

„Serumproteom-Untersuchung bei Dialysepatienten“

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

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

von Julia Hallbauer
geboren am 21.02.1983 in Leipzig

Gutachter

1. Frau PD Dr. H. Rhode, Jena
2. Univ. Prof. Dr. G. Wolf, Jena
3. Prof. Dr. M. Ketteler, Coburg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 05.01.210

Meiner Familie

Abkürzungsverzeichnis

1D	1. Dimension
2D	2. Dimension
AGE	Advanced glycation end products
ACN	Acetonitril
CRP	C-reaktives Protein
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminoethyl
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EPO	Erythropoetin
ESI-MS	Electro-Spray-Ionisation-Massenspektrometrie
ESRD	End stage renal disease
FSU	Friedrich-Schiller-Universität
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
HPLC	High pressure liquid chromatography
HF	High-Flux
HMW	high molecular weight
KfH	Kuratorium für Dialyse und Nierentransplantation e.V.
LF	Low-Flux
LMW	low molecular weight
MALDI-MS	Matrix-Assisted-Laser-Desorbition-Ionisation-Massenspektrometrie
MG	Molekulargewicht
MW	Mittelwert
m/z	Masse/Ladung
OeDTR	Österreichisches Dialyse- und Transplantationsregister
Pat.	Patient
ppm	parts per million
pmp	per million population
rpm	rounds per minute
SD	Standardabweichung
vs	versus
TFA	Trifluoressigsäure

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Chronische Nierenerkrankungen	3
2.2	Epidemiologische Gesichtspunkte	4
2.3	Dialysetherapie	6
3	Ziele der Arbeit	10
4	Methodik	11
4.1	Geräte, Materialien und Chemikalien	11
4.1.1	Geräte	11
4.1.2	Materialien	12
4.1.3	Chemikalien	12
4.2	Probennahme	13
4.3	Analyse der Serumproben	15
4.3.1	1. Dimension: Größenausschlusschromatographie	15
4.3.1.1	Kalibrierung und Lagerung der Superdex-Säule	16
4.3.2	2. Dimension: Ionenaustauschchromatographie	17
4.3.3	Tryptischer Verdau	18
4.3.4	Matrix-Assisted-Laser-Desorbition-Ionisation-Massenspektrometrie (MALDI-MS)	19
4.3.5	Computerprogramm für die Analyse der Peptide-Mass-Fingerprints	20
4.3.6	Liquid-Chromatography-Electro-Spray-Ionisation-Massenspektrometrie (LC-ESI-MS/MS)	21
4.3.7	Quantitative Analyse der gefundenen Serumproteine	22
5	Ergebnisse	23
5.1	1. Dimension: Größenausschlusschromatographie	23
5.1.1	Ergebnisse der UV-Absorbanzmessungen	23
5.1.2	Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen	29
5.1.3	Peptide-Mass-Fingerprint	30
5.2	Ergebnisse nach der 2. Dimension - Ionenaustauschchromatographie	33
5.2.1	Proteinidentifikation mittels LC-ESI-MS/MS	36
5.2.1.1	Proteinidentifikation: Vorkommen in allen Proben	39
5.2.1.2	Proteinidentifikation: Vorkommen in einzelnen Poolsätzen	41

6	Diskussion	50
6.1	Allgemeine Auswirkungen der Niereninsuffizienz	50
6.2	Grunderkrankungen	50
6.3	Serumveränderungen durch die Nierenersatztherapie	50
6.4	Vergleich von HF- und LF-Dialyse: klinisches Outcome	52
6.5	Vergleich von HF- und LF-Dialyse: Serumanalytik	53
6.6	Unerwartet wenig Proteom-Unterschiede zwischen HF- und LF-Therapie	57
7	Literatur- und Quellenverzeichnis	59

1 Zusammenfassung

Die Anzahl der Patienten, die in Deutschland eine Dialyse benötigen ist in den letzten Jahren drastisch gestiegen. Waren es 1995 noch ca. 41.000, ist die Anzahl bis 2006 auf ca. 66.500 dialysepflichtige Patienten angewachsen. Trotz großen therapeutischen Fortschritten bei der Nierenersatztherapie ist die Mortalität von Dialysepatienten im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung immer noch um das 10 - 35fache erhöht. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass z.T. unterschiedliche klinische Outcome in Abhängigkeit von der verwendeten Dialysemembran auftreten. Auch wurde von unterschiedlicher Proteinclearance in Abhängigkeit von der jeweiligen Dialysetherapie berichtet.

In der vorliegenden Arbeit werden die Serumproteome im Verlauf von Hämodialysen mit zwei verschiedenen Hohlfaserdialysatoren aus synthetischen Polysulfonsäuremembranen der Firma Fresenius hinsichtlich Serumproteomveränderungen verglichen. Der Ultrafiltrationskoeffizient beträgt für Low-Flux-Membranen (LF) 3,5 - 7 ml/h/mmHg und für High-Flux-Membranen (HF) > 10 ml/h/mmHg. Die Low-Flux-Dialyse hat den Größenausschlussbereich ihrer Poren bei 10 kDa und die High-Flux-Dialyse bei 30 kDa. Die Patienten wurden in 2 Gruppen aufgeteilt, die mit beiden Membranen jeweils für mindestens 10 Wochen im Cross-over-Design dialysiert wurden. Anschließend wurden prädialytisch Serumproben entnommen und mit Proteomics basierten Analysemethoden untersucht.

Die zwei-dimensionale Auftrennung beinhaltet im ersten Schritt eine Größenausschlusschromatographie mit einer Superdex-Säule. In den gewonnenen Fraktionen wurden die UV-Absorbanzen und die Fluoreszenzen gemessen und verglichen. Anschließend erfolgte eine massenspektrometrische Untersuchung mittels MALDI-MS. In der anschließenden zweiten Dimension wurden die 1D-Fraktionen Patienten gleicher Dialysemethode gepoolt und weiter mit einer Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose aufgetrennt. Nach UV-Absorbanzmessung wurden in ausgewählten Fraktionen die enthaltenen Proteine mittels ESI-MS identifiziert und mittels MALDI-MS quantifiziert.

Der Vergleich von Absorbanzspektren, Fluoreszenzintensitäten und Peptidmustern nach der 1D-Trennung der Serumproben zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen einer LF- und einer HF-Dialyse. Es konnten lediglich leichte Unterschiede im Bereich der Immunglobuline und des Albumins festgestellt werden, die im Sinne einer stärkeren immunologischen Aktivierung unter einer LF-Dialyse interpretiert werden könnten.

Nach der 2D-Trennung und den angeschlossenen massenspektrometrischen Untersuchungen konnte die Konzentration des Haptoglobins und wiederum die Immunglobulinkonzentration reproduzierbar höher nach der LF-Dialyse herausgestellt werden.

Ob die hier gefundenen Unterschiede tatsächlich als signifikant und reproduzierbar im Sinne einer deutlicheren entzündlichen Reaktion auf Grund der LF-Membran interpretiert werden können, muss anhand eines größeren Patientenkollektivs und mittels üblicher laborchemischer Verfahren untersucht werden. Auch sollte die massenspektrometrische Proteinidentifikation auf den gesamten Serumproteombereich ausgedehnt werden um eventuelle weitere Unterschiede zu finden.

2 Einleitung

2.1 Chronische Nierenerkrankungen

Chronische Nierenerkrankungen, d.h. strukturelle oder funktionelle Schädigungen der Nieren bzw. eine eingeschränkte Nierenfunktion, welche länger als 3 Monate besteht, können in 5 Stadien eingeteilt werden. Diese werden abhängig von der glomerulären Filtrationsrate (GFR) als Nierenfunktionsparameter, wie in Tab. 1 aufgeführt, definiert.

Stadium	Beschreibung	GFR [ml/min/1,73 m ²]
1	Schädigung mit normaler oder erhöhter GFR	≥ 90
2	Schädigung mit milder Einschränkung der GFR	60 - 89
3	Moderate Einschränkung der GFR	30 - 59
4	Schwere Einschränkung der GFR	15 - 29
5	Nierenversagen	< 15 oder Dialyse

Tab. 1: Stadieneinteilung der Niereninsuffizienz anhand der GFR

Studien (Hörl und Wanner 2004) haben gezeigt, dass Nierenerkrankungen ab Stadium 4 generell progredient verlaufen. Durch den Verlust von Nephronen in Folge der Grunderkrankung kommt es zur kompensatorischen Erhöhung der Filterleistung der verbleibenden Nephrone. Dadurch kann zwar kurzfristig die Gesamtfilterleistung erhalten bleiben, aber in diesen Struktureinheiten kommt es auch zu einer Erhöhung des intraglomerulären Drucks und damit zu einer Hyperfiltration. Langfristig kommt es so zu einer Sklerosierung der Restnephrone und einem fortschreitenden Funktionsverlust der Niere.

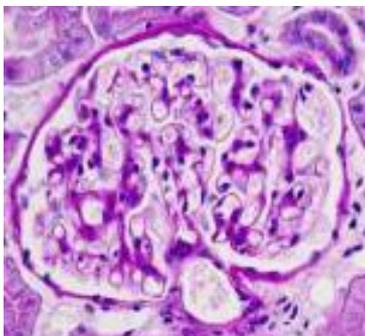


Abb. 1: Histologisches Bild eines normalen Glomerulus (wikipedia 2008)

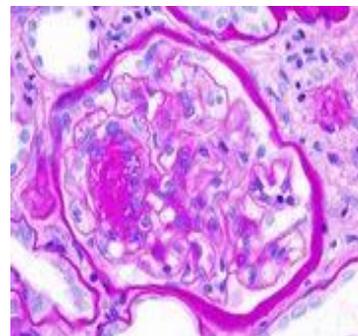


Abb. 2: Histologisches Bild einer nodulären Glomerulosklerose (unckidneycenter 2008)

In den Stadien 1 - 3 ist eine Progressionsverzögerung der renalen und kardiovaskulären Erkrankungen durch eine komplexe Behandlung des Grundleidens die Hauptaufgabe.

Allerdings können bereits im Stadium 3 Komplikationen wie Anämie, Überwässerung, Hypertonie, linksventrikuläre Hypertrophie, Calcium-Phosphat-Stoffwechselstörungen, Dyslipidämie und Malnutrition auftreten. Im Stadium 4 der Niereninsuffizienz muss der Patient auf eine Nierenersatztherapie vorbereitet werden.

Die europäischen Richtlinien besagen, dass eine Dialyse dann begonnen werden sollte, wenn die GFR weniger als 15 ml/min pro 1,73 m² beträgt und wenigstens eines der folgenden Symptome der Urämie vorhanden ist:

- keine konservative Möglichkeit den Hydrationsstatus oder den Blutdruck zu kontrollieren,
- zunehmende Verschlechterung des Ernährungszustandes (Hörl und Wanner 2004)

2.2 Epidemiologische Gesichtspunkte

Sowohl auf Grund der demografischen Entwicklung als auch durch immer effektivere Therapiemöglichkeiten stellt die Behandlung der terminalen Niereninsuffizienz eine beträchtliche Herausforderung für die Gesundheitspolitik dar. Die Inzidenz der Nierenersatztherapie nach terminaler Niereninsuffizienz ist in den letzten Jahren stark angestiegen. Im Jahr 2006 / 2007 betrug die Prävalenz für Deutschland 808 pmp (per million population), womit Deutschland nach den USA und Japan das Land mit der höchsten Dialyseprävalenz ist. Das entspricht gegenüber zum Vorjahr einem Anstieg von 4,9 %.

2006 / 2007 wurden in Deutschland 66.508 Patienten mit einer Dialyse therapiert. Die jährliche Mortalität betrug 2006 in Deutschland 18,23 %. Das Durchschnittsalter der Patienten ist ca. 66 Jahre und die Durchschnittsdauer einer Dialysebehandlung beträgt 4,6 Jahre. 4,2 % aller Dialysepatienten bekommen ein Nierentransplantat nach einer Wartezeit im Mittel von 40 Monaten (Frei und Schober-Halstenberg 2006 / 2007).

Bei den, die chronischen Niereninsuffizienz insgesamt bedingenden Grunderkrankungen, nimmt die diabetische Nephropathie mit 28 %, wie der Abb. 3 zu entnehmen ist, den größten Anteil ein. Bei den Patienten, welche 2006 die Dialysetherapie begonnen haben, hat die diabetische Nephropathie sogar einen Anteil von 34 % an den Niereninsuffizienz bedingenden Grunderkrankungen (Frei und Schober-Halstenberg 2006 / 2007).

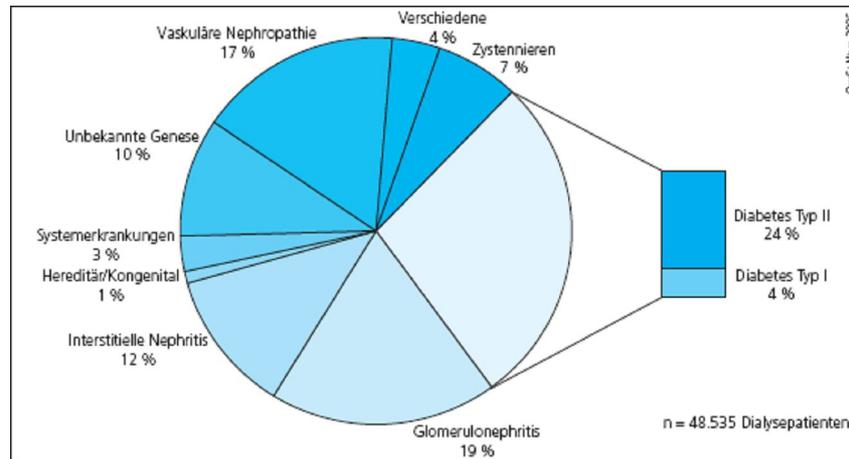


Abb. 3: prozentuale Verteilung der zum terminalen Nierenversagen führenden Grunderkrankungen; Quasi-Niere 2006

Zu einem besonders großen Zuwachs der Patientenanzahl kam es in dem letzten Jahrzehnt in der Altersgruppe der 55 - 79 Jährigen (Anstieg der totalen Inzidenzrate dieser Altersgruppe um 30 % mehr neue Patienten 2007 im Vergleich zu 1997). Aber auch die Inzidenzrate der Gruppe der über 80 jährigen Dialysepatienten hat sich von 1997 bis 2007 mehr als verdoppelt (Kramar und Oberbauer 2007). Dieser Zunahme an Dialysepatienten liegen mehrere Phänomene zu Grunde:

- Es werden zunehmend auch ältere Patienten mit einer größeren Komorbidität einer Nierenersatztherapie zugeführt.
- Es ist eine Zunahme von Krankheiten zu beobachten, die kausal zu einer chronischen Niereninsuffizienz führen können (z.B. Diabetes mellitus, kardiovaskuläre Erkrankungen).
- Auf Grund der besseren Behandlungsmöglichkeit, vieler die Niere beeinträchtigende Erkrankungen, wird das Patientenüberleben gebessert und die betroffenen Patienten erreichen das Stadium der therapiebedürftigen Niereninsuffizienz.
- Des Weiteren ist der Beginn einer Nierenersatztherapie in den letzten Jahren zu einem immer früheren Zeitpunkt, d.h. mit einer höheren Restnierenfunktion, verschoben wurden (Hörl und Wanner 2004, Kausz et al. 2000).

2.3 Dialysetherapie

Mit Hilfe verschiedener Methoden sollen urämische Stoffwechselmetaboliten und überschüssiges Wasser aus dem Körper entfernt werden und die Plasmaionenkonzentration sowie der Säure-Basen-Haushalt normalisiert werden. Zu den zur Verfügung stehenden Therapiemöglichkeiten zählt die Hämodialyse, Hämofiltration, Hämodiafiltration und die Peritonealdialyse. Bei den verschiedenen Dialyseverfahren (siehe auch Abb. 4) ist die Hämodialyse mit einem Anteil von 87,5 % das führende Verfahren in Deutschland (Frei und Schober-Halstenberg 2006 / 2007, Frei 2005 / 2006). Dabei haben Dialysetherapien mit synthetischen High-Flux- oder Low-Flux-Membran den größten Anteil (Hecking et al. 2004, Canaud et al. 2006).

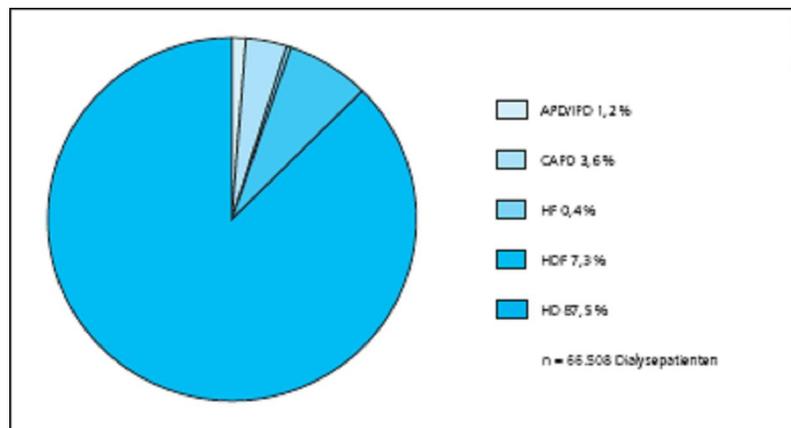


Abb. 4: Anteile der jeweiligen Dialyseverfahren 2006; (APD/IPD = Apparative/intermittierende Peritonealdialyse, CAPD = kontinuierliche ambulante Peritonealdialyse, HF = Hämofiltration, HDF = Hämodiafiltration, HD = Hämodialyse), Quasi Niere 2006

Der Hämodialyse liegt das Prinzip der Diffusion und der Ultrafiltration über eine semipermeable Membran zu Grunde. Die Diffusion verschiedener Substanzen ist abhängig von der Zusammensetzung der Dialysierflüssigkeit und der verwendeten Membran. Über einen Druckgradienten entlang der Membran können zusätzlich Metabolite entfernt werden.

Eine adäquate Dialyse wird hauptsächlich durch die Clearance des Dialysators, den Blut- (ca. 250 - 300 ml/min) und den Dialysatfluss (ca. 500 ml/min), die Dialysefrequenz, die Therapiezeit und die Blutzirkulation zwischen Ein- und Austritt des extrakorporalen Kreislaufs bestimmt.

Die Dialyseeffizienz (Kt) wird unter anderem mit Hilfe des Harnstoffmodells beurteilt. Dieses beschreibt unter Berücksichtigung der Harnstoffbildung im Organismus die Konzentrationsveränderungen durch eine Dialysetherapie. Die Harnstoffkonzentrationsänderung ($Kt/V_{\text{Harnstoff}}$) im Organismus durch die Dialyse berechnet sich aus der Clearance des Dialysators (K), der Dialysezeit (t) und des Verteilungsvolumen von Harnstoff im Körper ($V_{\text{Harnstoff}}$) nach folgender Formel:

$$Kt/V_{\text{Harnstoff}} = \frac{\text{Clearance (K)} \times \text{Dialysezeit (t)}}{\text{Verteilungsvolumen (V}_{\text{Harnstoff}})}$$

Die geringste Mortalität und Morbidität weisen Patienten mit einem Kt/V-Wert von mindestens 1,4 für Nichtdiabetiker und 1,6 für Diabetiker auf. Allerdings kann man mit diesem Modell nur die Clearance von niedermolekularen Substanzen beurteilen; über die Elimination von höhermolekularen Urämietoxinen (s.u.) kann damit keine Aussage gemacht werden. Eine umfangreichere Bewertung der Dialyseeffektivität erfolgt mit Hilfe klinischer Parameter wie Beschwerdefreiheit, Leistungsfähigkeit, Ernährungszustand, Anämie, Normovolämie und dem Blutdruck des Patienten. Das laborchemisch bestimmte Serumalbumin, das Serumkreatinin und der Erythropoietinbedarf dienen als Vergleichsparameter (Hörl und Wanner 2004).

Trotz großen therapeutischen Fortschritten bei der Nierenersatztherapie ist die Dialyse kein vollständiger Ersatz für eine physiologisch arbeitende Niere. Am Beispiel von Harnstoff lässt sich dieses Defizit gut veranschaulichen; die Harnstoff-Clearance einer gesunden Niere beträgt ca. 1200 l/Woche, dagegen kann selbst bei einer optimal laufenden Nierenersatztherapie nur eine Clearance von etwa 150 l/Woche erreicht werden. Dialysepatienten haben im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung eine um das 10 - 35fache erhöhte Mortalität. Die durchschnittliche Lebenserwartung mit einer Dialysebehandlung liegt für Patienten bei einem Therapiebeginn im Alter von 45 - 54 Jahren bei weitem 7,5 Jahren. Die Allgemeinbevölkerung hat in diesem Alter eine durchschnittliche Lebenserwartung von weiteren 30 Jahren. Besonders junge Dialysepatienten weisen eine Exzessmortalität auf.

