, Kompendium für Studium und Klinik, Urban & Fischer Verlag, München Jena, 4. Auflage 2005, S. 535- 540

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 Typ 1 diabetic adolescents with early diabetic nephropathy by a novel combined proteome analysis, *Journal of Diabetes and its Complications* 2005; 19: 223-232

Mischak H., Apweiler R., Banks R.E., Conaway M., Coon J., Dominiczak A., Ehrlich J.H.H., Fliser D., Girolami M., Hermjakob H., Hochstrasser D., Jankowski J., Julian B.A., Kolch W., Massy Z.A., Neusuess C., Novak J., Peter K., Rossing K., Schanstra J., Semmes O.J., Theodorescu D., Thonhboonkerd V., Weissinger E.M., Van Eyk J.E., Yamamoto T.: Clinical proteomics: A need to define the fields and to begin to set adequate standards, *Proteomics Clin. Appl.* 2007; 1: 148-156

Mischak H., Pantke U., Fliser D.: Proteomanalyse zur Erkennung, Früherkennung und Therapieevaluierung der diabetischen Nephropathie, *Journal of preventive medicine* 2007; 1: 411-417

Mischak H.: Proteomanalyse mittels CE-MS in der klinischen Diagnostik, *Laborwelt* 2005; 6: 11-15

Naujoks H., Wanner C.: Proteinurie, *Der Internist*, 1998; 39: 955-967

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 Commun. Mass Spectrom.* 2005; 18: 149-156

Neumeier J.: Nachgefragt bei Prof. Hermann Haller, Hannover – Die diabetische Nephropathie schneller entdecken?, *CARDIOVASC*, 2005; 4: 21

- Park M.R., Wang E.H., Jin D.C., Cha J.H., Lee K.h., Yang C.W., Kang C.S., Choi Y.J.:  
Establishment of a 2-D human urinary proteomic map in IgA-Nephropathy,  
Proteomics 2006, 6: 1066-1076
- Pechula Thut M., Uehlinger D., Steiger J., Mihatsch M.J.: Die Nierenbiopsie – ein  
unverzichtbares Routineverfahren der modernen Nephrologie, Therapeutische  
Umschau, 2002; 59: 110-116
- Remuzzi G., Chiurciu C., Ruggenti P.: Proteinuria prediciting outcome in renal disease:  
Nondiabetic nephropathies (REIN), Kindey Int. 2004; 66 (Suppl. 92) pp.  
S. 90-96
- Sarre H., Gessler U., Seybold D.: Nierenkrankheiten – Physiologie, Pathophysiologie,  
Untersuchungsmethoden, Klinik und Therapie, Thieme Verlag, Stuttgart New-  
York, 1988; S.151-155
- Scherberich J.: Proteinurieformen in der nicht invasiven Diagnostik von Nierenerkrankungen,  
DBI Der Bayr. Int., 1998; 18: 80-88
- Schneider R.E.: Nicht-invasive Diagnose mit DiaPat anstelle von Nieren-Biopsien –  
Früherkennung von Nephropathien durch Urinproben, Brandenburgisches  
Ärzteblatt, 2005; 15: 319-320
- Schneider R.E.: Pattern statt schneiden, ÄP Urologie, 2004; 6
- Schott P, Singer SS, Kögler H, Neddermeier D, Leineweber K, Brodde OE, Regitz-Zagrosek  
V, Schmidt B, Dihazi H, Hasenfuss G.: Pressure overload and neurohumoral  
activation differentially affect the myocardial proteome. PROTEOMICS 2005;  
5: 1372-1381.
- Sökeland J., Schulze H., Rübber H.: Urologie, Verstehen - Lernen - Anwenden, Thieme  
Verlag 2004, 13. Auflage, S. 366-369