Dialysepatienten sind exponiert für verschiedene Risikofaktoren. Zu den so genannten klassischen Risikofaktoren gehören unter anderem Azidose, Anämie, Hyperhydratation und gesenkte Immunkompetenz. Weitere Gründe für die erhöhte Sterblichkeit finden wir im akzelerierten Verlauf von Arteriosklerose, was zu schweren Herz-Kreislauf-Erkrankungen führt. Diese werden unter anderem durch chronische Mikroinflammationen hervorgerufen. Dialysepatienten sind für eine Vielzahl von Entzündungsauslösern exponiert. Zu diesen gehören neben der renalen Grunderkrankung die Urämie, der Gefäßzugang, der Zahnstatus, Malnutrition und eine nicht optimale Biokompatibilität von Dialysemembranen (Hörl und Wanner 2004).

Eine Dialyse begünstigt somit chronische Entzündungsvorgänge im Organismus und verstärkt damit den oxidativen Stress. Die Folge sind Gefäßwandschädigungen und anschließende Plaquebildung. Weitere bei Dialysepatienten häufig auftretende Arteriosklerose begünstigende Faktoren sind Carbonylstress, Hyperhomocysteinämie, erhöhte Plasmaspiegel an asymmetrischen Dimethylarginin und Hyperphosphatämie. Die kardiovaskulären Komplikationen sind prognosebestimmend und mit über 50 % die häufigste Todesursache bei Dialysepatienten (Cheung et al. 2000, Galle et al. 2003b, Galle et al. 2003a).

Des Weiteren kommt es bei der Nierenersatztherapie zu Proteinmodifikationen; es entstehen sog. AGE-Proteine (Advanced glycation end products)

Bei Urämie werden AGE-Proteine als proinflammatorische Moleküle für verschiedene Symptome, wie vermehrte Gefäßschädigung, verantwortlich gemacht (Yavuz et al. 2005).

Es kommt im Serum von Dialysepatienten weiterhin zur Kumulation verschiedener Substanzen, den so genannten Urämietoxinen.

Diese Substanzen können in Low-molecular-weight-Toxine (LMW-Toxine) und High-molecular-weight-Toxine (HMW-Toxine) unterteilt werden. Zu den LMW-Toxinen gehören beispielsweise Harnstoff und Phosphate. Diese Gruppe ist relativ gut chemisch charakterisiert, während im Bereich der HMW-Toxine wesentlich weniger Daten vorliegen. Bekannte Beispiele sind das β_2 -Mikroglobulin, *p*-Cresol-Proteinmodifikationen und das Parathormon (Vanholder et al. 2003, Niwa 1997, Yavuz et al. 2005).

Um Urämietoxine zu entfernen, wurden verschiedene Dialysetherapiemethoden mit Membranen mit unterschiedlichem Größenausschluss (cut-off) entwickelt.

In der vorliegenden Arbeit sollen die Auswirkungen der so genannten Low-Flux-Dialyse und der High-Flux-Dialyse auf das Serumproteom verglichen werden.

Bei diesen Methoden handelt es sich um Hämodialysen. Beide Methoden benutzen Hohlfaserdialysatoren mit einer synthetischen Polysulfonsäuremembran. Der

Ultrafiltrationskoeffizient beträgt für Low-Flux-Membranen 3,5 - 7 ml/h/mmHg und für High-Flux-Membranen > 10 ml/h/mmHg. Die Low-Flux-Dialyse hat den Größenausschlussbereich ihrer Poren bei 10 kDa und die High-Flux-Dialyse bei 30 kDa. Es ist davon auszugehen, dass bei der High-Flux-Dialyse insbesondere im Bereich der HMW-Toxine auf Grund der größeren Poren eine bessere Clearance erreicht werden kann. In einigen Studien bezüglich des klinischen Outcomes der Dialysepatienten abhängig von der Dialysemembran wurde eine Überlegenheit der HF-Dialysemethode bereits gezeigt (Locatelli 2003, Depner et al. 2004, Woods und Nandakumar 2000). Die abschließende Klärung dieses Sachverhalts steht aber noch aus.

3 Ziele der Arbeit

Es soll sowohl nach langfristigen Unterschieden zwischen den Serumproteinmustern dialysepflichtiger Patienten, die mit Low-Flux- oder High-Flux-Dialyse therapiert werden, als auch zwischen Patienten und gesunden Probanden gesucht werden.

Dazu werden Patienten im Rahmen eines sog. Cross-over-Verfahrens mit Low-Flux- und High-Flux-Membranen jeweils über mindestens 10 Wochen im Wechsel dialysiert.

Die nach diesen Zeiträumen gewonnenen prädialytischen Serumproben von Patienten und Kontrollprobanden sollen nach größenausschlusschromatographischer ein-dimensionaler Fraktionierung zunächst mittels multispektraler Photo- und Fluorometrie analysiert und verglichen werden. Im Anschluss daran sollen die Serumproteine der Fraktionen tryptisch verdaut werden und nach Unterschieden im Peptide-Mass-Fingerprint nach MALDI-Massenspektrometrie gesucht werden.

Nach der ersten Dimension soll sich eine zweite, ionenaustauschchromatographische, Dimension anschließen. Diese nun zwei-dimensional aufgetrennten Serumfraktionen sollen ebenfalls photospektrometrisch verglichen werden. In ausgewählten, sich bei den verschiedenen Probanden photometrisch unterscheidenden Fraktionen sollen alle darin enthaltenden Proteine mit einer Kombination aus MALDI- und ESI-MS identifiziert und quantifiziert werden.

Es ist zu erwarten, dass sowohl im Vergleich der Proben nach Low-Flux- zu denen nach High-Flux-Dialyse bzw. beim Vergleich der Proben von Dialysepatienten zu Kontrollprobanden Proteine angereichert vorliegen, die Urämietoxine repräsentieren können. Diese könnten danach als Marker für die Dialyseeffektivität und zum Monitoring des Krankheitsverlaufs dienen.

4 Methodik

4.1 Geräte, Materialien und Chemikalien

4.1.1 Geräte

Größenausschlusschromatographie (SEC):

Hiload™ 16/60 Superdex™ 200 prep grade, Code No. 17-1069-01

FPLC-Anlage v. Pharmacia FPLC-System, Seriennummer FPLC 537

online-UV-Messung: SPD-10 A v. Shimadzu

Spektrometrie:

Spectramax Plus 384 v. Molecular Devices

Fluoreszenzspektrometrie:

Spectramax Gemini v. Molecular Devices

Waagen:

MC 1 Laboratory LC 620 P v. Sartorius

MC 1 Analytic AC 210 S v. Sartorius

Thermoblock:

TB1 Thermoblock v. Biometra®

MALDI-MS:

Voyager-DE RP v. Applied Biosystems

ESI-MS:

Spektrometer: API QSTAR PULSAR i (PE SCIEX)

v. Applied Biosystems

HPLC-Anlage: Famous by LC Packings

UltiMate by LC Packings

Dosierer:

CyBi™-Well v. CyBio

4.1.2 Materialien

Fraktionierung SEC:

96er deep-well-Platten Volumen 1,1 ml v. Brand; Bestellnummer: 701350

Fluoreszenzmessung:

FIA-Platten 96-well schwarz v. greiner bio-one; Bestellnummer: 655076

Spektrometrische Messungen:

UV-Star Platte 96-well v. greiner bio-one; Bestellnummer: 655801

Sonstige Platten:

twin.tec PCR Plate 96 skirted V = 150 μ l v. Eppendorf; Bestellnummer: 0030 128.648

Pipettenspitzen; Tubes:

v. BRAND, Eppendorf oder Sarstedt

Abdeckfolie, durchsichtig:

v. Neschen

Aluabdeckfolie:

Silverseal v. Greiner bio-one

hausteigene Dialyseplatten und Probenplatten für MALDI-MS

4.1.3 Chemikalien

deionisiertes Wasser (Reinheitsstufe 2)

Natriumchlorid v. CarlRoth GmbH&Co (Purity \geq 99,5 % p.a.)

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan v. Merck (Purity 99,8 %)

Acetonitril v. Merck (Purity \geq 99,9 %)

1-Propanol v. Roth (Purity \geq 99,5 %)

Guanidinhydrochlorid v. Fluka (M=95,53 g/mol, Purity \geq 99,5 %)

Dithiothreitol (DTT) v. SERVA (Purity mind. 99 %)

Jodacetamid v. SERVA (Purity mind. 99 %)

Ammoniumhydrogencarbonat v. Roth (Purity \geq 98 %)

Trifluoressigsäure 25 %ige v. Merck

Trypsin (from bovine pancreas) v. SIGMA (salt-free, TPCK treated, activity: \geq 10.000 BAEE units/mg)

Ferritin v. Pharmacia (Purity 89 %)

Catalase v. Pharmacia (Purity 96 %)

Ribonuclease A (from bovine pancreas) v. Serva (Purity ca. 70 %)

Thyroglobulin (porcine) v. Serva (Purity 91 %)

Alpha-Chymotrypsin (from bovine pancreas) v. Serva (activity: ca. 1000 USP units/mg)

Bovines Serumalbumin (fatty acid-free) v. Serva (Purity mind. 98 %)

Calibration Mixture 2 v. Applied Biosystems

4.2 Probennahme

Die von uns untersuchten Serumproben stammen von Patienten des KfH-Nierenzentrums am Engelplatz 8 in Jena, sowie von freiwilligen gesunden Probanden als Vergleichsgruppe. Alle an der Studie teilnehmenden Personen wurden über den Inhalt der Studie, sowie die Risiken der Blutentnahme aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Die Studie und die damit verbundenen Blutentnahmen wurden von der örtlichen Ethikkommission gebilligt (Bearbeitungsnummer: 1676-11/05). Das Kollektiv der Dialysepatienten besteht aus zwei Gruppen: die erste Gruppe mit n=9 wurde zuerst mit einer Low-Flux-Dialyse therapiert (6 männlich, 3 weiblich; Alter $62,7 \pm 9,4$ Jahre), die zweite Gruppe mit n=7 erhielt als erste Therapie eine High-Flux-Dialyse (5 männlich, 2 weiblich; Alter $59,4 \pm 19$ Jahre). Die Vergleichsgruppe umfasste 10 gesunde Probanden mit einer Altersspanne von 54 bis 82 Jahren (3 männlich, 5 weiblich, Durchschnitt $63,6 \pm 10,2$ Jahre).

Bei allen Studienteilnehmern erfolgte sowohl eine Serum- als auch eine EDTA-Plasma-Abnahme mit Hilfe des Vacutainer-Entnahmesystems. Bei den Dialysepatienten erfolgte eine Blutentnahme vor und nach der Dialyse, wobei die Patienten vor der Dialyse nüchtern waren und während der Behandlung aßen. Die Blutentnahme bei den gesunden Probanden erfolgte stets nüchtern. Nach Ablauf der Gerinnung (30 min, 20°C) wurden die Proben mit 1400 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert und die Überstände in 1,5 ml Eppendorf-Tubes portioniert und bei -80°C gelagert.

Um die interindividuellen Unterschiede im Serumproteom zwischen den Dialysepatienten berücksichtigen zu können, wurde jeder Patient mit beiden, der zu vergleichenden Dialysemethoden in einem Cross-over-Verfahren therapiert. Die erste Blutentnahme erfolgte am Anfang der Studie als jeder Patient entsprechend seiner Gruppe schon länger (mind. 10 Wochen) mit der LF- oder HF-Dialyse therapiert wurde. Anschließend wurde die Therapie der Dialysepatienten auf die entsprechend andere Dialysemethode umgestellt und nach 10 Wochen wurden zum zweiten Mal Blutproben entnommen (siehe auch Abb. 5).

Die Patienten wurden entweder mit einer Low-Flux-Polysulfonsäuremembran (F6 HPS, Polysulfon[®], Oberfläche 1,3 m², Fresenius Medical Care, Germany) oder einer High-Flux-Polysulfonsäuremembran (FX 60, Helixone[®], Oberfläche 1,4 m², Fresenius Medical Care, Germany) nach dem beschriebenen Schema dialysiert. Die Dialysetherapie erfolgte 3mal pro Woche für 4 bis 5,5 Stunden mit einer Blutdurchflussrate von 250 - 300 ml/min und einer Dialysatflussrate von 500 ml/min.

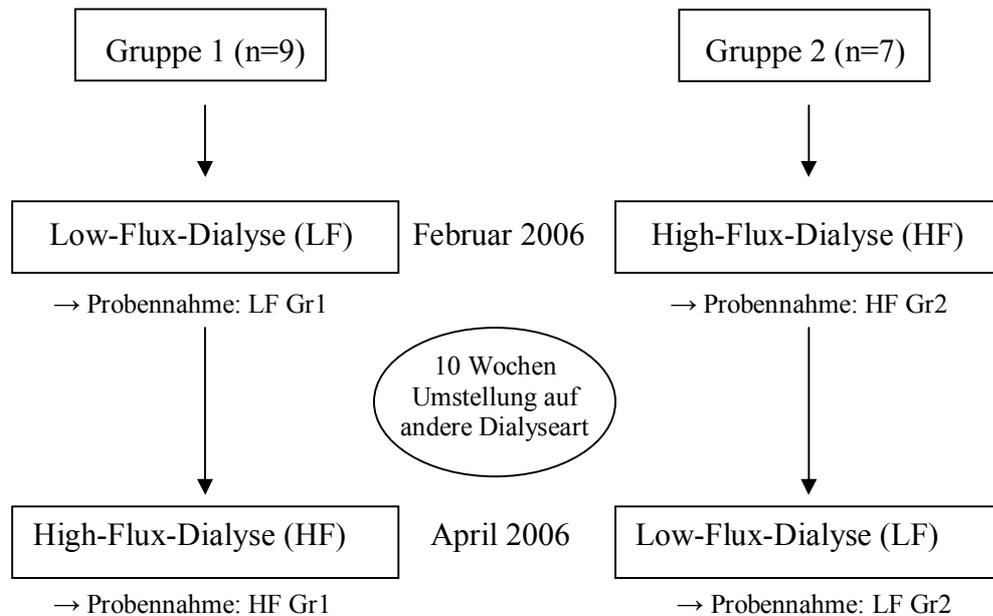


Abb. 5: Übersicht Patienten, Probenabnahmen und Dialysemethode

4.3 Analyse der Serumproben

Zur Fraktionierung der Serumproben wurde ein nichtdenaturierendes chromatographisches Verfahren (Baum et al. 2008) eingesetzt. Die Trennschritte werden als Dimensionen bezeichnet und umfassen hier eine Größenausschlusschromatographie und eine Ionenaustauschchromatographie. Anschließend wurden die Fraktionen so weiterbehandelt, dass die MALDI- und ESI-Massenspektrometrie zu Proteinidentifikation erfolgen konnte.

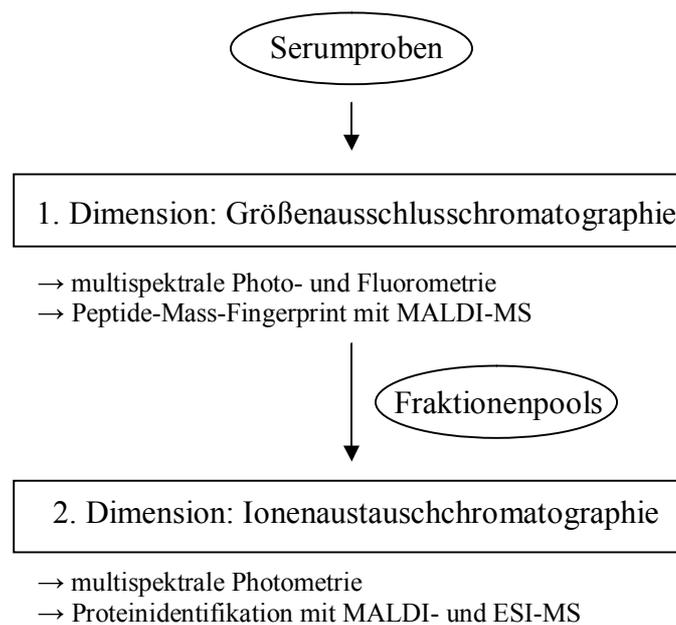


Abb. 6: Übersicht zwei-dimensionale Probenauftrennung mit anschließenden Analysemethoden

4.3.1 1. Dimension: Größenausschlusschromatographie

Im ersten gelchromatographischen Schritt wurden die Proben mit Hilfe einer Superdex-Säule getrennt. Hierfür wurden jeweils 1080 µl Serum 10:11 mit 10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl-Puffer (pH 7,4) verdünnt. Es folgte eine Zentrifugation mit 8000 g für 10 min. 1 ml des klaren Überstandes wurde auf die Säule, welche mit 10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4 äquilibriert wurde, aufgetragen. Die sich nun anschließende Chromatographie hatte eine Laufzeit von 140 min und eine Flussrate von 1 ml/min. Ab der Minute 37 erfolgte eine Fraktionierung zu je 1 ml in eisgekühlten 96-deep-well-Platten. Im Anschluss an diese Trennung wurde die Absorption dieser Fraktionen bei 205, 215, 280, 340, 460 und 700 nm in UV Star-Platten gemessen. Bei 205/215 nm wird die Absorbanz der Peptidbindungen, bei 280

nm die der Aromate, bei 340 nm die der AGE-Proteine und bei 460 nm die Absorbanz von Bilirubin gemessen. Die Absorbanz bei 700 nm dient als Blindwert. Außerdem erfolgten Fluoreszenzmessungen in den jeweiligen Fraktionen. Bei den Messungen mit einer Exzitation von 295 nm und der Emission von 330 nm wird die Tryptophanfluoreszenz bestimmt. Diese ist eine weitere Möglichkeit auf Proteinkonzentrationsunterschiede zwischen verschiedenen Proben zu schließen. Die Messung der AGE-Fluoreszenz, welche ebenfalls eine Aussage über die Zusammensetzung der Proben ermöglicht, erfolgt mit der Exzitation von 360 nm und der Emission von 445 nm.

Mit Hilfe einer Verdünnungsreihe (1:10, 1:20, 1:50 und 1:100) der Serumproben und einer anschließenden Absorbanzmessung bei den Wellenlängen 205, 215, 280 und 700 nm wurden die Proteinkonzentrationen anhand von BSA-Eichkurven bestimmt (Kreusch et al. 2003).

Bis zu weiteren Analysen wurden die 96 Fraktionen der aufgetrennten Proben zu je 200 µl portioniert und bei -80°C gelagert.

4.3.1.1 Kalibrierung und Lagerung der Superdex-Säule

Zur Kalibrierung der Superdex-Säule werden 2 Proteingemische aus Standardproteinen mit bekanntem Molekulargewicht verwendet. Der Proteinmix 1 besteht aus jeweils 3 mg Ferritin (MG = 440 kDa), Catalase (MG = 232 kDa) und Ribonuclease A (MG = 13,7 kDa). Der Proteinmix 2 besteht aus 3 mg Thyroglobulin (MG = 669 kDa), 4 mg Bovines Serumalbumin (MG = 67 kDa) und 2 mg Alpha-Chymotrypsin (MG = 25 kDa). Die Standardproteine werden mit jeweils 0,5 ml 10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl-Puffer (pH 7,4) verdünnt und nach vollständigem Lösen zu gleichen Teilen (je 400 µl) zu den Proteinmischen 1 und 2 gemischt. Es folgt eine Zentrifugation für 10 min mit 10.000 rpm. Die sich nun anschließende Chromatographie der beiden Proteingemische erfolgte identisch zu denen der Serumproben (s. o.).

Mit Hilfe der Elutionsvolumina der Standardproteine wird mit Microsoft-Excel[®] eine Eichgerade erstellt und die Reproduzierbarkeit der Superdex-Säule beurteilt.

Zur Konservierung wird die Säule mit einem mit NaN₃ (0,02 %) versetzten Puffer äquilibriert. Nach mehreren Trennungen wird die Säule mit 1 molarer Natronlauge und 30 % Isopropanol, jeweils eine Laufzeit von 140 min und einer Flussrate von 1 ml pro Minute, gereinigt und anschließend mit 10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4 äquilibriert.

4.3.2 2. Dimension: Ionenaustauschchromatographie

Der Trennung der Proteine nach ihrer Größe im ersten Schritt folgt nun die Trennung nach der Ladung. Diese zweite Chromatographie dient der weiteren Verringerung der Komplexität der Proteingemische in den Fraktionen. Diese Ionenaustauschchromatographie wird mit Polypropylenkartuschen, welche mit DEAE- Cellulose gefüllt sind, durchgeführt. 96 solcher Kartuschen werden mit einem Adapter zu einem Block zusammengefasst; so können nun 96 Proben parallel aufgetrennt werden. Der Ablauf der 2. Dimension kann in drei Schritte unterteilt werden:

- (1) Vorbereitung der Kartuschen: Äquilibration mit 10 mM Tris/HCl, pH 7,4, 25 mM NaCl.
- (2) Vorbereitung der Proben (1D-Fraktionen): Zwei Aliquots von 180 µl aller 96 1D-Fraktionen werden in zwei Dialyseplatten (Zitat Patent s.u.) überführt und 2 Stunden gegen 10 mM Tris/HCl, pH 7,4, 25 mM NaCl dialysiert, wobei nach der ersten Stunde der Puffer erneuert wird. Vor und nach der Dialyse erfolgt eine photometrische Messung, wie unter 4.3.1 beschrieben, zur Bilanzierung des Dialyseschrittes.
- (3) Die 2D-Trennung erfolgt nun teilautomatisiert mittels Analyseplattform der Firma CyBio. Sie umfasst die Probenaufgabe von 3 mal 95 µl der dialysierten 1D-Fraktionen und die in der folgenden Tabelle aufgeführten Elutionsschritte.

Elutionsschritte	Puffer	pH
3 x 95 µl	Probenaufgabe	-
4 x 95 µl	10 mM Tris ,25 mM NaCl	7,4
4 x 95 µl	10 mM Tris, 75 mM NaCl	7,4
4 x 95 µl	10 mM Tris, 125 mM NaCl	7,4
4 x 95 µl	10 mM Tris, 125 mM NaCl	7,2
4 x 95 µl	10 mM Tris, 175 mM NaCl	7,2
4 x 95 µl	10 mM Tris, 225 mM NaCl	7,2
4 x 95 µl	10 mM Tris, 500 mM NaCl	7,2
4 x 95 µl	10 mM Tris, 500 mM NaCl + 20 % Propanol	7,2

Tab. 2: Elutionsschritte der Ionenaustauschchromatographie mit entsprechenden Puffer und pH-Wert

Die 2D-Fractionen werden in 384-well UV-Star Platten aufgefangen, bei den Wellenlängen 205, 215, 280, 340, 460 und 700 nm gemessen und bei -80°C bis zur weiteren Analyse gelagert.

Mit Hilfe einer Kalibrierung mit BSA, werden die Proteinkonzentrationen der erhaltenen 3360 Fractionen bestimmt. Diese Konzentrationen werden mit der Proteinanzugskonzentration normiert, um Proben mit unterschiedlichem Proteingehalt miteinander vergleichen zu können. Es folgt nun die farbcodierte Darstellung der normierten Proteinkonzentration der Fractionen mit Microsoft Excel[®].

Patent: Horn A. et.al., Patent application: DE 10160975.2, WO 03/049841A1, GB 0415432.4

4.3.3 Tryptischer Verdau

Der tryptische Verdau erfolgt in mehreren Schritten (Horn et al. 2006).

- (1) Als erstes wird eine Denaturierung der Proteine mit 8 M Guanidinhydrochlorid durchgeführt. 60 µl der Fractionen werden nach Zugabe von 20 µl Guanidinhydrochlorid (Endkonzentration im Ansatz 2 M) bei 90°C für 20 Minuten inkubiert und dann auf ca. 4°C heruntergekühlt.
- (2) Es folgt die Reduktion der Disulfidbrücken mit Dithiothreitol (Endkonzentration im Ansatz 10 mM). Dieser Vorgang benötigt bei 37°C eine Stunde.
- (3) Die Thiolgruppen werden nun mit Jodacetamid (Endkonzentration 50 mM) für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln modifiziert.
- (4) Im nächsten Schritt werden die Reste zugegebener Reagenzien mittels einer Dialyse entfernt. Dafür wird für 2,5 Stunden gegen eine 20 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung dialysiert. Die Dialyselösung wird nach der ersten Stunde erneuert.
- (5) Nun wird Trypsin (im Verhältnis von wenigstens 1:40 zu der Proteinkonzentration in der Fraction) zugegeben.
- (6) Durch Zugabe von ca. 4 µl 280 mM Ameisensäure (Überprüfung des pH-Umschlags in den sauren Bereich) wird der tryptische Verdau nach 16 Stunden bei Raumtemperatur beendet.

Die Proteine der Fraktionen liegen nun in ihren Peptidbruchstücken zur weiteren Analyse vor. Gegebenenfalls werden die Proben zur Aufbewahrung bei -80°C eingefroren.

Ab Fraktion 102 wurde für massenspektrometrische Analysen kein tryptischer Verdau durchgeführt, da ab dieser Fraktion bereits die natürlich vorkommende Peptide mit einem ausreichend kleinen Molekulargewicht vorliegen.

4.3.4 Matrix-Assisted-Laser-Desorbition-Ionisation-Massenspektrometrie (MALDI-MS)

Die Massenspektrometrie wurde mit einem Voyager-DE RP-Gerät der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Dieses ist mit einem Nitrogen-Laser der Wellenlänge $\lambda = 337 \text{ nm}$ ausgestattet. Die Analysen wurden mit einer Beschleunigungsspannung von 20 kV, 68 % Gitterspannung und eine Verzögerungszeit von 185 ns im Reflectron-Modus durchgeführt. Als Ionisationsmatrix wurde α -Cyanohydroxyzimtsäure verwendet, wobei 10 mg der Matrixsubstanz in 1 ml aus gleichen Teilen aus *n*-Propanol, Acetonitril und Wasser sowohl 0,1 % TFA bestehend, gelöst wurden. Es wurden jeweils 10 μl der Matrixlösung mit 10 μl der Probe gemischt. Von diesem Proben-Matrix-Gemisch wurden jeweils 2 mal 4 μl auf eine Probenplatte getropft und bei Raumtemperatur getrocknet. Zur quantitativen Auswertung wurde der Matrixlösung das Peptid AAGIFQFPRV-NH₂ (Jena BioScience GmbH; im Folgenden als Eichpeptid bezeichnet) als interner Standard mit einer Endkonzentration von 0,3 μM zugesetzt.

Die Kalibrierung des Massenspektrometers erfolgte mit Hilfe eines Peptide-Mass-Standards-Kits von Applied Biosystems. Die Massentoleranz beträgt bei 3000 Da etwa $\pm 0,5 \text{ Da}$.

Die Laserintensität für die Peptidanalysen lag zwischen 1500 - 2000. Es wurde ein Massenbereich von 800 bis 6000 Da erfasst. Jedes Spektrum entsteht aus 64 single-shot-Spektren; aus jeweils 5 Spektren wurde ein Ergebnisspektrum für jede Fraktion gemittelt.

Die verwendete Software Voyager Control Panel, erstellt pro Spektrum eine Massenliste, bei der jede gefundene Masse mit einer Indexnummer, der Peakhöhe, der relativen Intensität, und der „Area-under-the-curve“ versehen ist. Diese Massenlisten (Peptide-Mass-Fingerprints) werden für die weitere Auswertung verwendet.

4.3.5 Computerprogramm für die Analyse der Peptide-Mass-Fingerprints

Das im Folgenden beschriebene Computerprogramm wurde von Herrn Thomas Rieger, Mitarbeiter des Instituts für medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation der FSU Jena, für Microsoft Access[®] in Zusammenarbeit mit unserer Arbeitsgruppe programmiert. In dem Programm können verschiedene Massenlisten miteinander verglichen werden. Man kann beliebig viele Listen als Mess- bzw. Vergleichsdateien zusammenfassen.

Die Analyse der Daten erfolgt schrittweise:

(1) Festlegung Qualitätsparameter:

- a) Als erstes wird die Massetoleranz, mit der zwei Massen als gleich angesehen werden, angegeben. Dies ist entweder als Absolutwert (in Dalton) oder als ein dynamischer von der Größe der Masse abhängiger Wert (z. B. parts per million (ppm)) möglich.
- b) Signal-Rausch-Grenze: Diese kann wiederum als absoluter Wert der Intensität der Massepeaks festgesetzt werden, oder man bestimmt einen Prozentwert der höchsten Intensitäten.

(2) Da die Massenspektren auch Daten von irrelevanten Bestandteilen, wie Matrix und Zusätzen, wie Trypsin-Peptiden enthalten, werden die zugehörigen Signale eliminiert.

(3) Danach erfolgt der Vergleich der Massenpeaklisten.

(4) Die Ergebnisdatei liegt im Excel-Format vor und umfasst die Historie mit den Namen der verglichenen Dateien, die Werte der Ausgangsdateien, eine Tabelle mit den übereinstimmenden Massen des Vergleichs und Tabellen mit den nicht übereinstimmenden Massen, also den Unterschieden zwischen den eingelesenen Massenlisten.

(5) Des Weiteren kann man auch diese Ergebnisdateien untereinander vergleichen.

Für unsere Auswertung wurde eine Massetoleranz von 500 ppm gewählt. Da die 1D-Fraktionen noch sehr komplex sind, wurde als Rauschgrenze die oberen 20 % (also 80-100%) der höchsten relativen Intensitäten festgelegt.

4.3.6 Liquid-Chromatography-Electro-Spray-Ionisation-Massenspektrometrie (LC-ESI-MS/MS)

7,5 µl der tryptisch verdauten Fraktionen wurde mit 7,5 µl 5 % ACN und 0,04 % Ameisensäure in AquaDest gemischt. 1 µl dieser Mischung wurde auf die RP-HPLC welche mit einem Ultimate System (beide Dionex, Idstein, Germany) und einem FAMOS Fraktionssammler (Dionex, Idstein, Germany) ausgestattet ist, aufgetragen. Die HPLC-Trennung wurde auf einer PepMap Säule (75 µm × 15 cm, C18, 3 µm beads) mit einer Flussrate von 150 nL/min durchgeführt. Es wurde ein binärer Gradient mit den Eluenten A (5 % ACN und 0,04 % Ameisensäure) und B (80 % ACN, 0,04 % Ameisensäure in AquaDest) gewählt. Das Elutionsschema ist in der Tab. 3 angegeben.

Zeit	Anteil von Eluent B in Eluent A
0 - 5 min	5 %
5 - 50 min	5 - 60 %
50 - 55 min	60 - 95 %
55 - 90 min	5 %

Tab.3: Elutionschema der HPLC-Trennung

Über eine Nanospraynadel wurden die über die HPLC weiter aufgetrennten Peptide der Fraktionen in das Quadrupole-TOF MS/MS-Massenspektrometer eingebracht. Jede Datenaufnahme bestand aus einem MS-TOF-Scan der Peptide mit m/z von 400 - 1500 Da für 1,5 Sekunden und einem Scan der Peptide mit m/z von 50 - 2000 Da für 1,5 Sekunden. Der MS-TOF-Scan wurde im informationsabhängigen Modus durchgeführt und wählt die m/z der 3 Peaks mit der höchsten Intensität mit einer Ladung ≥ 2 aus. Für jeden MS/MS-Scan (Product Ion Mode) wurden diese Peptid-Peaks einer Kollisionsfragmentation mit steigender Beschleunigungsspannung nach einer softwareinternen Berechnung über einen Zeitraum von 1,5 s unterzogen. Das MS/TOF wurde mit Caesium (132,905 Da) und dem Igor Peptid (829,593 Da) kalibriert. Bei m/z 829,593 war die Massegenauigkeit ca. 30 ppm. Die gewonnen Daten wurden mit den Einträgen von 7500 bekannten Aminosäurenketten in der Swiss-Prot-Datenbank (Stand 25.01.2006) verglichen.

4.3.7 Quantitative Analyse der gefundenen Serumproteine

Nach der Analyse der Serumproben mit dem MALDI- und dem ESI-MS kann nun eine quantitative Analyse der im ESI-MS identifizierten Proteine erfolgen. Dafür existiert eine hausinterne Software und Datenbank, die die normierten Höhendaten aller, in der Fraktion mittels Sequence-Tags identifizierten Proteine, zuzurechnenden MALDI-Massepeaks ermittelt. Die normierten Höhendaten korrelieren mit der Proteinkonzentration (Bublitz et al. 2006). Die normierten Höhendaten werden als Mittelwert von Vierfachbestimmungen verwendet und erlauben so quantitative Aussagen zum Konzentrationsverhältnis des entsprechenden Proteins in zu vergleichenden homologen Fraktionen verschiedener Probanden bzw. Patienten.

5 Ergebnisse

5.1 1. Dimension: Größenausschlusschromatographie

5.1.1 Ergebnisse der UV-Absorbanzmessungen

Wie im Methodenteil beschrieben, wurde zuerst eine native Größenausschlusschromatographie durchgeführt, um die Serumproteine der Größe nach in 96 Fraktionen aufzutrennen und so erste Informationen über grobe Unterschiede im Proteinmuster zu erhalten.

Vorversuche habe gezeigt, dass die Chromatogramme nach längeren Standzeiten der SEC-Säule, die im Untersuchungsgang zu erwarten sind, nicht ausreichend reproduzierbar sind.

Um die Patientenproben mit größtmöglicher Reproduzierbarkeit vergleichen zu können, wurden alle Proben zeitlich gestrafft (Zeitraum von 2 Wochen) und direkt zu vergleichende Proben unmittelbar aufeinander folgend analysiert.

In Abb. 7 sind die dabei erhaltenen Mittelwerte der UV-Absorbanzen bei 280 nm der Serumproben der Gruppe 1 beispielhaft dargestellt.

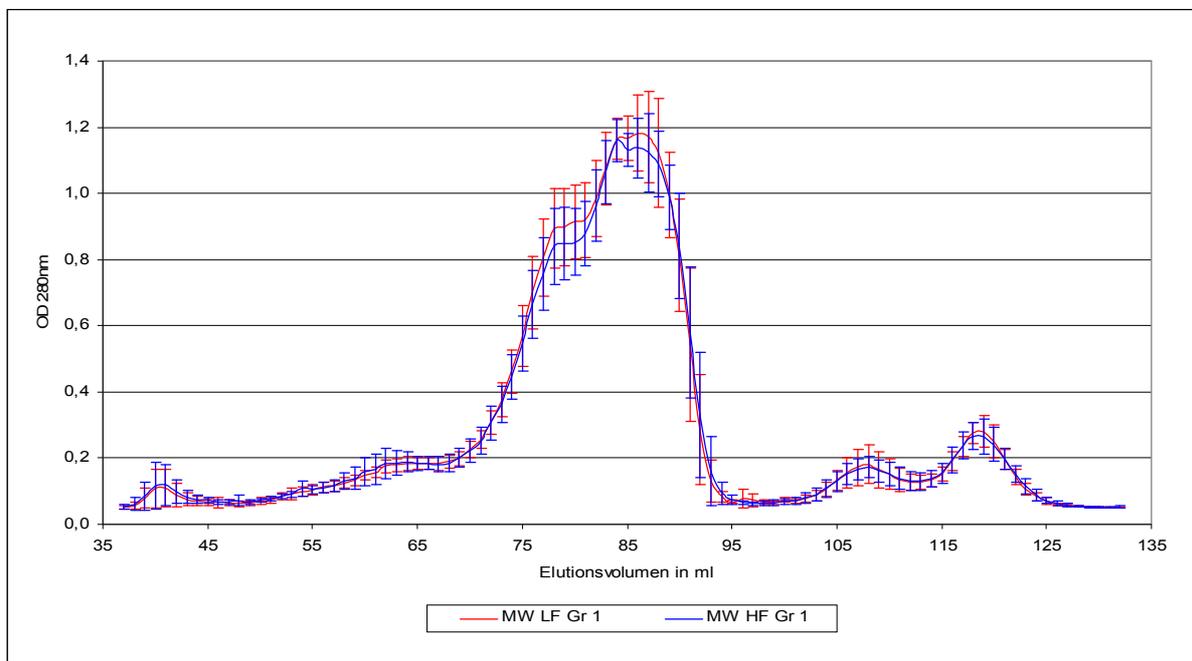


Abb. 7: Mittelwerte der UV-Absorbanzen bei 280 nm der LF- und HF-Proben der 1D-Trennungen der Gruppe 1 mit der jeweiligen einfachen Standardabweichung

Anhand dieser Abbildung kann man erkennen, dass sich die Proteinmuster der LF- als auch die HF-Proben weitgehend gleichen. Die minimalen Unterschiede, die zwischen den Mittelwerten zu sehen sind, werden durch die einfache Standardabweichung überdeckt.

Die Mittelwerte der Gruppe 2 (Abb. 8) verhalten sich analog zu denen der Gruppe 1.

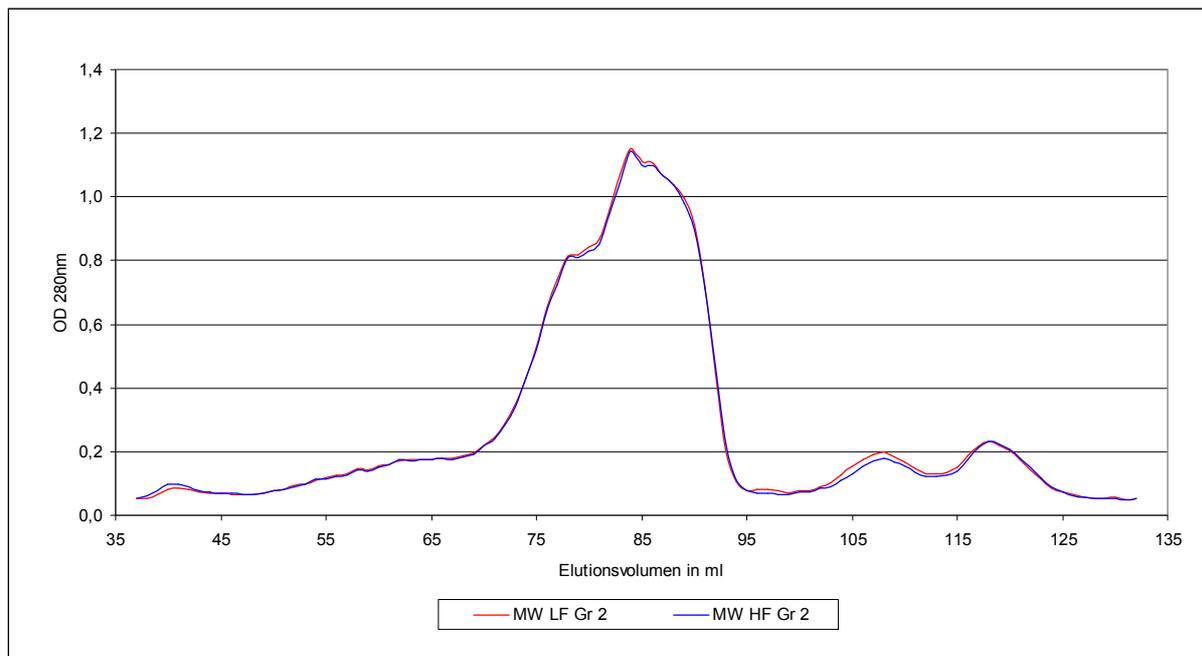


Abb. 8: Mittelwerte der UV-Absorbanzen bei 280 nm der LF- und HF-Proben der 1D-Trennungen der Gruppe 2

Daraus leitet sich ab, dass anhand nativer 1D-Trennung keine signifikanten Änderungen im Serumproteinmuster durch die Umstellung der Therapiemethode nachweisbar sind.

Da jedoch die individuellen Schwankungen sehr hoch sind und dadurch kleinere Veränderungen durch Mittelung u. U. entfallen können, wurden die Chromatogramme aller Patienten noch einmal einzeln analysiert. Dabei konnten hauptsächlich in vier verschiedenen Bereichen bei einzelnen Patienten Unterschiede zwischen den HF- und LF-Proben, unabhängig der Gruppenzugehörigkeit, gefunden werden. Dazu wurde typische Bereiche, wie der hochmolekulare Bereich, der hochmolekulare Lipoproteine enthält (A, Fraktion 37 - 45, MG: ca. 20337 - 7853 kDa), der Bereich mit einem großen Anteil an Immunglobulinen (B, Fraktion 70 - 80, MG: ca. 402 - 122 kDa), der Bereich des Hauptpeaks (überwiegend Albumin) (C, Fraktion 80 - 90, MG: ca. 122 - 37 kDa) und der niedermolekulare Bereich (D, Fraktion 102 - 125, MG: 9 - 0,6 kDa) untersucht.