- Stein G., Ritz E.: Diagnostik und Differentialdiagnostik der Nierenerkrankungen, Gustav Fischer Verlag, Jena Stuttgart, 2.Auflage 1995
- Stein G., Schmechel H.: Diabetes und Niere, Z. ärztl. Fortbild. Qual. Sich. 2002; 96:175-182
- Theodorescu D., Fliser D., Wittke S., Mischak H., Krebs R., Walden M., Ross M., Eltze E., Bettendorf O., Wlufing C., Semjonow A.: Pilot study of capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry as a tool to define potential prostate cancer biomarkers in urine, Electrophoresis 2005; 26: 2797-2808
- Theodorescu D., Wittke S., Ross M.M., Walden M., Conaway M., Just I., Mischak H., Frieson H.F.: Entdeckung und Validierung von neuen Proteinbiomarkern für Urothelkarzinome: eine prospektive Studie, Lancet Oncol 2006; 7: 230-240
- Thongboonkerd V.: Proteomics in Nephrology: Current Status and Future Directions, Am J Nephrology 2004 ; 24: 360-378
- Thongboonkerd V., Klein J.B.: Proteomics in Nephrology, Karger Verlag, Basel 2004; 141: 292-307
- Thongboonkerd V., Malasit P.: Renal and urinary proteomics: Current applications and challenges, Proteomics 2005; 5: 1033-1042
- Thongboonkerd V., McLeish K.R., Arthur J.M., Klein J.B.: Proteomic analysis of normal human urinary proteins isolated by acetone precipitation or ultracentrifugation, Kidney Int. 2002; 62: 1461-1469
- Ulbricht K., Schmidt D., Ott U., Gerth J., Stein G., Wolf G.: Vergleich klinisch angewandter Clearanceverfahren zur Einschätzung der Nierenfunktion bei Niereninsuffizienz, Nieren- und Hochdruckkr. 2006; 35: 305-315
- Weissinger E.M., Mischak H.: Proteom Analysis Applied Towards Early Diagnosis of Renal Diseases and Transplant-Monitoring, Tx Med 2004; 16: 2-7

Weissinger E.M., Wittke S., Kaiser T., Haller H., Bartel S., Krebs R., Golovko I., Rupprecht H.D., Haubitz M., Hecker H., Mischak H., Fliser D.: Proteomic patterns established with capillary electrophoresis and mass spectrometry for diagnostic purposes, *Kidney Int.* 2004; 65: 2426-2434

Wittke S., Fliser D., Haubitz M., Bartel S., Krebs R., Hausadel F., Hillmann M., 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, *J. Chromatogr. A*, 2003; 1013: 173-181

Wittke S., Haubitz M., Walden M., Rohde F., Schwarz A., Mengel M., Mischak H., Haller H., Gwinner W.: Detection of Acute Tubulointerstitial Rejection by Proteomic Analysis of Urinary Samples in Renal Transplant Recipients, *American Journal of Transplantation* 2005; 5: 2479-2488

Wüthrich R.P.: Das abnorme Urinsediment, vom Befund zur Diagnose. *Schweiz Med Forum*, 2001; 40: 990-997

## **8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis**

Abbildung 1:	Beckman Coulter Kapillarelektrophorese
Abbildung 2:	Beckman Coulter Kapillarelektrophorese
Abbildung 3:	Das Massenspektrometer
Abbildung 4:	Kapillarelektrophorese und Massenspektrometer
Abbildung 5:	Skizzierte Darstellung der DiaPat-Technologie
Abbildung 6:	Analysendarstellung einer gesunden Probe (Kolch et al. 2004)
Abbildung 7:	Kreuztabelle
Abbildung 8:	Als pathologisch erkannte Proben + 2 Kontrollproben
Abbildung 9:	Lupusnephritis (LN)
Abbildung 10:	Membranöse Glomerulonephritis (MGN)
Abbildung 11:	IgA-Nephritis
Abbildung 12:	Fokale-Segmentale-Glomerulosklerose (FSGS)
Abbildung 13:	Minimal-Change-Glomerulonephritis (MCN)
Abbildung 14:	Transplantat-Glomerulopathie (TX-GP)
Abbildung 15:	Benigne Nephrosklerose (benigne NS)
Abbildung 16:	Plot von NC, MGN, FSGS und MCN (Weissinger et al. 2004)
Abbildung 17:	Gel-Bilder (Thongboonkerd 2004)
Abbildung 18:	gesund + TX-GP (Wittke et al. 2005)
Abbildung 19:	Vergleich zwischen neuer und alter Analysetechnik (Theodorescu et al. 2005)
Tabelle 1:	Patientencharakteristik
Tabelle 2:	Gegenüberstellung der Diagnosen aus Jena (Histologie) und Hannover (DiaPat)



## Anhang

Tabelle 1: Patientencharakteristik

Init.	Nr.	Alter	M/w	Biopsie- datum	RR	Gew. (kg)	Größe (cm)	Kreatinin ( $\mu\text{mol/l}$ )	Urinsediment	Proteinurie (g/d)	Medikamente	NTX	Diagnose der Biopsie
EE	9	76	w	26.03.03	138/45	55,3	152	266	zu wenig Erythrozyten, reichlich mit Bakterien beladene Epithelzellen	0,781 davon 0,595 Albumin	Allopurinol 300      0-0-1/2 Delix 5                    1/2-0-1/2 Fosamax 10mg      1x/Woche Decortin 20mg      1-0-0		membranöse GN mit reaktiver FSGS
WA	51	65	m	10.02.03	105/60	70	177	381	massenhaft Erythrozyten, 30% dysmorphe Zellen, wenige Bakterien	0,821	Allopurinol 300      1-0-0 Prednisolon 30mg    1x/d Blemaren              1-0-0		IgA-Nephritis
SE	37	65	m	09.09.03	160/100	k.A.	k.A.	289	Unauffällig	k.A.	Lorzaar 50            1-0-0-1 Norvasc 5            1-0-0-1 Triampur              1-0-0		IgA-Nephritis
SR	45	56	w	05.02.03	121/66	83	153	111	einige Erythrozyten, 50% dysmorphe Zellen reichlich Leukozyten + Bakterien,	0,26	Concor 5              1-0-0 Norvasc 5              1-0-0		Lupus Nephritis Typ Ivc
WJ	53	34	m	11.06.03	131/69	93,5	181	82	viele Erythrozyten, 70% dysmorph, hyaline + granulierte Zylinder	vorh. aber kein Wert zu finden	Lisinopril 10mg      1-0-0		IgA-Nephritis mit FSGS, 25% Fibrose

Fortsetzung Tabelle 1: Patientencharakteristik

Init.	Nr.	Alter	M/w	Biopsie- datum	RR	Gew. (kg)	Größe (cm)	Kreatinin (µmol/l)	Urinsediment	Proteinurie (g/d)	Medikamente	NTX	Diagnose der Biopsie
RS	35	30	w	23.04.03	134/77	68	166	119	viele Erythrozyten, Fettkörnchenzellen, hyaline + granulierte Zylinder	9,506	Urbason 10 Torasemid 10 Aquaphor 40	1-0-0 1-0-0 1/2-0-0	Lupusnephritis Typ IVa, membranös I-III,
FK	10	53	m	16.05.03	160/100	135	185	80	viele Erythrozyten 70% dysmorph, hyal.+ granul. Zylinder,	0,882	Prednisolon 75mg Delix 5	1-0-0 1-0-1	IgA-Nephritis mit FSGS, 15% Fibrose
KH	26	47	m	27.05.03	136/85	70	176	525	zu viele Erythrozyten	1,59 davon 0,675 Albumin	Delix 5 Folsan 5 Aquaphor 40	1-0-0 1-0-0 1-0-0	IgA-Nephritis mit benigner NS, 50% Fibrose.
ZA	54	47	w	21.01.03	129/56	68,5	166	89	unauffällig	1,8g/d davon 0,4g Albumin	Decortin 15mg	1-0-0	Lupusnephritis Typ IIb
SJ	43	74	w	Apr 03	170/80	59	163	121	unauffällig	k.A.	Sandimmun 25mg-0-35mg Cell-Cept 500 Furosemid Dilzem 120ret. Enalapril 5 Cynt 0,3	1-0-1 1-0-1-1 2-0-2 1-0-1	ja  IgA-Nephritis, benigne NS, Cd4 schwach positiv