Bereich A

- bei 2 von 15 Patienten (13 %) ist die UV-Absorbanz bei 280 nm nach LF im hochmolekularen Bereich höher als bei HF
- bei 6 von 15 Patienten (40 %) ist die UV-Absorbanz bei 280 nm nach LF im hochmolekularen Bereich niedriger als bei HF
- bei den restlichen Patienten gibt es in diesem Bereich keine Unterschiede

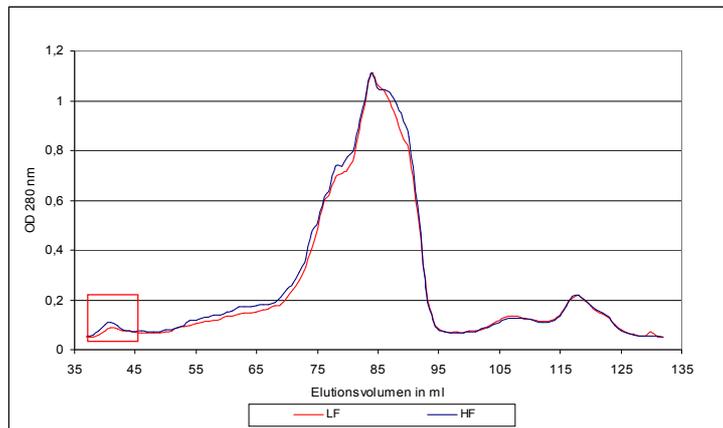


Abb. 9: Beispiel für eine Erhöhung der Proteinkonzentration bei der HF-Probe im hochmolekularen Bereich (Bereich A), Absorbanz bei 280 nm der 1D-Fractionen der Serumproben des Pat. 25

Bereich B

- bei 9 von 15 Patienten (60 %) ist die UV-Absorbanz bei 280 nm bei LF im Bereich der Immunglobuline höher als bei HF
- bei 3 von 15 Patienten (20 %) ist die UV-Absorbanz bei 280 nm bei LF im Bereich der Immunglobuline niedriger als bei HF

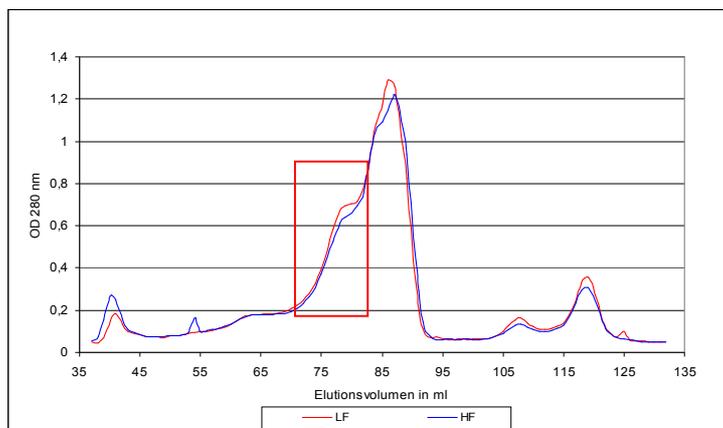


Abb. 10: Beispiel für eine Erhöhung der Proteinkonzentration bei der LF-Probe im Bereich mit hauptsächlich Immunglobulinen (Bereich B), Absorbanz bei 280 nm der 1D-Fractionen der Serumproben des Pat. 8

Bereich C

- bei 7 von 15 Patienten (47 %) ist die UV-Absorbanz bei 280 nm bei LF im Hauptpeak höher als bei HF
- bei 3 von 15 Patienten (20 %) ist die UV-Absorbanz bei 280 nm bei LF im Hauptpeak niedriger als bei HF

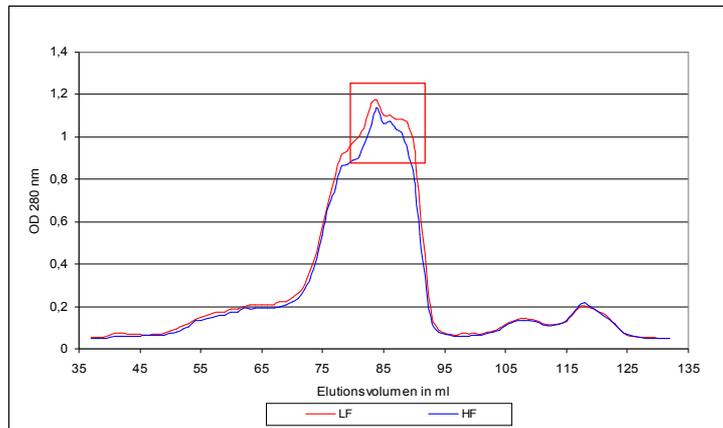


Abb. 11: Beispiel für eine Erhöhung der Proteinkonzentration bei der LF-Probe im Bereich mit des Hauptpeaks (Bereich C) bei 280 nm der 1D-Fractionen der Serumproben des Pat. 22

Bereich D

- bei 7 von 15 Patienten (47 %) ist die UV-Absorbanz bei 280 nm bei LF im niedermolekularen Bereich höher als bei HF
- bei 3 von 15 Patienten (20 %) ist die UV-Absorbanz bei 280 nm bei LF im niedermolekularen Bereich niedriger als bei HF

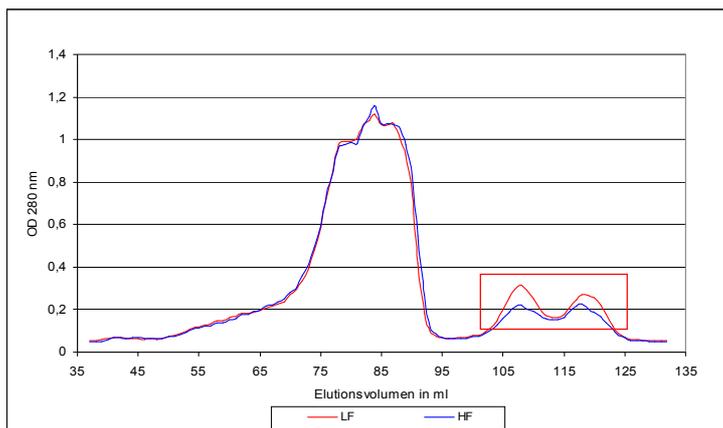


Abb. 12: Beispiel für eine Erhöhung der Proteinkonzentration bei der LF-Probe im niedermolekularen Bereich (Bereich D), Absorbanz bei 280 nm der 1D-Fractionen der Serumproben des Pat. 11

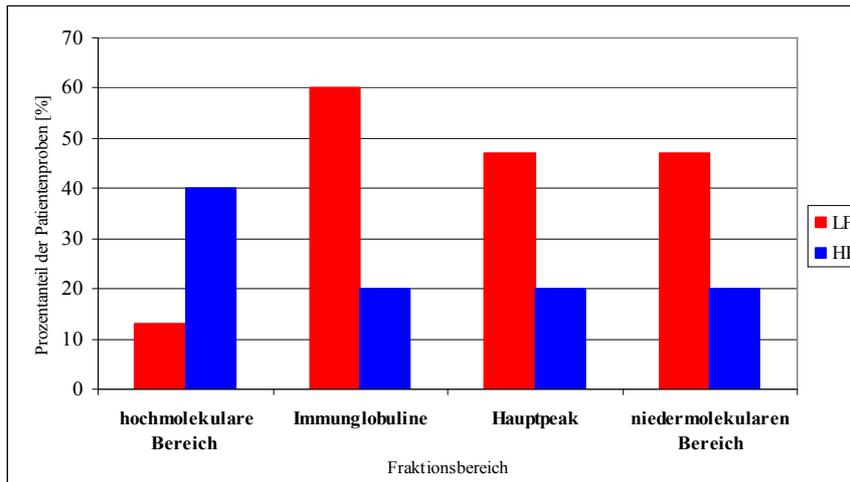


Abb. 13: Prozentanteil der Patientenproben mit einer Erhöhung der UV-Absorbanz bei 280 nm in verschiedenen Fraktionsbereichen abhängig von der Dialysemethode

Im Unterschied zum Vergleich der Mittelwerte ist aus diesen individuellen Vergleichen erkennbar, dass die Proben nach LF-Dialyse im Molekulargewichtsbereich kleiner ca. 400 kDa überwiegend höhere Proteinkonzentrationen enthalten als nach HF-Dialyse (Abb. 13).

Diese Konzentrationsunterschiede sollten an den Mittelwertsvergleichen ebenfalls sichtbar werden. Deshalb wurde die normierte Differenz der Gruppenmittelwerte der Absorbanzen errechnet. Dazu wurden die Absorbanzdifferenzen durch Division durch den gemeinsamen Mittelwert der Absorbanzen der gleichen Fraktion normiert: $(MW_{LF} - MW_{HF}) / MW$.

Bei beiden Patientengruppen kann so ein Unterschied der Mittelwerte im Bereich der Elutionsvolumina von 91 - 96 ml und 102 - 116 ml erkannt werden. In diesem Hauptpeakbereich sind Proteine mit den Massen von 39 bis 19 kDa zu finden und im niedermolekularen Bereich treten Proteine von 9 bis 1,5 kDa auf (siehe Abb. 14). Dieser niedermolekulare Bereich ist bereits bei der Analyse der individuellen Chromatogramme der einzelnen Patienten mit einer überwiegend höhere Proteinkonzentrationen in der LF-Probe aufgefallen (Bereich D, s.o.)

Beispielhaft wird hier das Diagramm der Mittelwerte und der normierten Differenz von Gruppe 2 gezeigt; Gruppe 1 verhält sich ähnlich.

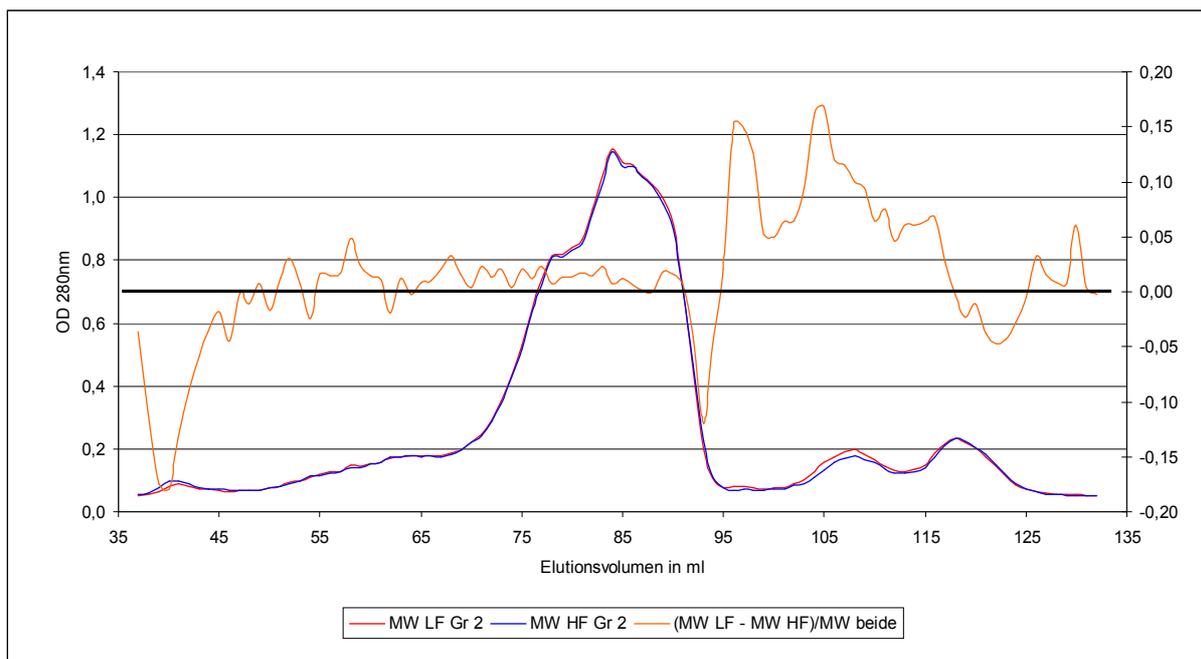


Abb. 14: linke Ordinate: Mittelwerte der UV-Absorbanzen bei 280 nm der LF- und HF-Fractionen der Gruppe 2; rechte Ordinate: normierte Differenz der Mittelwerte

5.1.2 Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen

Eine zweite Methode der photometrischen Analyse ist die Messung der Fluoreszenz der Serumfraktionen unter Bedingungen bei denen AGE-Addukte fluoreszieren. Hierbei wurden Proben von Dialysepatienten auch mit denen der gesunden Kontrollgruppe verglichen. In einigen Fraktionen, insbesondere im Bereich von Albumin, ist eine deutlich erhöhte Fluoreszenz bei der Patientengruppe zuerkennen (siehe Abb. 15). Dies spiegelt die bekanntermaßen höhere Konzentration von AGE-Proteinen bei Dialysepatienten im Vergleich mit gesunden Probanden wider. Ein nahezu identisches Bild finden wir sowohl in der Gruppe 1 (siehe Abb. 15), als auch bei der Gruppe 2.

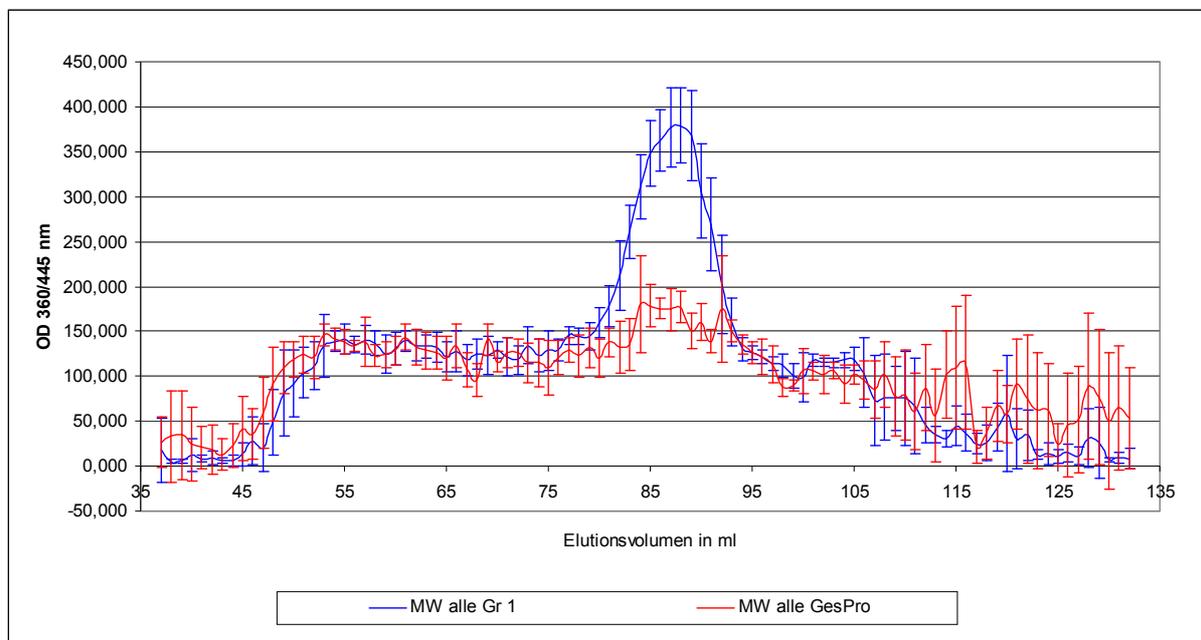


Abb. 15: Mittelwerte und Standardabweichungen der Fluoreszenzintensitäten bei 445 nm (ex 360 nm) nach der Größenausschlusschromatographie der Proben der Gruppe 1 im Vergleich zu den gesunden Probanden

Obwohl die Streuung relativ groß ist, ist der Unterschied zwischen den Dialysepatienten und den gesunden Probanden im Bereich des Hauptpeaks deutlich größer als die einfache Standardabweichung. Beim Vergleich der Fluoreszenz zwischen den Proben aus beiden Dialysemethoden konnten jedoch, wie beim Vergleich der UV-Absorbanz, keine signifikanten Unterschiede gefunden werden (Abb. 16).

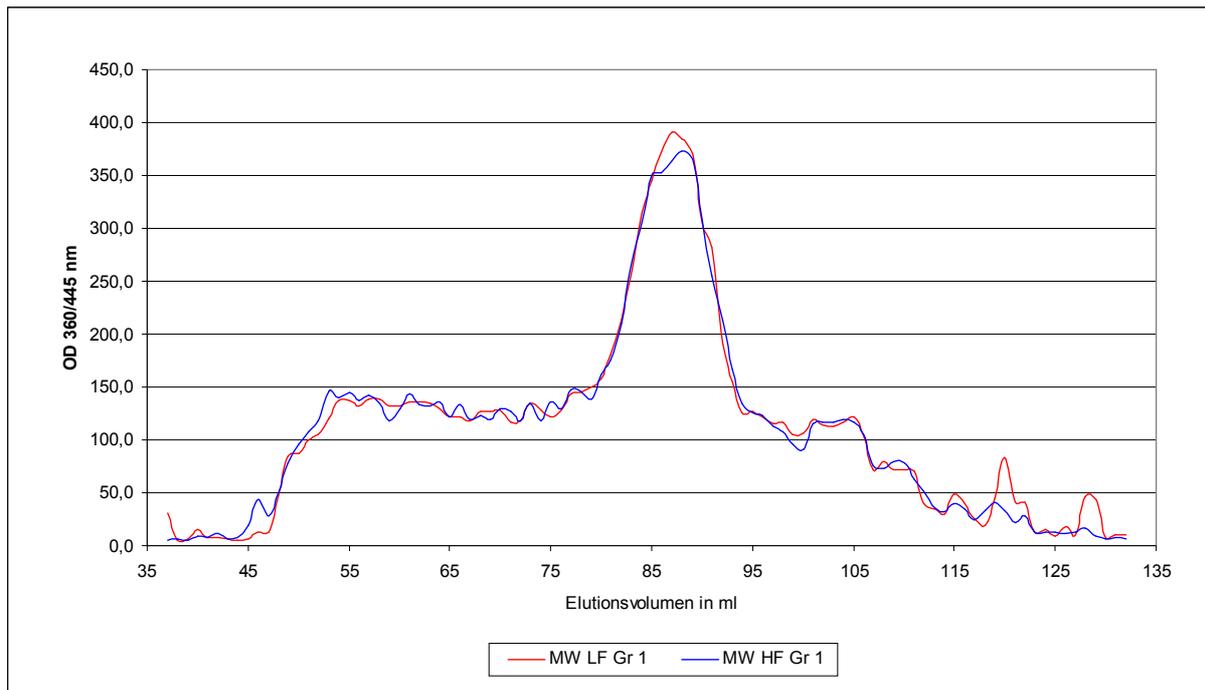


Abb. 16: Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten bei 360/445 nm nach der Größenausschlusschromatographie der Gruppe 1, Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten der LF- und HF-Proben

5.1.3 Peptide-Mass-Fingerprint

Die globalen Proteinmuster nach Größenfraktionierung des Serums, die mittels Absorbanz- und Fluoreszenzmessung erhalten wurden, haben keine wesentlichen Unterschiede für LF- und HF-behandelte Patienten erbracht. Beiden Detektionsverfahren müssen methodisch bedingt jedoch gegenläufige Konzentrationsveränderungen innerhalb einzelner Fraktionen entgehen. Deshalb soll nun nach Unterschieden in der Proteinzusammensetzung mittels Peptide-Mass-Fingerprint gesucht werden.

Aus Kapazitätsgründen konnte dabei jedoch nicht für alle 96 Fraktionen aller 15 Patienten und 10 Kontrollprobanden ein Peptide-Mass-Fingerprint erstellt und untersucht werden. Es wurden daher Pools gebildet und diese untersucht. Die 96 1D-Fraktionen aller 9 Proben der Gruppe 1 aus der Abnahme a (Poolsatz Gr1 LF) und b (Poolsatz Gr1 HF) und aller 6 Proben der Gruppe 2 aus der Abnahme a (Poolsatz Gr2 HF) und b (Poolsatz Gr2 LF) wurden zu Poolsätzen, jeweils aus 96 gepoolten homologen Fraktionen bestehend, zusammengefasst. Ebenso wurden die 1D-Fraktionen der gesunden Probanden (n=10) gepoolt (Poolsatz GesPro). Da nach Größentrennung chromatographisch verteilte Proteine vorliegen, sollte es außerdem genügen, nur jede zweite Fraktion zu analysieren. Es waren somit 240 Fraktionen zu untersuchen. Diese Fraktionen wurden tryptisch verdaut und auf eine Maximalproteinkonzentration von ca. 2 $\mu\text{mol/l}$ mit 20 mM Ammoniumhydrogencarbonat

verdünnt und nach Zusatz des Eichpeptids in Doppelbestimmungen die Peptidmassen und normierten Peakhöhen (Intensitäten) mittels MALDI-MS bestimmt (Bublitz et al. 2006). Ab Fraktion 102 wurden die zu erwartenden niedermolekularen Peptide ohne Trypsinverdau massenspektrometrisch analysiert.

Aus den Massenlisten, der so analysierten Fraktionen, wurden mit Hilfe des Rieger-Programms zunächst diejenigen Peptidmassen herausgesucht, die in homologen Fraktionen der zu vergleichenden Proben übereinstimmend gefunden wurden. So entstanden pro untersuchte 1D Fraktion 3 Listen mit übereinstimmend gefundenen Peptidmassen der entsprechenden Vergleiche (LF vs HF, LF vs Gesund, HF vs Gesund). Dies wurde für beide Patientengruppen durchgeführt. Diese Listen enthielten jeweils bis zu 308 übereinstimmende Peptidmassen.

Um Konzentrationsunterschiede von den zugrunde liegenden gemeinsamen Peptiden feststellen zu können, wurden ihre Peakintensitäten mit Hilfe der Peakhöhe des Eichpeptids durch Quotientenbildung normiert. Dabei wurden auch unterschiedliche Verdünnungsfaktoren berücksichtigt. Aus den so erhaltenen normierten Intensitäten (NI) der Peptide der jeweils zu vergleichenden Fraktionen wurde die Differenz gebildet ($NI_{HF} - NI_{LF}$). So entstanden 288 Differenzbilder, die die Konzentrationsunterschiede einzelner Massepeaks zwischen den einzelnen Proben widerspiegeln. In Abb. 17 ist das Differenzbild der Fraktion 57 der Gruppe 2 beispielhaft dargestellt. Es zeigt die Differenz der normierten Intensitäten und somit die Konzentrationsunterschiede von den gefundenen 27 Peptiden in dieser Fraktion.