Fortsetzung Tabelle 1: Patientencharakteristik

Init.	Nr.	Alter	M/w	Biopsie- datum	RR	Gew. (kg)	Größe (cm)	Kreatinin (µmol/l)	Urinsediment	Proteinurie (g/d)	Medikamente	NTX	Diagnose der Biopsie
GA	11	48	w	25.08.03	107/65	68	159	209	unauffällig	0,57	Sandimmun 50           1-0-1 BelocZok                1/2-0-1/2 Dilzem 60               1-0-1 Unat10                   1-0-0 Delix 2,5                0-1-0 Actraphane30/70   20-0-12 IE		benigne Nephrosklerose mit FSGS
AR	3	72	m	25.02.03	160/69	84	184	330	40% dysmorphe Erythrozyten	1,9	Fosinorm 10            2-0-0 Novarsc 5               1-0-1 BelocZok                1-0-1/2 Cynt 0,3                1-0-1		IgA-Nephritis
JG	20	53	m	14.05.03	175/100	82	172	92	4-5 Erythrozyten 70% dysmorph, 2-3Leukozyten	2	Concor 5                1-0-0		benigne NS, geringe IgA-Nephritis
RG	33	73	m	21.10.03	110/70	86	164	258	Unauffällig	16	Sandimmun 100mg   1-0-1-0 Decortin 25mg        1-0-0-0 Actraphane 30/70   18-0-0-0 IE Torem 10mg Aquaphor 10 mg		membranöse GN Stad.I
BS	5	47	m	06.11.03	147/78	106	176	107	60% dysm. Erythrozyten im Januar 03	0,431g/d davon 0,362g Albumin	Lisinopril 5            1-0-1 Sulfasalazin           2x2 Tbl/d		IgA-Nephritis

Fortsetzung Tabelle 1: Patientencharakteristik

Init.	Nr.	Alter	M/w	Biopsie- datum	RR	Gew. (kg)	Größe (cm)	Kreatinin (µmol/l)	Urinsediment	Proteinurie (g/d)	Medikamente	NTX	Diagnose der Biopsie
SH	46	43	m	05.11.03	137/92	68	174	88	hyaline Zylinder	0,190g/d davon 0,117g Albumin	Sandimmun 100mg 1-0-1 Unat10 1/2-0-0 Diovan 160 0-0-1/2		FSGS, ultrastrukturelle diab. GS
GM	12	64	m	27.10.03	220/100	60	156	108	Erythrozyten	6,08g/d davon 5,32g Albumin+ 0,26 IgG	Quadropril 1-0-1 BelocZok 1-0-1 Diovan 80 2-0-0 Bayotensin 1-0-0 Cynt 0,4 1-0-1 Lonolox 2,5 1-0-1		IgA-Nephritis, teils diffuse, teils nodul. diab. GS, Nephrosklerose
AU	2	40	m	23.10.03	130/70	128	179	85	Unauffällig	5,125g/d davon 3,9g Albumin	Aquaphor 10 1-0-0 Delix 2,5 1-0-1		membranöse GN
SA	40	36	m	18.11.03	120/70	90	178	218	massenhaft Erythrozyten	0,75	Aquaphor 10 1-0-0 Delix 5 1-0-0		IgA-Nephritis
MC	27	67	w	02.09.03	130/90	98	158	179	zu wenig Erythrozyten, 60%dysmorph hyaline Zylinder, reichlich Bakterien	0,278	Lisihexal 20 0-0-1 Endoxan 50 1-1-0		reaktive FSGS, DD: Z.n. nekrotisierender GN
SKH	41	58	m	02.08.03	150/78	70	180	631	einige Erythrozyten, <5% dysmorph	1,109 davon 0,165 Albumin	Decortin 20mg 1-0-0 Delix 5mg 1-0-1/2 Unat 10 1-0-0 Concor 5 1/2-0-1/2 Aquaphor 20 1-0-0		IgA-Nephritis, benigne NS, geringe interstitielle Nephritis

Fortsetzung Tabelle 1:Patientencharakteristik

Init.	Nr.	Alter	M/w	Biopsie- datum	RR	Gew. (kg)	Größe (cm)	Kreatinin (µmol/l)	Urinsediment	Proteinurie (g/d)	Medikamente	NTX	Diagnose der Biopsie
AD	1	67	m	18.08.03	165/94	100	182	264	massenhaft Erythrozyten, 60% dysmorph	5,608 davon 3,864 Albumin	Prednisolon 60mg 1-0-0 Unat 20 1-0-0 Aquaphor 20 1-0-0 Delix 5 1-0-1 Concor 5 1/2-0-1/2		fokal segm. nekrot. extrakapill. prolifer. GN, IgA-Nephritis
KB	25	45	w	02.09.03	107/57	101,6	165	282	reichlich Erythrozyten, 5% dysmorph	8,54	Cibacen5 0-0-1/2 Zyloric300 1/2-0-0	ja	IgA-Nephritis mit FSGS, Tubulusatrophie, 50% interstit. Fibrose
GP	14	29	w	28.06.02	145/93	71,2	173	204	reichlich Erythrozyten 45% dysmorphe Zellen, Fettkörnchenzellen	6,59g/d davon 5,078g Albumin	Delix 5 1-1-1 Unat 10 1-0-0 Aquaphor 10 1/2-0-0 Concor 5 1-0-0		Lupusnephritis IVd
HP	17	55	m	17.10.02	129/75	89	181	206	zu wenig Erythrozyten, keine Bakterien	k.A.	Prednisolon 7mg 1-0-0 Torem 10 1-0-0 Ebrantil 60 1-1-1 Delix 5 1-0-1		FSGS
VN	x	19	w	17.08.02	160/80	k.A.	k.A.	243	Unauffällig	7,7	Delix 5 1-0-1 Aquaphor 40 1-0-0 BelocZok 1-0-0 Norvasc 5 1-0-1 Prednisolon 60mg 1-0-0 Unat 200 1/4-0-1/4		Lupusnephritis IVd
JP	21	45	w	09.01.02	137/79	88	168	64	zu wenig Erythrozyten, reichlich Bakterien	k.A.	Keine		kein pathologischer Befund

Fortsetzung Tabelle 1: Patientencharakteristik

Init.	Nr.	Alter	M/w	Biopsie- datum	RR	Gew. (kg)	Größe (cm)	Kreatinin ( $\mu\text{mol/l}$ )	Urinsediment	Proteinurie (g/d)	Medikamente	NTX	Diagnose der Biopsie
PHP	32	39	m	03.07.02	138/80	84	169	134	60% dysmorphe Zellen, 2 Erythrozyten, 1 Leukozyt	2,3	Norvasc 5 Xanef 20	2-0-0-2 1-0-0	IgA-Nephritis
WW	50	47	m	02.10.02	156/90	65	168	185	Erythrozyten, 50% dysmorphe Zellen hyal. + granul. Zylinder, Akanthozythen	2,775	Delix 5 Cynt 0,3 Norvasc 5 Unat 10	1-0-1 1-0-1 1-0-1 1-0-0	IgA-Nephritis mit FSGS
GU	15	82	w	11.12.02	138/72	67	159	83	zu wenig Erythrozyten	3,91g/d davon 2,62 Albumin	Aquaphor 40 Delix 5 Locol 40	1-0-0 1-0-1 0-0-0-1	inkomplette Minimal- Change GN
SH	44	60	w	06.02.02	135/78	76	172	70	reichlich Erythrozyten, <5% dysmorph keine Bakterien	6,91	Urbason 4 Cellsept 500 Sandimmun 75 Dilzem 120 Delix 5 Torem Cor	1-0-0 1-0-1 1-0-1 1-0-1 1-0-1 1-1-0	ja IgA-Nephritis
UI	x	79	w	10.01.02	163/80	70,1	161	110	einige Leukozyten, keine Bakterien, dysm. Erythrozyten und Akanthozyten	0,645 davon 0,35 Albumin	BelocZok Delix 5	1-0-0 0-0-1	IgA-Nephritis, Purpura Schönlein- Hennoch
SL	x	46	m	23.01.02	150/90	93	171	119	Unauffällig	1,168	BelocZok Imurek 25mg Prednisolon 50mg	1/2-0-1/2 2-0-1 1-0-0	FSGS
KA	24	37	w	21.01.02	115/70	64	164	73	reichlich Erythrozyten, 90% dysmorphe Zellen, vereinzelt Bakterien, Akanthozyten	1,718	Prednisolon 7,5 Imurek 50	1-0-0 1-0-1	IgA-Nephritis