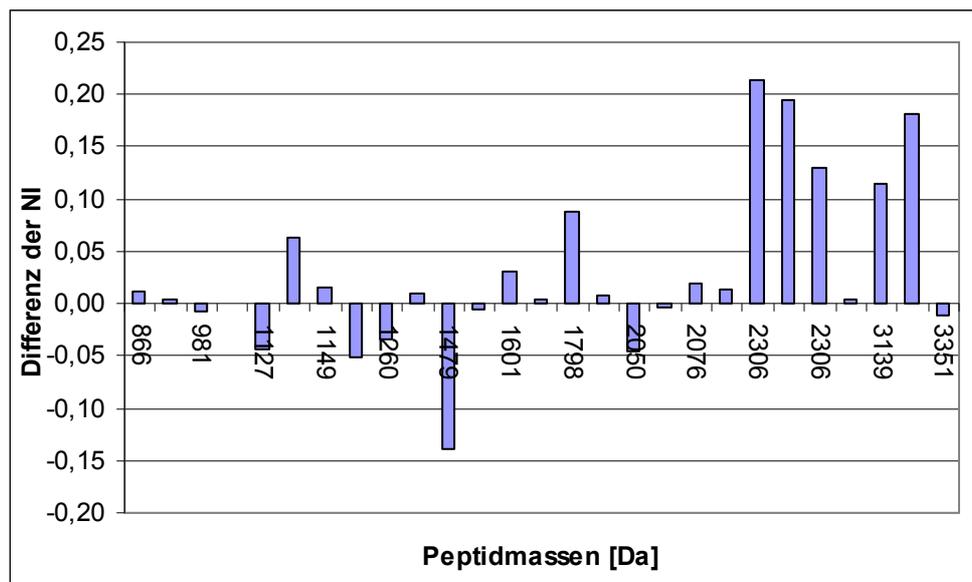


Abb. 17: Vergleich HF vs LF Gr2: Unterschiede der NI in Fraktion 57 übereinstimmend gefundenen Peptidmassen anhand der Differenz $NI_{HF} - NI_{LF}$

Da die Differenzen insgesamt sehr klein sind, wurden nun nur noch die Peptide mit dem größten Konzentrationsunterschied (95 - 100 % der maximalen Differenzen) in den verglichenen Fraktionen auch hinsichtlich ihres Verhaltens in aufeinander folgenden Fraktionen analysiert. So wurden in der Gruppe 1 76 und in der Gruppe 2 63 Peptidmassen untersucht. Dabei konnten in der Gruppe 1 16 Peptidmassen und in der Gruppe 2 15 Peptidmassen gefunden werden, die über ≥ 3 Fraktionen auftraten. Von diesen sind 9 in beiden Gruppen vertreten. Beispiele dazu sind in Tab. 4 aufgezeigt. Nach der Auswertung aller NI gleicher Peptidmassen in den verschiedenen Fraktionen konnte jedoch kein einheitliches quantitatives Verhalten der gefundenen Massepeaks im Vergleich von Fraktionen verschiedener Patientengruppen festgestellt werden.

Das heißt, alles zusammengefasst, es konnte kein einziges tryptisches Peptid gefunden werden, das sich reproduzierbar entweder nur bei der einen oder anderen Dialysemethode anreicherte.

A				
1D-Fraktion	NI			
	Gruppe 1		Gruppe 2	
	LF	HF	LF	HF
102	5.56	3.85	3.78	3.95
104			773.60	7.74
106	12.95	80.24		
108	10.32	5.14		
110	19.95	16.72		
112	19.48	17.91	18.17	19.45
114	12.83	35.92		
116	51.70	40.32	27.66	32.50
118	298.40	30.60	24.51	116.88
120				
122			9.53	39.00
124	25.58	70.82		
126	38.94	11.13	27.14	42.04
128	11.73	6.21	3.85	5.75
130	0.43	0.18	0.17	0.29
132	0.27	2.15	0.85	0.23

B				
1D-Fraktion	NI			
	Gruppe 1		Gruppe 2	
	LF	HF	LF	HF
38	1.19	0.22	0.32	0.73
40			2.26	0.17
42	0.56	0.28	0.31	0.14
44	0.73	0.13		
46	0.80	0.35	0.20	0.36
48	0.31	0.47	0.33	1.55
50	0.48	0.78	0.10	0.70
52	1.79	0.51	0.99	0.18
54				
56			0.35	0.51

Tab. 4. Beispiel für die Verteilung der NI zweier Massepeaks in den gepoolten Fraktionen aus Gruppe 1 und 2 ; A: Peptid, 1126.7 Da, welches in niedermolekularen Fraktionen auftrat und dem entsprechend dort ohne Trypsinverdau analysiert wurde; B: tryptisches Peptid, 2305.1 Da; NI: normierte Intensitäten

Des Weiteren wurden sowohl diejenigen homologen Fraktionen, die a) mit einem großen Prozentsatz an gemeinsamen bzw. b) mit einem hohen Anteil von unterschiedlichen Peptiden herausgestellt. Dies erfolgte unter Berücksichtigung der Gesamtanzahl der gefundenen Peptide der jeweiligen Fraktion in den verschiedenen Vergleichen (HF vs LF, HF vs Gesund,

LF vs Gesund, jeweils Gr1 und Gr2). Um diesen Prozentsatz zu ermitteln, wurde der Mittelwert und die einfache Standardabweichung von der Anzahl der gefundenen Peptiden in jeder Fraktion berechnet und dann die Fraktionen, die außerhalb eines Intervalls von einer Standardabweichung um den Mittelwert lagen als die Fraktionen mit großer bzw. kleiner Übereinstimmung in den gefundenen Peptiden definiert. Die Fraktionen mit einem kleinen Prozentsatz an übereinstimmenden Peptiden, d.h. großen Unterschieden in ihrem Peptidmuster, aber auch die Fraktionen mit einer hohen Übereinstimmung waren nicht auf einen bestimmten Bereich festlegbar (s. Tab. 5).

LF vs HF			
Gruppe 1		Gruppe 2	
1D- Fraktion	Prozentsatz der übereinstimmenden Peptide	1D- Fraktion	Prozentsatz der übereinstimmenden Peptide
44	91 %		
46	66 %		
48	63 %		
52	72 %		
54	67 %		
62	65 %		
		64	48 %
		84	48 %
		90	53 %
		92	49 %
94	73 %	98	53 %
		100	48 %
		106	48 %

Tab. 5: Fraktionen mit einem hohen Prozentsatz an Übereinstimmungen in den gefundenen Peptiden beim Vergleich LF vs HF in beiden Gruppen

Zusammengefasst muss festgestellt werden, dass mit Hilfe von Peptidmustern nach der 1D-Trennung kein reproduzierbarer Unterschied zwischen den Dialysemethoden gefunden werden konnte.

5.2 Ergebnisse nach der 2. Dimension - Ionenaustauschchromatographie

Der fehlende Nachweis von eventuell vorhandenen, jedoch durch die 1D-Trennung nicht darzustellende Unterschiede zwischen LF und HF im prä-dialytischen Serumproteom kann auf die noch zu hohe Komplexität der Proteingemische in den einzelnen Serumfraktionen

zurückzuführen sein, so dass sowohl die photometrische als auch massenspektrometrische Analytik versagen muss. Deshalb wurde nun versucht, die Komplexität der einzelnen Fraktionen durch einen zweiten Trennschritt weiter zu verringern. Auch hier wurden aus Kapazitätsgründen die oben aufgeführten Poolsätze der Proben verwendet. Diese 5 Poolsätze wurden wie im Methodenteil beschrieben mit Hilfe eines Arrays mit 96 Säulchen an ionenaustauschchromatographisch weiter subfraktioniert. Für den HF-Pool der Gruppe 2 ergibt sich damit beispielhaft folgendes Bild (Abb. 18):

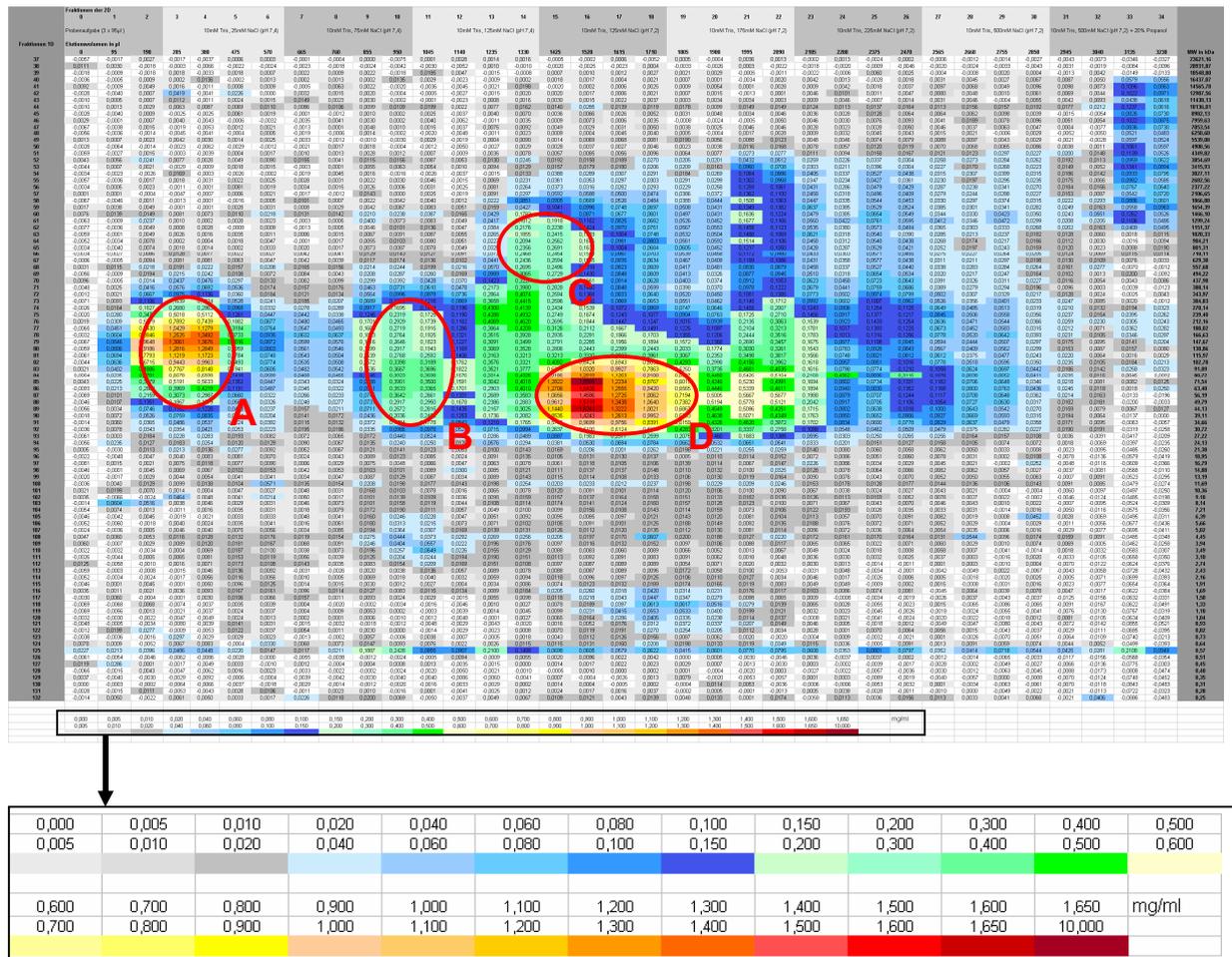


Abb. 18: Beispiel für die Proteinverteilung nach 2D-Trennung (HF-Pool Gr2), Farbcodierung entspricht der Proteingehamtkonzentration (von hellgrau $\leq 0,005$ mg/ml bis dunkelrot ≥ 5 mg/ml) in den Fraktionen eingekreiste Bereiche: A: Immunglobuline, B: Transferrin, C: Alpha-2-Makroglobulin, D: Albumin

In diesen Darstellungen können Bereiche von Fraktionen definiert werden, in denen sich ein großer Anteil charakteristischer Proteine befinden (siehe Abb. 18) (Cumme et al. 2008).

Um Unterschiede zwischen den homologen Fraktionen unterschiedlicher Poolsätze d.h. zwischen den Dialysemethoden feststellen zu können, wurden die Quotienten aus den Absorbanzen homologer Fraktionen errechnet. In die Auswertung wurden nur solche

Fractionen einbezogen, die eine Proteinkonzentration größer 0,03 mg/ml aufweisen, d.h. im Sensitivitätsbereich der Massenspektrometrie liegen.

Mit Hilfe dieser Darstellungen sollten nun Fractionen mit deutlichen Unterschieden (z. B. Quotienten von < 0,5 oder > 2,0) (Cumme et al. 2008) zwischen der Proteinkonzentration einzelner Poolsätze ermittelt werden. Die Quotienten der Proteinkonzentrationen der 2D-Fractionen beider interessierender Poolsätze ($c_{LF\ Gr1}/c_{HF\ Gr1}$ bzw. $c_{LF\ Gr2}/c_{HF\ Gr2}$) zeigten jedoch wiederum keine derartigen als signifikant anzusehende Unterschiede. In Abb. 19 ist der Quotient $c_{LF\ Gr1}/c_{HF\ Gr1}$ zu sehen; der von Gruppe 2 verhielt sich ähnlich.

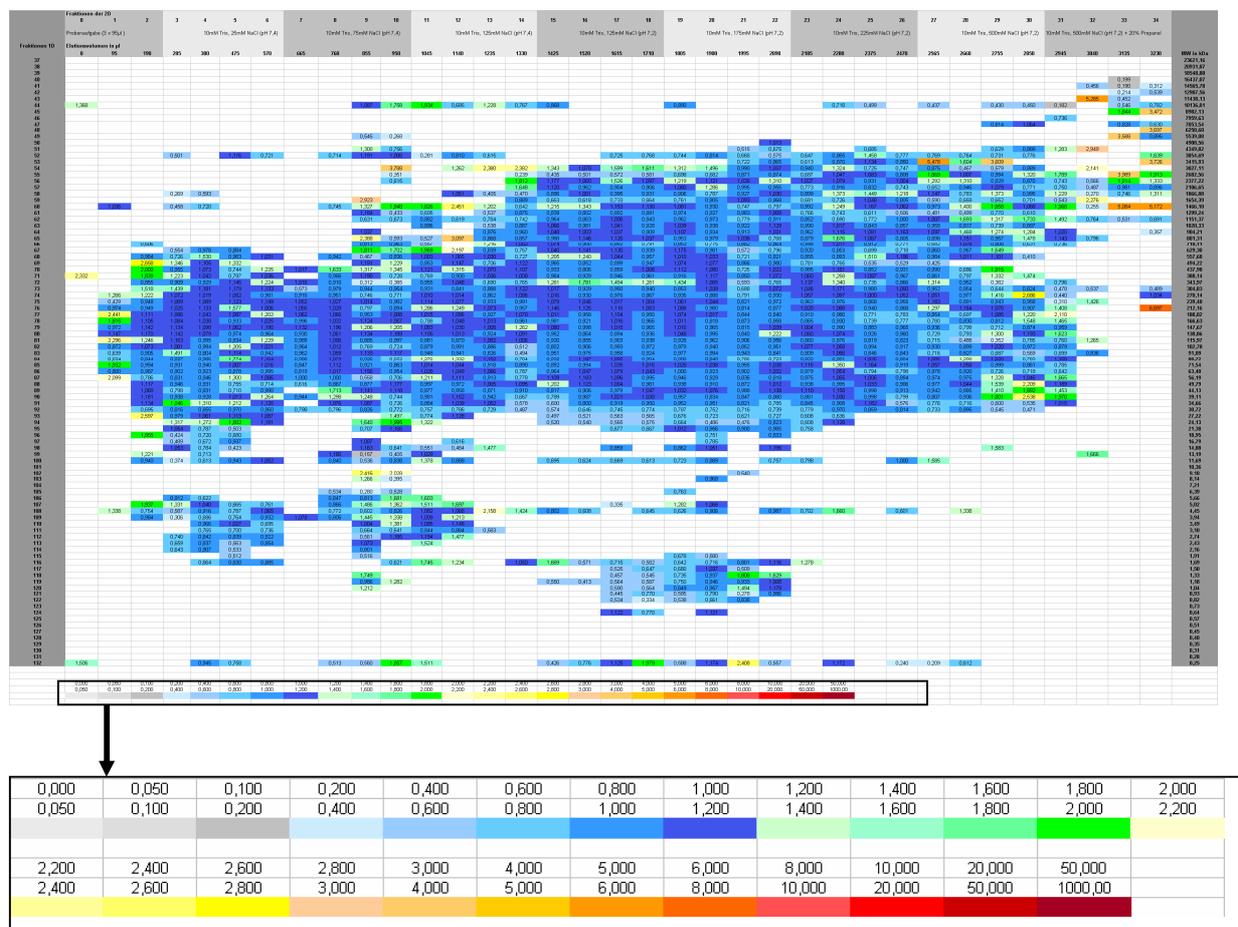


Abb. 19: Farbdarstellung des Quotienten der Proteinkonzentration c homologer Fractionen der Poolsätze nach 2D-Trennung c_{LF}/c_{HF} , Gruppe 1

Lediglich die Quotienten mit dem Poolsatz der gesunden Probanden ($c_{LF\ Gr1}$ oder $HF\ Gr1/c_{gesund}$ bzw. $c_{LF\ Gr2}$ oder $HF\ Gr2/c_{gesund}$) zeigten in einigen Fractionen deutliche Proteinkonzentrationsunterschiede.

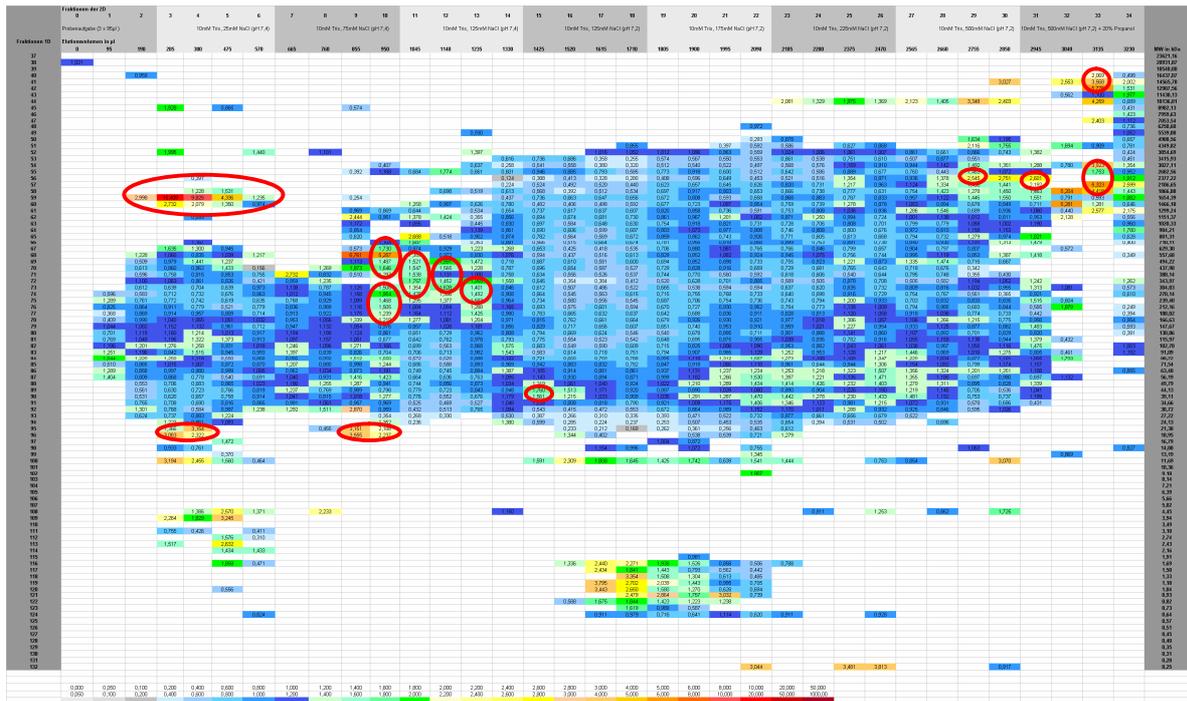


Abb. 21: Farbdarstellung des Quotienten der 2D-Trennungen $c_{HF\ Gr1}/c_{gesund}$ mit Markierung des Bereiches der tryptisch verdauten Fraktionen; Farbskalierung siehe Abb. 19