Fortsetzung Tabelle 1: Patientencharakteristik

Init.	Nr.	Alter	M/w	Biopsie- datum	RR	Gew. (kg)	Größe (cm)	Kreatinin (µmol/l)	Urinsediment	Proteinurie (g/d)	Medikamente	NTX	Diagnose der Biopsie	
UH	48	59	m	10.12.02	155/89	71	173	152	unauffällig	0,994	Cellsept 750 Prednisolon 5 Dilzem 120 ret. BelocZok Diovan 160 Prograf Cynt 0,2	1-0-1 1-0-0 1-0-1 0-0-0-1 1-0-0 1-0-1 0-0-1	ja	TX-Glomerulitis, TX-GP mit FSGS
EJ	8	41	m	27.10.02	130/80	80	180	88	zu wenig Erythrozyten, hyal.+ granuliert Zylinder	2,95	Prednisolon 7,5 Vioxx 25 MTX 20	1-0-0 1-0-1 1xWoche i.v.		membranöse GN TypI
RV	34	52	m	14.10.02	137/68	41,9	161	371	Fettkörnchenzellen, hyaline Zylinder, viele Erythrozyten	7,357g/d davon 5,219 Albumin	Delix 5 Aquaphor 40 Cynt 0,2 Norvasc 5 BelocZok	1-0-1 1-0-0 1-0-1 1-0-1 1/2-0-1/2		IgA-Nephritis
TG	47	60	m	11.10.02	130/91	107	188	134	einige Erythrozyten, 50% dysm. Zellen, hyaline + granuliert Zylinder	11,798	Torem 10 Aquaphor 20 Concor 5 Delix 5 Locol 80	2-0-0 1-0-0 1-0-1 1-0-0 0-0-1		membranöse GN TypI,II
NE	x	44	w	28.10.02	150/69	82	158	158	25 Erys, 70% dysm. Zellen, 25 Leukozyten + Akanthozyten	1,5g/d Makro- proteinurie	Delix 5 Cynt 0,2 BelocZok	1-0-1 0-0-1 1/2-0-0		IgA-Nephritis
SG	39	47	m	02.08.02	138/68	102	176	280	mehrere Erythrozyten, hyaline Zylinder, 15-20% dysmorphe Zellen	0,98	Diovan 160 Delix 10 Zyloric 300 Nephrotrans	1-0-0 1-0-1/2 1/2-0-0 1-0-1		IgA-Nephritis

Fortsetzung Tabelle 1:Patientencharakteristik

Init.	Nr.	Alter	m/w	Biopsie- datum	RR	Gew. (kg)	Größe (cm)	Kreatinin ( $\mu\text{mol/l}$ )	Urinsediment	Proteinurie (g/d)	Medikamente	NTX	Diagnose der Biopsie
NA	30	70	m	08.05.02	147/80	91	175	79	unauffällig	keine	Concor 5 Cynt 0,3 Disalunil 25	2-0-1 1-0-1 1/2-0-0	kein pathologischer Befund
MH	28	67	m	26.07.02	100/39	89,7	176	347	unauffällig	0,12g/d davon 0,03 Albumin	Delix 5 Concor 2,5 Aquaphor 40 Locol 80	1-0-1 1-0-0 1-0-0 1-0-0	IgA-Nephritis
SM	36	63	w	07.06.02	140/85	64,4	164	160	mehrere Leukozyten, 45% dysmorphe Zellen, einige Erythrozyten	k.A.	Enalapril 10 Diltiazem 240 ret Tacrolimus 1	0-0-1 0-1-0 2-0-2	ja FSGS, Collapsing GP, TX-GP
SH	38	47	m	24.04.02	130/90	100	174	83	10 Erythrozyten, 60% dysmorphe Zellen, Leukozyten	2g/d davon 1,3g Albumin,	Delix 10 Nebilet 5	1-0-1/2 0-0-1/2	IgA-Nephritis
KP	22	66	w	12.07.02	113/69	63	151	77	zu wenig Erythrozyten, hyaline + granuliert Zylinder	große Proteinurie	Unat 10mg Aquaphor 10mg Delix 5	1/2-0-0 1-0-0 1/2-0-1/2	Minimal-Change GN mit FSGS
HR	x	18	m	04.01.02	125/75	63	171	70	reichlich Erythrozyten, 45% dysm. Zellen, hyal.+ granul. Zylinder, Akanthozyten	8,5 unselektiv	Delix 2,5 Unat 20 Aquaphor 20	1-0-1 1-0-0 1-0-0	IgA-Nephritis mit FSGS
BS	4	40	w	19.03.02	120/72	112,6	174	70	2 Erythrozyten, 4 Leukozyten, z.T. dysmorphe Zellen	6,8g/d davon 6,2g Albumin+ 0,16 IgG	Diovan 160 Nebilet Unat 20 Aquaphor 40 Cynt 0,2	1-0-1 1-0-0 1-0-0 1-0-0 1-0-0-1	membranöse GN Stad.I