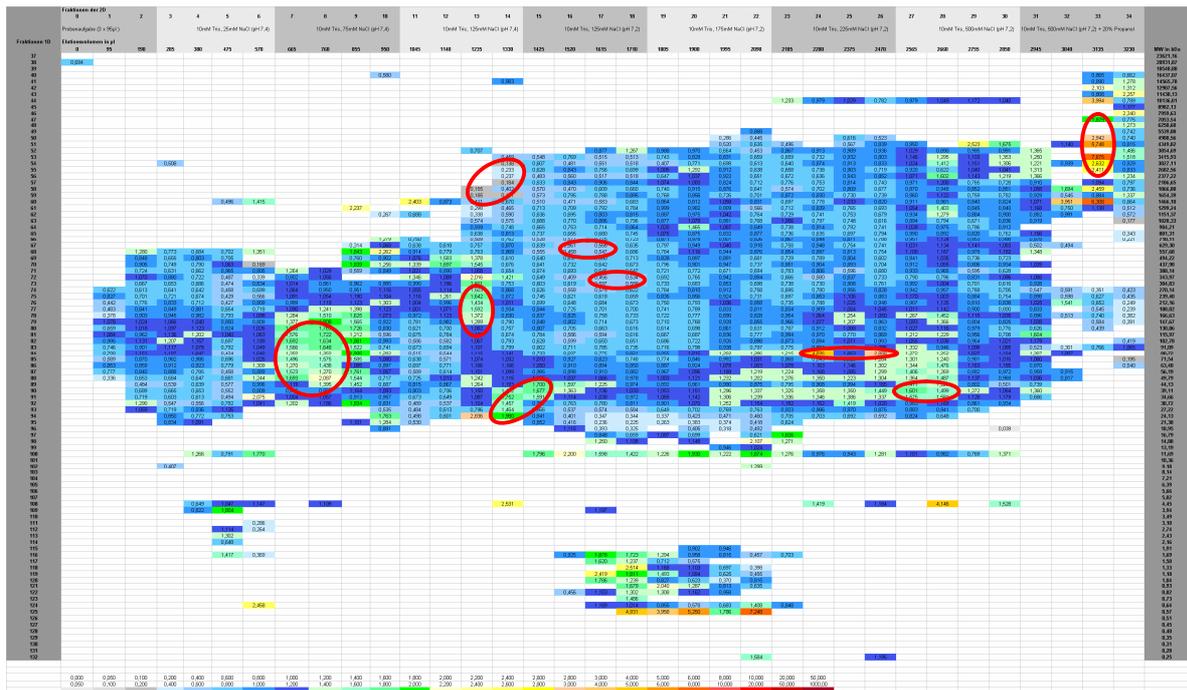


Abb. 22: Farbdarstellung des Quotienten der 2D-Trennungen $c_{HF\ Gr2}/c_{gesund}$ mit Markierung des Bereiches der tryptisch verdauten Fraktionen; Farbskalierung siehe Abb. 19

Mittels Microsoft-Access[®] wurden die Listen mittels LC-ESI-MS/MS identifizierter Proteine zwischen den Poolsätzen verglichen. Dabei wurden innerhalb einer Patientengruppe (Gruppe 1 bzw. Gruppe 2) die beiden Dialysemethoden (LF- und HF-Dialyse) untereinander und diese jeweils mit dem Poolsatz der gesunden Probandengruppe verglichen. Somit entstanden für

jede der beiden Gruppen 3 Abfragen (Gruppe 1: LF Gr1 vs HF Gr1, LF Gr1 vs GesPro und HF Gr1 vs GesPro; Gruppe 2: LF Gr2 vs HF Gr2, LF Gr2 vs GesPro und HF Gr2 vs GesPro). Die Auswertung erfolgte sowohl fraktionsabhängig, d.h. es wurden nur homologe Fraktionen verglichen, als auch fraktionsunabhängig, bei denen die Abfrage das gesamte untersuchte Fraktionsspektrum eines Poolsatzes umfasst.

5.2.1.1 Proteinidentifikation: Vorkommen in allen Proben

Tabelle 6 zeigt die Proteine, die in den ausgewählten Fraktionen beider Poolsätze der jeweiligen Gruppe sowohl in der LF- als auch HF-Probe vorlagen und auch in der homologen Fraktion der Kontrollgruppe übereinstimmend identifiziert wurden.

Gruppe 1		Gruppe 2	
Protein	expasy-Nummer	Protein	expasy-Nummer
Apolipoprotein A-I	P02647	26S proteasome	Q99460
Centaurin-beta 2	Q15057	Alpha-1-acid glycoprotein 1	P02763
Haptoglobin	P00738	Alpha-1-antitrypsin	P01009
Haptoglobin-related protein	P00739	Alpha-2-macroglobulin	P01023
Ig A	P01876	Centaurin-beta 2	Q15057
Ig G	P01857	Haptoglobin	P00738
Ig kappa	P01834	Haptoglobin-related protein	P00739
Low-density lipoprotein receptor-related protein	P98164	Ig A	P01876
SCAN domain-containing protein 2	Q9GZW5	Ig G	P01857
Serum albumin	P02768	Ig kappa	P01834
Transmembrane protease	Q9BYE2	Ig lambda	P01842
		Serotransferrin	P02787
		Serum albumin	P02768
		Transmembrane protease	Q9BYE2

Tab. 6: Liste der Proteine, die in den ausgewählten homologen Fraktionen der Poolsätze der jeweiligen Gruppen bei allen 3 Vergleichen (c_{LF}/c_{HF} , c_{LF}/c_{gesund} , c_{HF}/c_{gesund}) gleichermaßen identifiziert wurden

Studien anderer Arbeitsgruppen haben gezeigt (Langlois et al. 2004), dass Unterschiede zwischen Dialysemethoden nicht unbedingt durch grundsätzliche Veränderungen des Proteinmusters sondern eher durch Konzentrationsunterschiede von Serumproteinen bedingt sind. Um Konzentrationsunterschiede beurteilen zu können, wurden die in den Fraktionen identifizierten Proteine mittels normierter Höhensummen aus MALDI-MS quantifiziert (Bublitz et al. 2006).

Es wurden dabei nur zwei Proteine gefunden, die durchgängig in den LF-Pools beider Gruppen eine höhere Proteinkonzentration zeigten als in dem zugehörigen HF-Pool. Diese sind Haptoglobin (siehe Tab. 7) und IgG (siehe Tab. 8). Wenn beide Dialysegruppen zusammengefasst werden, wurde Haptoglobin außerdem bei allen Dialysepatienten in kleinere Konzentrationen gefunden als bei der Kontrollgruppe.

LF Gr1		HF Gr1		Quotient LF Gr1/HF Gr1
MW	SD	MW	SD	
0,489	0,158	0,103	0,040	4,7
LF Gr2		HF Gr2		Quotient LF Gr2/HF Gr2
0,090	0,021	0,014	0,022	
HF Gr1		GesPro		Quotient HF Gr1/GesPro
0,555	0,045	4,119	0,696	
HF Gr2		GesPro		Quotient HF Gr2/GesPro
1,024	0,218	5,219	1,311	
LF Gr1		GesPro		Quotient LF Gr1/GesPro
1,847	0,105	2,381	0,468	
LF Gr2		GesPro		Quotient LF Gr2/GesPro
0,080	0,038	0,172	0,035	

Tab. 7: Normierte Höhensummen aller Massepeaks zu Haptoglobin gehörender Peptide, Mittelwerte (MW) und deren einfache Standardabweichung (SD) aus Vierfachbestimmungen der analysierten Fraktionen der jeweiligen Poolsätze

LF Gr1		HF Gr1		Quotient LF Gr1/HF Gr1
MW	SD	MW	SD	
1,996	0,116	0,380	0,043	5,3
LF Gr2		HF Gr2		Quotient LF Gr2/HF Gr2
2,912	0,590	1,179	0,333	

Tab. 8: Normierte Höhensummen aller Massepeaks zu IgG gehörender Peptide, Mittelwerte (MW) und deren einfache Standardabweichung (SD) aus Vierfachbestimmungen der analysierten Fraktionen der jeweiligen Poolsätze

Es wurde eine Reihe weiterer Proteine gefunden, die deutliche Konzentrationsunterschiede zwischen den einzelnen Pools aufweisen. Zu diesen Proteinen gehören: Alpha-1-antitrypsin, Alpha-2-macroglobulin, Serum albumin, Apolipoprotein A-I, Apolipoprotein A-II, Apolipoprotein B-100, C4b-binding protein, Complement factor H, Complement C3, Hemopexin, Serotransferrin, Pregnancy zone protein, Thioredoxin-like protein und das Zinc-alpha-2-glycoprotein.

Viele dieser Proteine sind als Akute-Phase-Proteine oder als Marker für die herrschende Stoffwechsellage des Organismus bekannt. Sie zeigten bei unseren Analysen allerdings kein einheitliches quantitatives Verhalten in den Vergleichsgruppen bzw. konnten in der korrespondierenden Vergleichsgruppe nicht reproduziert werden.

Die Tabelle 9 stellt dies anhand des Complement factor H dar. In der Gruppe 1 ist dieses Protein nach LF im Vergleich zu HF erhöht. Dies war nicht in der Gruppe 2 reproduzierbar. Dieses Protein wurde in den ausgewählten Fraktionen bei Gruppe 2 mit Hilfe von ESI-MS nicht gefunden. Im Vergleich mit den Proben der gesunden Probanden ist das Protein jedoch erniedrigt gefunden worden.

LF Gr1		HF Gr1		Quotient LF Gr1/HF Gr1
MW	SD	MW	SD	
1,539	0,133	1,056	0,044	1,458
LF Gr1		GesPro		Quotient LF Gr1/GesPro
1,751	0,025	3,742	0,533	
HF Gr1		GesPro		Quotient HF Gr1/GesPro
1,216	0,040	2,681	0,474	

Tab. 9: Normierte Höhensummen aller Massepeaks zu Complement factor H gehörender Peptide, Mittelwerte (MW) und deren einfache Standardabweichung (SD) aus Vierfach - bestimmungen der analysierten Fraktionen der jeweiligen Poolsätze

5.2.1.2 Proteinidentifikation: Vorkommen in einzelnen Poolsätzen

Nach der Analyse der Proteine, die in beiden Poolsätzen eines Vergleichs gefunden wurden (4.2.1.1), soll im folgenden Abschnitt auf die Proteine eingegangen werden, die anhand der Identifikation mittels dem ESI-MS nur in einem der zu vergleichenden Poolsätzen gefunden wurden (Tab. 11 - 15).

	Gruppe 1	Gruppe 2
LF-Pool	7	4
HF-Pool	18	13
GesPro-Pool	96	

Tab.10: Anzahl der Proteine, die mit ESI-MS ausschließlich in dem entsprechenden Poolsatz und sonst in keinem weiteren gefunden wurden

LF Gruppe 1	
Proteinname	ID-Nr. Expsy
Acyl-CoA dehydrogenase	P49748
Dynein heavy chain	Q14204
Low-density lipoprotein receptor-related protein 1	Q07954
Regulator of G-protein signaling 9	A8K1G1
Tetraspanin-9	O75954
Zinc finger protein 142	P52746
Zinc finger protein 90	Q8TF47

Tab. 11: beim Vergleich der Proben beider Dialysemethoden mit ESI-MS in selektierten Fraktionen ausschließlich im Poolsatz LF Gruppe 1 identifizierte Proteine

HF Gruppe 1	
Proteinname	ID-Nr. Expasy
Adapter-related protein complex 3 delta 1 subunit	O14617
Aggrecan core protein	P16112
Alpha-1-antichymotrypsin	P01011
Alpha-taxilin	P40222
Baculoviral IAP repeat-containing protein 8	Q96P09
B-cell receptor-associated protein 29	Q9UHQ4
Brevican core protein	Q96GW7
Centaurin-delta 1	Q8WZ64
Ceruloplasmin precursor	P00450
Forkhead box protein L2	P58012
Inorganic pyrophosphatase	Q15181
Leucine-rich repeat transmembrane protein FLRT2	O43155
Mas-related G-protein coupled receptor member F	Q96AM1
Nidogen precursor (Entactin)	P14543
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase E	Q9UNP9
Probable RNA-binding protein 25	P49756
Relaxin 3	Q8WXF3
Thioredoxin-like protein 1	O43396

Tab. 12: beim Vergleich der Proben beider Dialysemethoden mit ESI-MS in selektierten Fraktionen ausschließlich im Poolsatz HF Gruppe 1 identifizierte Proteine

LF Gruppe 2	
Proteinname	ID-Nr. Expasy
Ankyrin repeat domain protein 11	Q6UB99
Keratin, type I cytoskeletal 9	P35527
Keratin, type II cytoskeletal 1	P04264
Zinc finger protein 91 homolog	Q96JP5

Tab. 13: beim Vergleich der Proben beider Dialysemethoden mit ESI-MS in selektierten Fraktionen ausschließlich im Poolsatz LF Gruppe 2 identifizierte Proteine

HF Gruppe 2	
Proteinname	ID-Nr. Expasy
AMBP protein	P02760
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2	Q9BPX4
Ig kappa chain V-III region GOL	P04206
Ig kappa chain V-III region HAH	P18135
Ig kappa chain V-III region HIC	P18136
Ig kappa chain V-III region SIE	P01620
Ig kappa chain V-III region Ti	P01622
Ig kappa chain V-III region WOL	P01623
Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 8 homolog	Q96G25
Microtubule-associated protein 1B	P46821
Plasma retinol-binding protein precursor	P02753
Zinc finger protein 271	Q14591
Zinc finger protein 509	Q6ZSB9

Tab. 14: beim Vergleich der Proben beider Dialysemethoden mit ESI-MS in selektierten Fraktionen ausschließlich im Poolsatz HF Gruppe 2 identifizierte Proteine

GesPro	
Proteinname	ID-Nr. Expsy
1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase delta 1	P51178
Alpha-1-acid glycoprotein 2	P19652
Alpha-1-acid glycoprotein 1	P02763
Alpha-1B-glycoprotein	P04217
Alpha-2-HS-glycoprotein	P02765
Angiopoietin-2	O15123
Antithrombin-III	P01008
Apolipoprotein A-II	P02652
Apolipoprotein A-IV	P06727
Apolipoprotein C-I	P02654
Bromodomain adjacent to zinc finger domain 2B	Q9UIF8
Carbonyl reductase [NADPH] 3	O75828
Cell division cycle 2-like protein kinase 5	Q14004
Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 7	Q9P2D1
Ciliary dynein heavy chain 9 (Axonemal beta dynein heavy chain 9) - Homo sapiens (Human).	Q9NYC9
Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 8	P60827
Complement C3	P01024
Complement C5	P01031
Complement factor B	P00751
Complement factor H	P08603
Cytochrome P450 3A43	Q9HB55
DNA polymerase epsilon, catalytic subunit A	Q07864
Dolichyl-phosphate beta-glucosyltransferase	Q9Y673
Double-stranded RNA-binding protein Staufen homolog 2	Q9NUL3
Eukaryotic translation initiation factor 5B	O60841
F-box only protein 5	Q9UKT4
FK506-binding protein 9 precursor	O95302
Forkhead box protein D4	Q12950
Galactose-3-O-sulfotransferase 3	Q96A11
Glucocorticoid receptor	P49115
Glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 2	O94808
Glutamate [NMDA] receptor subunit epsilon 4	O15399
Hemopexin	P02790
Heparin cofactor II	P05546
Hexokinase-1	P19367
Homeobox protein TGIF2LX	Q8IUE1
Homeobox protein TGIF2LY	Q8IUE0
Ig gamma-2 chain C region	P01859
Ig gamma-3 chain C region	P01860
Ig gamma-4 chain C region	P01861
Ig heavy chain V-III region TEI	P01777
Ig mu heavy chain disease protein (BOT)	P04220
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	P19827
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	Q14624
Kanadaplin	Q9BWU0
Kinesin family member 21A	B011R9
Kininogen-1	P01042
Leptin receptor gene-related protein	O15243
Leucine-rich alpha-2-glycoprotein precursor	P02750
Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 5	Q9ULC5
Low-density lipoprotein receptor-related protein 2	P98164
Mineralocorticoid receptor	P08235
Mitochondrial intermediate peptidase	Q99797

Tab. 15: Fortsetzung siehe nächste Seite

GesPro	
Proteinname	ID-Nr. Expsy
Multidrug resistance protein 1	P08183
Myelin transcription factor 1-like protein	Q9UL68
Myosin-14	Q7Z406
Myosin-9	P35579
Olfactory receptor 52W1	Q6IF63
Phosphorylase b kinase	P46020
Pigment epithelium-derived factor	P36955
Plasminogen	P00747
Protein C4orf17	Q53FE4
Protein kinase C binding protein	Q9ULU4
Protocadherin Fat 2	Q9NYQ8
Puromycin-sensitive aminopeptidase	P55786
Putative GTP-binding protein RAY-like	Q9BW83
Putative RNA-binding protein 15	Q96T37
Rab6-interacting protein 1	Q6IQ26
Regulating synaptic membrane exocytosis protein 1	Q86UR5
Retinol-binding protein II	P50120
Rho-related GTP-binding protein	Q9H4E5
Secreted frizzled-related protein 2	Q96HF1
Serine protease hepsin	P05981
Serum amyloid A-4 protein	P35542
Solute carrier family 12 member 4	Q9UP95
Solute carrier family 12 member 5	Q9H2X9
Solute carrier family 12 member 7	Q9Y666
Sperm-associated antigen	Q07617
Stress-induced-phosphoprotein 1	P31948
Toll-like receptor 1 precursor	Q15399
Transmembrane cochlear-expressed protein 2	Q8TDI7
Tumor necrosis factor receptor superfamily member 21	O75509
Tyrosine-protein kinase CSK	P41240
U11/U12	Q9BV90
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 13	Q92995
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 36	Q9P275
Ubiquitin-like containing PHD and RING finger domains protein 2	Q96PU4
Vacuolar protein sorting 33B	Q9H267
Vitamin D-binding protein	P02774
Xaa-Pro aminopeptidase 1	Q9NQW7
Zinc finger CCHC domain containing protein 10	Q8TBK6
Zinc finger protein 307	Q969J2
Zinc finger protein 407	Q9C0G0
Zinc-alpha-2-glycoprotein	P25311

Tab. 15: beim Vergleich der Proben beider Dialysemethoden mit ESI-MS in selektierten Fraktionen ausschließlich im Poolsatz GesPro identifizierte Proteine

Es folgte nun die Quantifizierung dieser Proteine mittels MALDI-MS. Hierzu wurden wieder die normierten Höhensummen analysiert. In die Auswertung wurden nur solche Proteine einbezogen, bei denen > 10% der theoretisch möglichen Peptide zweifelsfrei mit MALDI-MS identifiziert werden konnten.

Es zeigte sich, dass mit diesem Verfahren zahlreiche mittels ESI-MS in der korrespondierende homologen Fraktion nicht gefundener Proteine dennoch zuordenbare

Signale bei MALDI-MS aufwiesen und daher die normierten Höhengsummen zum quantitativen Vergleich der jeweiligen homologen Fraktionen genutzt werden konnten. Die identifizierten Proteine und die entsprechenden normierten Höhengsummen als semi-quantitative Proteinkonzentrationsbestimmung, sind für die jeweiligen Vergleiche in Tabelle 16 - 21 dargestellt.

Protein	expasy-Nummer	LF Gr1		HF Gr1	
		MW	SD	MW	SD
		Fraktion 11_72			
Ig kappa	P01834	0,073	0,044	0,006	0,004
Low-density lipoprotein	P98164	1,421	0,558	0,635	0,128
		Fraktion 12_69			
Albumin	P02768	0,157	0,051	0,054	0,013
		Fraktion 16_72			
Alpha-2-macroglobulin	P01023	0,451	0,098	0,263	0,023
Albumin	P02768	0,250	0,077	0,106	0,033
IgA2	P01877	0,021	0,006	0,004	0,003
Apolipoprotein A-I	P02647	0,071	0,020	0,028	0,007
Complement factor H	P08603	1,740	0,145	1,152	0,033
IgG	P01857	0,053	0,012	0,026	0,008
Folate transporter	P41440	0,059	0,003	0,035	0,015
Serotransferrin	P02787	0,343	0,085	0,148	0,051
Zinc finger protein 90	Q8TF47	0,129	0,035	0,046	0,008

Tab. 16: normierte Höhengsummen von Proteinen, Mittelwert (MW) und einfache Standardabweichung (SD); Poolsatz LF und HF Gruppe 1, rot = höhere Proteinkonzentration des entsprechenden Proteins

Protein	expasy-Nummer	LF Gr2		HF Gr2	
		MW	SD	MW	SD
		Fraktion 13_74			
Alpha-1-acid glycoprotein	P02763	0,1103	0,0189	0,0713	0,0179
Inter-alpha-trypsin inhibitor	P02760	0,0290	0,0062	0,0818	0,0403
		Fraktion 14_58			
Alpha-2-macroglobulin	P01023	0,1733	0,0302	0,3883	0,0647
		Fraktion 17_73			
Haptoglobin-related protein	P00739	0,0135	0,0052	0,0220	0,0040
Microtubule-associated protein	P46821	0,3338	0,0740	0,6977	0,1640
Folate transporter	P41440	0,0383	0,0044	0,1300	0,0305

Tab. 17: normierte Höhengsummen von Proteinen, Mittelwert (MW) und einfache Standardabweichung (SD); Poolsatz LF und HF Gruppe 2, rot = höhere Proteinkonzentration des entsprechenden Proteins

Protein	expasy-Nummer	LF Gr1		GesPro	
		MW	SD	MW	SD
		Fraktion 10_76			
IgG 2	P01859	0,0327	0,0046	0,0135	0,0116
IgG 3	P01860	0,0840	0,0140	0,0180	0,0092
IgG 4	P01861	0,0450	0,0076	0,0235	0,0035
Ig lambda	P01842	0,1407	0,0456	0,0308	0,0067
		Fraktion 14_58			
Apolipoprotein B-100	P04114	1,5955	0,1520	2,4218	0,1673
Serotransferrin	P02787	0,1875	0,0193	0,1406	0,0287
		Fraktion 16_72			
IgG 2	P01859	0,0135	0,0088	0,1455	0,1088
IgG 3	P01860	0,0169	0,0089	0,1403	0,0532
IgG 4	P01861	0,0326	0,0175	0,2340	0,0612
Folate transporter	P41440	0,0484	0,0149	0,5290	0,0886
Serotransferrin	P02787	0,4305	0,0227	1,4904	0,5123
Zinc finger protein	Q8TF47	0,1316	0,0358	0,9252	0,2546

Tab. 18: normierte Höhengsummen von Proteinen, Mittelwert (MW) und einfache Standardabweichung (SD); Poolsatz LF Gruppe 1 und Poolsatz GesPro, rot = höhere Proteinkonzentration des entsprechenden Proteins

Protein	expasy-Nummer	LF Gr2		GesPro	
		MW	SD	MW	SD
		Fraktion 11_82			
Hämopexin	P02790	0,249	0,073	0,066	0,033
Eukaryotic translation initiation factor	O60841	2,788	0,194	4,158	0,204
Ig kappa	P01834	0,075	0,026	0,011	0,006
Leptin receptor gene-related protein	O15243	0,055	0,016	0,019	0,008
		Fraktion 12_70			
Stress-induced-phosphoprotein	P31948	0,118	0,009	0,082	0,010
		Fraktion 14_60			
Alpha-2-macroglobulin	P01023	0,077	0,025	0,199	0,046
F-box only protein	Q9UKT4	0,024	0,006	0,064	0,028
Low-density lipoprotein receptor-related protein	P98164	0,185	0,057	0,345	0,163
		Fraktion 17_73			
Apolipoprotein A-I	P02647	0,077	0,010	0,385	0,082
IgG 4	P01861	0,003	0,002	0,012	0,006
		Fraktion 17_83			
Alpha-1-acid glycoprotein	P02763	1,614	0,907	7,597	5,103
Alpha-1-antitrypsin	P01009	2,336	0,279	17,217	11,130
IgG 1	P01857	3,904	1,198	12,260	8,299
Toll-like receptor	Q15399	3,375	1,340	19,054	14,079

Tab. 19: normierte Höhengsummen von Proteinen, Mittelwert (MW) und einfache Standardabweichung (SD); Poolsatz LF Gruppe 2 und Poolsatz GesPro, rot = höhere Proteinkonzentration des entsprechenden Proteins

Protein	expasy-Nummer	HF Gr1		GesPro	
		MW	SD	MW	SD
IgA1	P01876	Fraktion 10_74			
		0,029	0,016	0,009	0,008
IgA1	P01876	Fraktion 11_70			
		0,006	0,002	0,022	0,013
IgG 2	P01859	Fraktion 11_72			
		0,021	0,006	0,009	0,004
Stress-induced-phosphoprotein	P31948	Fraktion 12_70			
		0,181	0,090	0,268	0,116
Albumin	P02768	Fraktion 14_82			
		0,172	0,069	0,466	0,027
Apolipoprotein A-I	P02647	0,063	0,034	0,274	0,025
Hämopexin	P02790	0,266	0,153	0,670	0,089
Phosphoinositide phospholipase C	P51178	0,200	0,021	0,256	0,026
		Fraktion 15_88			
Heparin cofactor II	P05546	0,252	0,232	2,565	1,381
Mas-related G-protein coupled receptor	Q96AM1	1,072	0,216	6,675	2,598
Puromycin-sensitive aminopeptidase	P55786	4,284	1,259	31,360	14,571
Tumor necrosis factor receptor	O75509	2,187	1,362	16,550	5,591
Vitamin D-binding protein	P02774	4,608	2,589	46,200	5,894
Zinc-alpha-2-glycoprotein	P25311	1,422	1,000	15,230	4,355
Tumor necrosis factor receptor	O75509	Fraktion 15_89			
		1,724	0,164	1,297	0,376
Serotransferrin	P02787	2,823	0,821	1,657	0,368
Thioredoxin-like protein	O43396	1,731	0,729	0,364	0,193
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	Q9P275	6,570	2,675	2,191	1,123
E3 ubiquitin-protein ligase	Q96PU4	1,512	0,479	0,723	0,343
Zinc finger protein	Q9C0G0	3,624	0,931	1,773	0,242
Alpha-2-macroglobulin	P01023	Fraktion 16_72			
		0,212	0,070	0,828	0,184
Albumin	P02768	0,117	0,053	0,323	0,063
Apolipoprotein A-I	P02647	0,053	0,012	0,201	0,118
Complement factor H	P08603	1,174	0,048	3,020	0,435
Chromodomain-helicase-DNA-binding protein	Q9P2D1	0,297	0,119	1,211	0,248
IgG 1	P01857	0,024	0,003	0,267	0,187
IgG 4	P01861	0,019	0,011	0,066	0,012
Ig kappa	P01834	0,015	0,010	0,090	0,025
Dolichyl-phosphate beta-glucosyltransferase	Q9Y673	Fraktion 22_88			
		6,231	1,031	4,061	0,575
Alpha-taxilin	P40222	6,784	1,849	2,840	0,663
Probable RNA-binding protein	P49756	Fraktion 26_87			
		0,256	0,023	0,350	0,050

Tab. 20: normierte Höhensummen von Proteinen, Mittelwert (MW) und einfache Standardabweichung (SD); Poolsatz HF Gruppe 1 und Poolsatz GesPro, rot = höhere Proteinkonzentration des entsprechenden Proteins

Protein	expasy-Nummer	HF Gr2		GesPro	
		MW	SD	MW	SD
		Fraktion 13_76			
Coatomer	P53618	0,583	0,152	0,208	0,083
IgG 3	P01860	0,077	0,028	0,024	0,019
IgG 4	P01861	0,111	0,027	0,027	0,016
Haptoglobin	P00738	0,048	0,034	0,009	0,007
Haptoglobin-related protein	P00739	0,094	0,032	0,041	0,015
Ig heavy chain V-III region TEI	P01777	0,064	0,031	0,010	0,005
Mediator of RNA polymerase II	Q5HZZ6	0,151	0,041	0,048	0,008
Serotransferrin	P02787	0,538	0,138	0,267	0,045
		Fraktion 14_58			
Apolipoprotein B-100	P04114	1,367	0,084	3,353	1,006
Centaurin-beta-2	Q15057	0,053	0,010	0,210	0,145
F-box only protein	Q9UKT4	0,042	0,008	0,074	0,025
IgM	P01871	0,015	0,006	0,080	0,032
Ig mu	P04220	0,007	0,001	0,024	0,019
		Fraktion 14_60			
Apolipoprotein B-100	P04114	0,541	0,126	1,157	0,525
F-box only protein	Q9UKT4	0,036	0,016	0,106	0,062
Haptoglobin	P00738	0,026	0,007	0,086	0,040
IgM	P01871	0,014	0,006	0,034	0,010
		Fraktion 16_67			
Apolipoprotein B-100	P04114	0,531	0,257	2,205	0,238
Myosin	P35579	0,377	0,214	1,042	0,376
		Fraktion 16_73			
Alpha-2-macroglobulin	P01023	0,155	0,041	0,372	0,037
Apolipoprotein A-I	P02647	0,018	0,004	0,357	0,099
Apolipoprotein B-100	P04114	0,409	0,093	1,169	0,137
Tyrosine-protein kinase	P41240	0,046	0,017	0,120	0,070
Carbonyl reductase	O75828	0,012	0,009	0,038	0,009
DNA polymerase epsilon catalytic subunit A	Q07864	0,171	0,072	0,287	0,033
IgG 4	P01861	0,027	0,019	0,061	0,027
Ig heavy chain V-III region TEI	P01777	0,004	0,003	0,011	0,002
Folate transporter	P41440	0,024	0,013	0,054	0,025
Transient receptor	Q7Z2W7	0,070	0,025	0,203	0,060
		Fraktion 17_67			
IgA	P01876	0,037	0,002	0,110	0,036
SCAN domain-containing protein	Q9GZW5	0,054	0,017	0,095	0,018
		Fraktion 17_73			
Alpha-2-macroglobulin	P01023	0,070	0,014	0,211	0,033
Ig kappa	P01834	0,003	0,001	0,014	0,005
IgG 1	P01857	0,008	0,003	0,035	0,021
Apolipoprotein A-I	P02647	0,013	0,004	0,688	0,169
Albumin	P02768	0,035	0,015	0,084	0,029
Multidrug resistance protein	P08183	0,051	0,011	0,167	0,048
Inter-alpha-Trypsininhibitor	P19827	0,023	0,013	0,057	0,012
Microtubule-associated protein	P46821	0,088	0,046	0,290	0,137
Complement C1q	P60827	0,006	0,002	0,022	0,016
Centaurin-beta-2	Q15057	0,025	0,011	0,053	0,005

Tab. 21: normierte Höhensummen von Proteinen, Mittelwert (MW) und einfache Standardabweichung (SD); Poolsatz HF Gruppe 2 und Poolsatz GesPro, rot = höhere Proteinkonzentration des entsprechenden Proteins

In den wenigen Fraktionen, die aufgrund von moderaten Proteinkonzentrationsunterschieden ausgewählt wurden, zeigt sich anhand der normierten Höhensummen in der Gruppe 1 eine Konzentrationserhöhung aller quantitativ unterschiedlich gefundenen Proteine nach LF im Vergleich zu HF (siehe Tab 17). Bei der Gruppe 2 ist dagegen die Konzentration der meisten der untersuchten Proteine im HF-Pool höher. Dabei ist zu berücksichtigen, dass in den für beide Vergleiche selektierten Fraktionen außerdem z.T. unterschiedliche Proteine identifiziert wurden. Lediglich die Proteine Alpha-2-macroglobulin und Folate transporter wurden in beiden Gruppen gleichermaßen verändert gefunden. Alpha-2-macroglobulin weist im typischen Molekulargewichtsbereich von größer 1600 kDa (Fr. 14_58, Tab. 17) eine höhere Konzentration nach HF, in einem niedermolekularen Bereich von ca. 300 kDa (Fr. 16_72, Tab. 20) ein gegenläufiges Verhalten auf.

Beim Vergleich der Proben der Dialysepatienten mit den gesunden Probanden weisen in den untersuchten Fraktionen, die meisten Proteine eine höhere Konzentration bei den gesunden Probanden auf.

Zusammengefasst konnten zwar Proteinkonzentrationsunterschiede beim Vergleich einzelner Proben gefunden werden, diese waren jedoch, bis auf Haptoglobin und IgG (siehe 5.2.1.1), nicht in beiden Patientengruppen reproduzierbar.

6 Diskussion

6.1 Allgemeine Auswirkungen der Niereninsuffizienz

Durch den chronischen Verlust der Nierenfunktion kommt es zu einer Veränderung verschiedenster Stoffwechselforgänge im Organismus. Neben der Entwicklung einer Hypertonie, einer Anämie und von Störungen im Elektrolythaushalt ist eine grobe Veränderung bei der Zusammensetzung der Serumproteine, z.B. durch chronische Entzündungsvorgänge und die Einschränkung der glomerulären Filtration der Nieren zu erwarten.

6.2 Grunderkrankungen

Nierenversagen kann durch eine Vielzahl von chronischen Erkrankungen wie Diabetes, Bluthochdruck oder Glomerulonephritis u.a.m. bedingt sein. Jede Grunderkrankung kann die Serumkomponenten unterschiedlich beeinflussen. Allerdings stellte Langlois mit Hilfe von Proteinmustern nach SELDI-TOF-MS fest, dass die Art der Dialysetherapie einen größeren Effekt auf die Serumproteine hat als die Grunderkrankung (Langlois et al. 2004). Aus diesem Grund verzichteten wir darauf die Patienten unserer Studie nach ihren Grunderkrankungen zu klassifizieren.

6.3 Serumveränderungen durch die Nierenersatztherapie

Eine Nierenersatztherapie versucht die Verluste der Filtrationsleistung der Niere auszugleichen. Dadurch wird jedoch auch eine negative Proteinbilanz induziert. Wie Gil und Caglar beschreiben, verringert sich unter Dialysetherapie die Aminosäurezirkulation. Die Proteolyse und die Aminosäurefreisetzung aus dem Muskel wird erhöht (Gil et al. 2007, Caglar et al. 2002). Außerdem kommt es zu Proteinverlusten durch Diffusionsvorgänge an der Dialysemembran und akuten inflammatorischen Vorgängen durch Bioinkompatibilitäten. Es ist ein Proteinverlust von ca. 7 g pro Dialysebehandlung beschrieben (Ikizler et al. 2002). Neben dem Proteinstoffwechsel ist auch der Fettstoffwechsel bei ESRD-Patienten beeinträchtigt. Homocystein und Lipoprotein A, welche Marker für die kardiovaskuläre

Mortalität sind, sind bei Dialysepatienten erhöht. Außerdem liegen Störungen im Apolipoproteinhaushalt, eine Hypertriglyceridämie und eine ineffektive Lipolyse durch die erhöhte Konzentration von Lipolyseinhibitoren, auf Grund der Niereninsuffizienz, vor (House et al. 2000). Auch bei unseren Untersuchungen zeigten sich die Konzentrationen von Apolipoprotein AI und Apolipoprotein B100 in verschiedenen Fraktionen bei den Proben der Dialysepatienten (LF und HF) in beiden Gruppen im Vergleich mit der gesunden Kontrollgruppe erniedrigt (Apolipoprotein AI: Tab. 19 Fraktion 17_73; Tab. 20 Fraktion 14_82 und Fraktion 16_72; Tab 21 Fraktion 16_73 und Fraktion 17_73 / Apolipoprotein B100: Tab. 18 Fraktion 14_58; Tab 21 Fraktion 14_58, Fraktion 14_60 und Fraktion 16_73).

Auf Grund des Ausfalls der Ausscheidungsfunktion der Nieren, der Grunderkrankung und der Therapie kommt es zur Kumulation verschiedener Moleküle im Serum von ESRD-Patienten. Vanholder benennt in seiner Studie (Vanholder et al. 2003) Urämietoxine in einem Molekulargewichtsbereich von 58 Da bis 26 kDa und auch Lesaffer beschreibt die Urämietoxine als eine inhomogene und noch nicht genau definierte Proteingruppe (Lesaffer et al. 2000). Mit Hilfe der Dialysebehandlung sollen u.a. diese toxischen Substanzen aus dem Organismus entfernt werden.

Die Beurteilung der Studienlage hinsichtlich Vorteile bestimmter Dialysemembranen ist schwierig, da viele Studien Verfahren mit unterschiedlichen Membranen vergleichen, wie z.B. Cellulose- bzw. Cuprophanmembranen mit synthetischen Membranen. Die klinische Überlegenheit von biokompatiblen Membranen (z.B. Polysulfon-, Polymethylmethacrylat-, Polyacrylnitril-, Polyamidmembranen) ist in der Literatur unumstritten (Gastaldello et al. 2000, Ponikvar et al. 2001, Schiffl et al. 1994, Hakim et al. 1994, Himmelfarb et al. 1998, Schiffl et al. 1998, Jorres et al. 1999, Woods und Nandakumar 2000), nur Kurtal und Jörres kamen mit ihren Studien auf andere Ergebnisse (Kurtal et al. 1995, Jorres et al. 1999). Das bessere Outcome ist hauptsächlich durch eine geringere Immunreaktion an einer biokompatiblen Membran bedingt. Dadurch kommt es zu keiner Immunsystemüberlastung des Patienten und somit treten Infektionen deutlich weniger auf. Wie Lesaffer ausführt sind synthetische Membranen lipophiler als z.B. Cellulose-Membranen; durch eine erhöhte Lipophilie steigt auch die Adsorption von Molekülen an der Membran, wodurch die Clearance von Urämietoxinen verbessert wird (Lesaffer et al. 2000). Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden in der vorliegenden Arbeit

Dialyseverfahren auf gleicher Materialgrundlage, also synthetische Polysulfon-LF-Membranen mit synthetischen Polysulfon-HF-Membranen, verglichen.

6.4 Vergleich von HF- und LF-Dialyse: klinisches Outcome

Da eine HF-Membran größere Poren als eine LF-Membran hat, liegt die Vermutung nahe, dass eine HF-Membran eine bessere Clearance für größere Moleküle aufweist und damit ein besseres klinisches Outcome des Patienten gewährleistet. Allerdings ist die Studienlage bezüglich Vorteile einer HF-Dialyse sehr inhomogen. Woods verglich LF- und HF-Membranen, beides Polysulfon-Membranen von Fresenius, bezüglich der Mortalität der Dialysepatienten (Woods und Nandakumar 2000). Diese Arbeitsgruppe stellte ein signifikant verbessertes Outcome der Patientengruppe, welche mit HF-Membranen dialysiert wurden, fest. Churchill berichtet, dass Patienten unter einer HF-Dialysetherapie eine verbesserte linksventrikuläre systolische Herzfunktion zeigen (Churchill et al. 1993). Andere Arbeitsgruppen wiederum fanden im klinischen Outcome (Mortalität, Zeit nötig für Funktionswiederherstellung der Niere, Oligurie unter Dialyse, Dauer Dialyse, Anzahl Dialysen) keinen Unterschied zwischen einer LF- und einer HF-Dialyse (Gastaldello et al. 2000, Ponikvar et al. 2001). Auch im Rahmen der HEMO-Studie wurde kein Unterschied bezüglich der Mortalität zwischen diesen beiden Dialysemethoden gefunden (Cheung et al. 2004).

Bei Locatelli war der EPO-Substitutionsbedarf unabhängig von der Dialysemethode (Locatelli et al. 2000). Dagegen stellte Ayli fest, dass der EPO-Bedarf bei HF-Dialysepatienten niedriger und die Hämoglobinkonzentration höher ist (Ayli et al. 2004).

Neben dem Vorteil eines höheren Stoffaustausches durch die größeren Poren, hat eine HF-Dialyse auch Nachteile. Es wurde von einem größeren Verlust von Vitaminen, Aminosäuren, Albumin und Glucose bei HF-Membranen berichtet (Ponikvar et al. 2001, Kasama et al. 1996, Ikizler et al. 1994, Gutierrez 1996), so dass die durch die Porenvergrößerung gewonnen Vorteile beim klinischen Outcome eventuell wieder aufgewogen werden.

Die in der vorliegenden Studie einbezogenen Patienten waren sowohl gut genährt als auch relativ jung, und gaben subjektives Wohlbefinden unabhängig von der Dialysemethode an. Es besteht durchaus die Möglichkeit, dass die untersuchten Serumproteinmuster bei kränkeren, multimorbideren, älteren oder unterernährten Patienten anders ausfallen könnten. Für eine

solche Vermutung findet man auch Hinweise in der Literatur. So konnte Ponikvar leichte aber keine signifikanten Unterschiede zwischen einer LF-Dialyse und einer HF-Dialyse bezüglich der Mortalität und der Zeit nötig für die Funktionswiederherstellung der Nieren feststellen. In einer Untergruppe mit geringerer Morbidität der Patienten wurde dies allerdings nicht beobachtet (Ponikvar et al. 2001). Locatelli fand im Gegensatz zu Ayli kein Unterschied zwischen einer LF-Dialyse und einer HF-Dialyse bei dem EPO-Substitutionsbedarf und der Hämoglobinkonzentration (s.o.), aber die untersuchten Patienten bei Locatelli waren gesünder als die bei Ayli (Locatelli et al. 2000, Ayli et al. 2004).

6.5 Vergleich von HF- und LF-Dialyse: Serumanalytik

Lippi und House konnten keinen Unterschied bezüglich der Homocystein-, Lipoprotein a-, Apolipoprotein A und B- Konzentration und des Lipidprofils in Abhängigkeit unterschiedlicher Membranen finden (House et al. 2000, Lippi et al. 2007). Diese Ergebnisse decken sich daher mit den unseren. Andere Arbeitsgruppen stellten eine Überlegenheit der HF-Dialyse bezüglich der Normalisierung von Lipoproteinprofilen (Josephson et al. 1992, Seres et al. 1993, Blankestijn 1994) fest.

Auch bei der Aminosäurenreduktion im Plasma (Gil et al. 2007) und der Harnstoffentfernung Kt/V urea (Ayli et al. 2004) konnte kein Unterschied zwischen einer LF- und HF-Dialyse beobachtet werden. Einige Arbeitsgruppen fanden auch im Proteinbereich für Albumin und CRP (Ayli et al. 2004, Lippi et al. 2007), für TGF- β 2 und Hämoglobin (Traut et al. 2007) und andere Proteine (Winchester et al. 2004, Lesaffer et al. 2000) keine Unterschiede zwischen den Dialysemethoden. Die regelmäßigen laborchemischen Kontrollen, der in der vorliegenden Studie einbezogener Patienten, ergaben keinen signifikanten Unterschied zwischen den CRP-Konzentrationen in Abhängigkeit von der Dialysemembran (siehe Tab. 22).