Fortsetzung Tabelle 1: Patientencharakteristik

Init.	Nr.	Alter	m/w	Biopsie- datum	RR	Gew. (kg)	Größe (cm)	Kreatinin ( $\mu\text{mol/l}$ )	Urinsediment	Proteinurie (g/d)	Medikamente	NTX	Diagnose der Biopsie
NC	31	64	w	29.11.02	140/65	80	170	99	70% dysm. Zellen	3,6g/d davon 2,06g Albumin	Unat 20 BelocZok Delix 2,5	1-0-0 1-0-0 1-0-1	membranöse GN Typ II mit FSGS
DR	7	56	m	27.03.02	176/90	77,5	170	306	vermehrt Erythrozyten, 50% dysmorphe Zellen	2,124g/d davon 1,129g Albumin	Sandimmun 125 Torem 10 BelocZok Cynt 0,3 Norvasc 5 Delix 5	1-0-1 1-0-0 1-0-1/2 0-0-1 1-0-0 1-0-1	IgA-Nephritis
GA	16	54	w	06.12.01	100/70	72	173	77	Erys, Akanthozyten, 60% dsym Zellen	1,89	Prednisolon 5 Vioxx 25 Aquaphor 10	1-0-0 1-0-1 1-0-0	Lupusnephritis Typ Va, membranös
HL	19	75	w	05.12.01	190/97	57	158	828	Fettkörnchenzellen, reichlich amorphe Kristalle	4,521	Cardular 4 Torem 10 Concor 5 Cynt 0,3 Delix 5 Aquaphor 10	0-0-0-1 1-0-0 1-0-1/2 1-0-1 1-0-1 1-0-0	Membranöse GN Stad. I,II,III n. Ehrenreich und Churg
HM	18	17	m	26.11.01	150/90	59	176	240	Erythrozyten, 70-80% dysm. Zellen, Fettkörnchenzellen, Akanthozyten, Zylinder	10,6g/d davon 7,9g Albumin	Delix 5 Norvasc 5 Prednisolon 30mg	1-0-1 1-0-1	IgA-Nephritis mit FSGS
DS	6	38	m	15.01.01	130/80	125	198	73	reichlich Leukozyten 60% dysmorphe Zellen	3,4	Prednisolon 10 Vioxx 25	1-0-0 1-0-0	IgA-Nephritis mit FSGS

Fortsetzung Tabelle 1: Patientencharakteristik

Init.	Nr.	Alter	m/w	Biopsie- datum	RR	Gew. (kg)	Größe (cm)	Kreatinin ( $\mu\text{mol/l}$ )	Urinsediment	Proteinurie (g/d)	Medikamente	NTX	Diagnose der Biopsie
GS	13	38	m	01.11.01	134/67	90	181	83	reichliche Zellzerfallprodukte, granulierte Zylinder	6,28	Delix 5 2-0-0 Aquaphor 20 1-0-0 Unat 200 1/4-0-0 Prednisolon 90mg		IgA-nephritis, miminal-Change-GN
WM	52	28	w	10.11.01	130/75	65,3	176	55	reichlich Erythrozyten, 20% dysm. Zellen	6,85	Aquaphor 40 1-0-0 Decortin 20 1/2-0-0 Delix 1,25 1-0-1		Minimal-Change-GN, FSGS, geringe IgA-Nephritis
MF	29	21	m	23.11.01	155/88	62	173	169	viele Erythrozyten, 60% dysm. Zellen, hyaline + granul. Zylinder, Fettkörnchenzellen	ca.3g/d davon 2,1g Albumin	Cynt 0,3 1-0-1 Dilzem 120ret. 1-0-1 Delix 2,5 1-0-1 Prednisolon 5mg Prograf 3mg 1-0-1	ja	IgA-Nephritis, Tubulusschaden
WR	49	67	w	16.10.01	140/80	83	164	61	Unauffällig	6,1	Zocor 20 0-0-0-1 (nach Entl. auf 0-0-0-2) Delix 5 1-0-1 Micardis 80 1-0-0 BelocZok 1-0-0 Novarsc 5 1-0-0 Disalunil 25 1-0-0		IgA-Nephritis, FSGS
KA	23	39	m	11.12.01	145/105	77	185	164	mehrere Erythrozyten 50% dysmorphe Zellen, keine Bakterien	3,7 davon 2,72 Albumin	Prograf 1mg 1-0-1 Cellsept 500 1-0-0-1 Torem 200 1/2-0-0 Dilzem 120ret 1-0-0-1 Ranitidin 150 0-0-1	ja	FSGS

Fortsetzung Tabelle 1: Patientencharakteristik

Init.	Nr.	Alter	m/w	Biopsie- datum	RR	Gew. (kg)	Größe (cm)	Kreatinin (µmol/l)	Urinsediment	Proteinurie (g/d)	Medikamente	NTX	Diagnose der Biopsie
SM	42	30	m	12.06.03	150/90	114,9	189	118	reichlich Erythrozyten 70% dysm. Zellen, Akanthozyten, Fettkörnchenzellen, massenhaft Bakterien	7,643 davon 4,21 Albumin	Furosemid 40mg Prednisolon 7,5mg Celecoxib 200mg Xipamid 20mg	1-1-0 1-0-0 1-0-0 1-0-0	Lupus Nephritis IVd , mesangiokapillär mit FSGS

Legende zu Tabelle 1:

Init. = Initialen  
m/w = männlich / weiblich  
Kr. = Kreatinin  
GS = Glomerulosklerose  
hyal. = hyalin / -e  
z.T. = zum Teil  
diab. = diabetisch / -e  
nekrot. = nekrotisch / -e  
interstit. = interstitiell / -e

Nr. = Nummer des Patienten  
NTX = Nierentransplantation  
Clear. = Clearance  
Leukoz. = Leukozyten  
granul. = granulozytär / -e  
i.v. = intravenös  
nodul. = nodulär / -e  
prolif. = proliferativ / -e  
Z.n. = Zustand nach

RR = Blutdruck  
K.A. = keine Angabe  
unkorr. = unkorrigiert / -e  
n. = nach  
dysm. = dysmorph / -e  
s.c. = subcutan  
segm. = segmental / -e  
extrakapill. = extrakapillär / -e  
GN = Glomerulonephritis

## **Danksagung**

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. G. Stein und Frau Dr. U. Ott (Klinik für Innere Medizin III, Abteilung Nephrologie) für ihre freundliche und uneigennützig Unterstützung und die Möglichkeit, diese Dissertation zu erarbeiten.

Herrn Dr. Vollandt danke ich für seine grosse Geduld und Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten.

Außerdem danke ich den Mitarbeitern der Klinik für Innere Medizin III für die Möglichkeit der Datenerhebung.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für ihre tatkräftige Unterstützung und den emotionalen Rückhalt, die mir sowohl die Verfassung dieser Arbeit als auch das erfolgreiche Beenden meines Studiums ermöglicht haben.

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. med. G. Stein, Dr. med. U. Ott, Dr. Vollandt,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers

## Lebenslauf

Name: Müller  
Vorname: Nora - Maria

Geburtsdatum: 31.05.1981  
Geburtsort: Frankfurt / Main

### Schulbildung

1987-1991 Friedrich – Fröbel - Grundschule  
1991-2000 Friedrich – Schiller - Gymnasium Frankfurt  
  
2000 Abitur

### Hochschulausbildung

seit Oktober 2000 Medizinstudium an der FSU-Jena

08 / 2002 Physikum  
08 / 2003 1. Staatsexamen  
08 / 2005 2. Staatsexamen  
  
2005 – 2006: Praktisches Jahr:  
10 / 2005-02 / 2006 Inner Medizin (Nordhausen)  
02 / 2006-06 / 2006 Allgemeine- / Gefäßchirurgie (Bad Salzungen)  
06 / 2006-09 / 2006 Neurologie (Jena)

12 / 2006 3.Staatsxamen und Erteilung der Approbation als Ärztin

Verfassen einer Doktorarbeit an der Klinik für Innere Medizin III, Nephrologie, Jena zum Thema:

„Proteomics in der Diagnostik renaler Erkrankungen“

### Beruflicher Werdegang

seit 01.06.2007 Assistenzärztin am Spital Saanen in der Schweiz (Chirurgie)