	Gruppe 1		Gruppe 2	
	LF	HF	LF	HF
CRP (mg/l)	9.1 \pm 11.8	7.6 \pm 11.4	4.4 \pm 2.6	4.6 \pm 2.2

Tab. 22: CRP-Konzentrationen in Abhängigkeit von der Dialyse; Daten zur Verfügung gestellt von Dr. Klemm KfH Jena

Allerdings wurde mehrfach bestätigt, dass die β 2-Mikroglobulin-Konzentration, ein potentes Stimulans von Amyloidablagerungen in den Gefäßen, bei der Dialyse mit einer HF-Membran niedriger ist (Ayli et al. 2004, Locatelli et al. 2000, Traut et al. 2007). Diesen Ergebnissen können wir uns, wie die in Tab. 23 aufgeführten β 2-Mikroglobulin-Konzentrationen zeigen, anschließen.

	Gruppe 1		Gruppe 2	
	LF	HF	LF	HF
β2-Mikroglobulin	26.6 \pm 8.4	18.4 \pm 5.2	30.6 \pm 9.3	22.6 \pm 4.8

Tab. 23: β 2-Mikroglobulin- Konzentrationen in Abhängigkeit von der Dialyse; Daten zur Verfügung gestellt von Dr. Klemm KfH Jena

Einige Arbeitsgruppen berichten von postdialytischen Reboundverhalten von Serumproteinkonzentrationen (House et al. 2000, Traut et al. 2007, Leyboldt et al. 1999). Ebenfalls sind akute Erhöhungen von Serumproteinkonzentrationen durch die Dialysebehandlung beschrieben. So findet man die Peakkonzentrationen akuter Entzündungsmarker wie Interleukin-1, Tumornekrosefaktor α und CRP etwa 6 Stunden postdialytisch (Ikizler et al. 2002). Da in den hier vorliegenden Analysen nur Serumproben einbezogen wurden, die prädialytisch, nach einer Therapiepause > 24h, abgenommen wurden, kann davon ausgegangen werden, dass die akuten Veränderungen einer Dialysebehandlung keine Rolle spielen. Es handelt sich bei den vorliegenden Ergebnissen um mittel- und langfristige Auswirkungen der zu vergleichenden Dialysemethoden.

Das Ansprechen eines Patienten auf die Dialysebehandlung ist individuell verschieden und die resultierenden Proteinveränderungen sind, wie sich anhand der 1D-Chromatogramme zeigte, uneinheitlich. Das Serumproteom weist bekanntermaßen eine hohe Komplexität auf und auch die Veränderungen in ESRD-Patienten sind ähnlich komplex und nicht auf einen bestimmten Proteinbereich zu beschränken (Langlois et al. 2004, Vanholder et al. 2003, Lesaffer et al. 2000). Die Erstellung von Protein-/Peptidmustern, mit Hilfe welcher man eine Vielzahl von Proteinen gleichzeitig vergleichen kann, schien zu Beginn der Arbeiten besonders geeignet für diese Fragestellung.

Auf Grund der oben beschriebenen großen cut-off-Unterschiede der Dialysemembranen erwarteten wir deutliche Unterschiede zwischen den prädialytischen Serumproteomen beider zu vergleichenden Dialysemethoden und wählten für die ersten Untersuchungen nur eine grobe Trennmethode. Dabei konnten überraschend, jedoch in Übereinstimmung mit oben

erwähnten Arbeitsgruppen (Lippi et al. 2007, Ayli et al. 2004, Winchester et al. 2004, Lesaffer et al. 2000), keinerlei signifikanten Unterschiede gefunden werden.

Bei der Auswertung individueller Serumprobenpaare, jeweils eine LF- und eine HF-Probe, konnte lediglich ein leichter Trend dahingehend beobachtet werden, dass es nach der LF-Dialysetherapie bei einigen Patienten zu einer Konzentrationserhöhung von Proteinen im Molekulargewichtsbereich der Immunglobuline, des Albuminhauptpeaks und im niedermolekularen Bereich (Immunglobuline: 60 % der Patienten, Albumin: 47 %, niedermolekularer Bereich: 47 %) im Vergleich zur Probe nach HF-Therapie kommt. Dies wurde später, nach den wesentlich aufwendigeren Untersuchungen nach 2D-Trennung bestätigt (für Albumin: Tab. 16 Fraktion 12_69 und Fraktion 16_72).

Die Erhöhung der Immunglobulinkonzentration spricht für ein höheres Ausmaß der chronischen Entzündung.

Über das Verhalten der Albuminkonzentration bei inflammatorischen Geschehen liegen in der Literatur kontroverse Angaben vor. Grundsätzlich wird die Albuminkonzentration im Serum durch Abbau-, Ausscheidungs-, und Syntheserate sowie durch Umverteilung beeinflusst. Albumin generell ist als negatives Akute-Phase-Protein bekannt und eine verringerte Konzentration resultiert hauptsächlich aus einer verringerten Syntheserate. Auch ist Albumin als Bestimmungsgröße bezüglich des inflammatorischen Geschehens in Dialysepatienten seit langem beschrieben (Kaysen et al. 1997). Eine Vielzahl von Arbeiten berichtet über Veränderungen der Albuminkonzentration bei Entzündungsvorgängen (Mansoor et al. 1997, Caglar et al. 2002, Schreiber et al. 1982, Moshage et al. 1987, Ruot et al. 2000). Caglar und Mitarbeiter, die in ihren Studien eine Erhöhung der Albuminkonzentration während Inflammation bei Dialysepatienten feststellten, beschreiben eine verstärkte Proteolyse, wie sie in diesem Patientenkontext zu finden ist, als einen potenten Stimulator der Albuminsynthese (Caglar et al. 2002). Des Weiteren ist die Albuminkonzentration als negativer Marker für die Mortalität und als positiver Marker für den Ernährungszustand bekannt. Gil beschreibt eine geringere Mortalität je höher die Albuminserumkonzentration ist (Gil et al. 2007). In der DOPPS-Studie (Hecking et al. 2004) wird ein besserer Ernährungszustand, also eine höhere Albuminserumkonzentration, mit einer geringeren Mortalität korreliert. Woods jedoch fand, dass das Serumalbumin keine Auswirkung auf die Mortalität hat, stellten aber in ihrer Studie, in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen (siehe Tab. 24), bei LF-Dialysepatienten eine höhere Albuminkonzentration fest (Woods und Nandakumar 2000). Die Interpretation einer

veränderten Albuminkonzentration bei Dialysepatienten bedarf also noch weiterer Untersuchungen.

	Gruppe 1		Gruppe 2	
	LF	HF	LF	HF
Serumalbumin (g/l)	40.4 ± 2.7	39.7 ± 2.0	43.8 ± 2.6	42,1 ± 2.2

Tab. 24: Albuminkonzentrationen in Abhängigkeit von der Dialyse; Daten zur Verfügung gestellt von Dr. Klemm KfH Jena

Des Weiteren konnten wir bei 40 % der Patienten eine Anreicherung von Proteinen im hochmolekularen Bereich, in dem üblicherweise Proteinkomplexe gefunden werden, nach der HF-Dialysetherapie beobachten.

Durch die Analyse tryptischer Peptide konnten für einige Fraktionen reproduzierbar charakteristische Peptide ermittelt werden, mit deren Hilfe Konzentrationsunterschiede von Proteinen bei den Dialysemethoden herausgestellt werden konnten. (siehe 5.1.3). Die mit Hilfe der normierten Peakhöhen quantifizierbaren Konzentrationsunterschiede dieser Peptide lieferten jedoch dafür keinen Hinweis auf eine reproduzierbare Abhängigkeit von der Dialysemethode. Ebenso konnten wir bei Peptidmassen, die in niedermolekularen Fraktionen gefunden wurden und welche ohne tryptischen Verdau massenspektrometrisch analysiert wurden, keine dialysemethodenabhängige Muster erkennen.

Es kann also zusammengefasst werden, dass im prädialytischen Serumproteom mit allen verwendeten Methoden (Absorbanzmessung nach 1D- und 2D-Trennung, Fluoreszenzmessung, Peptide-Mass-Fingerprint, Sequence-Tags und normierten Peakhöhen-summen) außer bei den Immunglobulinen und Haptoglobin (s.u.) keine weiteren reproduzierbare signifikante Unterschiede zwischen beiden Dialysemethoden gefunden wurden.

Die Konzentrationserhöhung von Immunglobulinen in den LF-Proben spricht für stärkere Entzündungsvorgänge während einer Dialysetherapie mit Low-Flux-Membranen. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den CRP-Konzentrationen, die während regelmäßigen laborchemischen Kontrollen festgestellt wurden (Tab. 24) und denen der Arbeitsgruppen, die keinen Unterschied bei dem Entzündungsparameter CRP gefunden haben (Ayli et al. 2004, Lippi et al. 2007).

Haptoglobin ist ein Akute-Phase-Protein, es wirkt bakteriostatisch und hat viele Funktionen bei zellulären Umbau- und Reparaturvorgängen in den verschiedenen Geweben. Es stimuliert

über die Inhibition von Gelatinasen die Zellmigration zum Ort der Schädigung. Des Weiteren ist es ein wichtiger Antioxidanz. Außerdem ist es ein wichtiger Marker für die Hämolyse und dient hauptsächlich als Bindungs- und Transportprotein für Hämoglobin. Haptoglobin besteht aus 2 verschiedenen dimorphen Polypeptidketten. Das Molekulargewicht beträgt je nach Polypeptidkettenart zwischen 86 kDa und > 200 kDa. Die Serumkonzentration von Haptoglobin ist bei Tumoren, Aneurysmen und bei Entzündungen erhöht (Burbea et al. 2004, Van Vlierberghes et al. 2004, de Kleijn et al. 2002).

Bei unseren Untersuchungen zeigten sich in beiden Gruppen erhöhte Haptoglobinkonzentrationen (s. Tab. 7; 2D-Trennung: c_{LF}/c_{HF} Gr1: Platte 16/17 Fraktion 72; c_{LF}/c_{HF} Gr2: Platte 13 Fraktion 74 und Platte 17 Fraktion 73; ~ MW von 316,58 - 249,58 kDa) bei den Low-Flux-Dialyseproben im Vergleich mit den High-Flux- oder Gesunde Probandenproben. Da in dem Molekulargewichtsbereich der untersuchten Fraktionen Haptoglobin-Hämoglobinkomplexe zu erwarten sind, kann dies sowohl Ausdruck einer Entzündungsreaktion als auch einer verstärkten Hämolyse sein.

6.6 Unerwartet wenig Proteom-Unterschiede zwischen HF- und LF-Therapie

Gründe dafür, dass wir nur wenige Veränderungen des Serumproteoms bei unterschiedlicher Dialysetherapie finden konnten, können vielfältig, sowohl ursächlicher als auch methodischer Art, sein.

Als erstes spielt die extreme Komplexität und die große dynamische Breite der Serumproteine eine entscheidende Rolle. Die zur Verfügung stehende zwei-dimensionale Fraktionierung hat ihre Validität anhand von zwei Modellerkrankungen bewiesen (Baum et al. 2008). Es kann jedoch sein, dass diese Methode für subtile und minimale Proteomveränderungen nicht ausreichend sensitiv ist. Die Anwendung einer dritten Trenndimension oder einer vollständig anderen Proteomanalysemethode ist für diese Fragestellung zu erproben, da die verschiedenen Verfahren bekanntermaßen immer nur einen Teil des Spektrums an Proteinen identifizieren (Anderson 2005).

Auf Grund der zwar plausiblen Auswahl von Fraktionen wurde dennoch nur eine Stichprobe von Fraktionen untersucht. Dadurch können Informationen entgangen sein. Das heißt, wir können nicht ausschließen, dass Proteinunterschiede entgangen sind, weil sie in Fraktionen auftraten, die im Sensitivitätsbereich der UV-Messung keine signifikanten Unterschiede erkennen ließen. Es müssten theoretisch Untersuchungen, die alle Fraktionen umfassen

angeschlossen werden, was aus Kapazitätsgründen mit der zur Verfügung stehenden Technik und im Zeitrahmen dieser Arbeit praktisch unmöglich ist.

Als weitere Fehlerquelle ist die Umstellungszeit der Dialysemethoden zu diskutieren. Ayli fand Unterschiede zwischen einer LF- und HF-Dialyse bei dem EPO-Substitutionsbedarf und der Hämoglobinkonzentration. Diese Unterschiede konnten aber erst nach einer Dialysezeit mit der jeweiligen Methode nach 3 Monaten festgestellt werden (Ayli et al. 2004). Die Methodenumstellungszeit in der vorliegenden Cross-over-Studie betrug 10 Wochen, so dass diese Zeit eventuell nicht ausreichte um methodenabhängige Unterschiede im Serumproteom manifest werden zu lassen.

Des Weiteren zeigte Lesaffer bei einer HF-Polysulfonmembran F60, dass die Membranpermeabilität innerhalb von 20 Minuten von ca. 66 kDa zu Beginn der Dialyse auf 30 kDa absinkt (Lesaffer et al. 2000). Dadurch ist der Membran-cut-off der HF-Membran dem der LF-Membran sehr ähnlich und porengrößebedingte Unterschiede sind schwer detektierbar bzw. nicht vorhanden. Inwiefern die von Lesaffer beschriebenen Membranveränderungen auch auf eine LF-Membran zutreffen, ist nach unserem Kenntnisstand in der Literatur nicht beschrieben.

7 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Anderson NL. 2005. The roles of multiple proteomic platforms in a pipeline for new diagnostics. *Mol Cell Proteomics*, 4 (10):1441-1444.
- Ayli D, Ayli M, Azak A, Yuksel C, Kosmaz GP, Atilgan G, Dede F, Abayli E, Camlibel M. 2004. The effect of high-flux hemodialysis on renal anemia. *J Nephrol*, 17 (5):701-706.
- Baum A, Pohl M, Kreusch S, Cumme GA, Ditze G, Misselwitz J, Kiehntopf M, Udby L, Meier-Hellmann A, Rhode H. 2008. Searching biomarker candidates in serum using multidimensional native chromatography-II method evaluation with Alport syndrome and severe inflammation. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*,
- Blankestijn PJ. 1994. Hemodialysis using high flux membranes improves lipid profiles. *Clin Nephrol*, 42 Suppl 1:S48-51.
- Bublitz R, Kreusch S, Ditze G, Schulze M, Cumme GA, Fischer C, Winter A, Hoppe H, Rhode H. 2006. Robust protein quantitation in chromatographic fractions using MALDI-MS of tryptic peptides. *Proteomics*, 6 (13):3909-3917.
- Burbea Z, Nakhoul F, Rosenberg S, Zoabi R, Skorecki K, Hochberg I, Miller-Lotan R, Benchetrit S, Weissgarten J, Knecht A, Tovbin D, Levy NS, Levy AP. 2004. Role of haptoglobin phenotype in end-stage kidney disease. *Nephron Exp Nephrol*, 97 (2):e71-76.
- Caglar K, Peng Y, Pupim LB, Flakoll PJ, Levenhagen D, Hakim RM, Ikizler TA. 2002. Inflammatory signals associated with hemodialysis. *Kidney Int*, 62 (4):1408-1416.
- Canaud B, Bragg-Gresham JL, Marshall MR, Desmeules S, Gillespie BW, Depner T, Klassen P, Port FK. 2006. Mortality risk for patients receiving hemodiafiltration versus hemodialysis: European results from the DOPPS. *Kidney Int*, 69 (11):2087-2093.
- Cheung AK, Sarnak MJ, Yan G, Dwyer JT, Heyka RJ, Rocco MV, Teehan BP, Levey AS. 2000. Atherosclerotic cardiovascular disease risks in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int*, 58 (1):353-362.
- Cheung AK, Sarnak MJ, Yan G, Berkoben M, Heyka R, Kaufman A, Lewis J, Rocco M, Toto R, Windus D, Ornt D, Levey AS. 2004. Cardiac diseases in maintenance hemodialysis patients: results of the HEMO Study. *Kidney Int*, 65 (6):2380-2389.
- Churchill DN, Taylor DW, Tomlinson CW, Becroft ML, Gorman J, Stanton E. 1993. Effect of high-flux hemodialysis on cardiac structure and function among patients with end-stage renal failure. *Nephron*, 65 (4):573-577.

- Cumme GA, Kreusch S, Nagel M, Rhode H. 2008. Multidimensional chromatography: validation and efficient fishing for biomarkers and fractions containing them using the VisualCockpit software package. *Proteomics*, 8 (1):37-41.
- de Kleijn DP, Smeets MB, Kemmeren PP, Lim SK, Van Middelaar BJ, Velema E, Schoneveld A, Pasterkamp G, Borst C. 2002. Acute-phase protein haptoglobin is a cell migration factor involved in arterial restructuring. *Faseb J*, 16 (9):1123-1125.
- Depner T, Daugirdas J, Greene T, Allon M, Beck G, Chumlea C, Delmez J, Gotch F, Kusek J, Levin N, Macon E, Milford E, Owen W, Star R, Toto R, Eknoyan G. 2004. Dialysis dose and the effect of gender and body size on outcome in the HEMO Study. *Kidney Int*, 65 (4):1386-1394.
- Frei U. 2005 / 2006. Nierenersatztherapie in Deutschland
- Frei U, Schober-Halstenberg H. 2006 / 2007. Nierenersatztherapie in Deutschland - Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2006I2007 QuaSi-Niere gGmbH.
- Galle J, Seibold S, Wanner C. 2003a. Inflammation in uremic patients: what is the link? *Kidney Blood Press Res*, 26 (2):65-75.
- Galle J, Quaschnig T, Seibold S, Wanner C. 2003b. Endothelial dysfunction and inflammation: what is the link? *Kidney Int Suppl*, (84):S45-49.
- Gastaldello K, Melot C, Kahn RJ, Vanherweghem JL, Vincent JL, Tielemans C. 2000. Comparison of cellulose diacetate and polysulfone membranes in the outcome of acute renal failure. A prospective randomized study. *Nephrol Dial Transplant*, 15 (2):224-230.
- Gil HW, Yang JO, Lee EY, Lee EM, Choi JS, Hong SY. 2007. The effect of dialysis membrane flux on amino acid loss in hemodialysis patients. *J Korean Med Sci*, 22 (4):598-603.
- Gutierrez A. 1996. Protein catabolism in maintenance haemodialysis: the influence of the dialysis membrane. *Nephrol Dial Transplant*, 11 Suppl 2:108-111.
- Hakim RM, Wingard RL, Parker RA. 1994. Effect of the dialysis membrane in the treatment of patients with acute renal failure. *N Engl J Med*, 331 (20):1338-1342.
- Hecking E, Bragg-Gresham JL, Rayner HC, Pisoni RL, Andreucci VE, Combe C, Greenwood R, McCullough K, Feldman HI, Young EW, Held PJ, Port FK. 2004. Haemodialysis prescription, adherence and nutritional indicators in five European countries: results from the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). *Nephrol Dial Transplant*, 19 (1):100-107.

- Himmelfarb J, Tolkoff Rubin N, Chandran P, Parker RA, Wingard RL, Hakim R. 1998. A multicenter comparison of dialysis membranes in the treatment of acute renal failure requiring dialysis. *J Am Soc Nephrol*, 9 (2):257-266.
- Hörl WH, Wanner C. 2004. *Dialyseverfahren in Klinik und Praxis -Technik und Klinik*. 6. vollständig überarbeitete Auflage. Georg Thieme Verlag.
- Horn A, Kreuzsch S, Bublitz R, Hoppe H, Cumme GA, Schulze M, Moore T, Ditzel G, Rhode H. 2006. Multidimensional proteomics of human serum using parallel chromatography of native constituents and microplate technology. *Proteomics*, 6 (2):559-570.
- House AA, Wells GA, Donnelly JG, Nadler SP, Hebert PC. 2000. Randomized trial of high-flux vs low-flux haemodialysis: effects on homocysteine and lipids. *Nephrol Dial Transplant*, 15 (7):1029-1034.
- Ikizler TA, Flakoll PJ, Parker RA, Hakim RM. 1994. Amino acid and albumin losses during hemodialysis. *Kidney Int*, 46 (3):830-837.
- Ikizler TA, Pupim LB, Brouillette JR, Levenhagen DK, Farmer K, Hakim RM, Flakoll PJ. 2002. Hemodialysis stimulates muscle and whole body protein loss and alters substrate oxidation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 282 (1):E107-116.
- Jorres A, Gahl GM, Dobis C, Polenakovic MH, Cakalaroski K, Rutkowski B, Kisielnicka E, Krieter DH, Rumpf KW, Guenther C, Gaus W, Hoegel J. 1999. Haemodialysis-membrane biocompatibility and mortality of patients with dialysis-dependent acute renal failure: a prospective randomised multicentre trial. International Multicentre Study Group. *Lancet*, 354 (9187):1337-1341.
- Josephson MA, Fellner SK, Dasgupta A. 1992. Improved lipid profiles in patients undergoing high-flux hemodialysis. *Am J Kidney Dis*, 20 (4):361-366.
- Kasama R, Koch T, Canals-Navas C, Pitone JM. 1996. Vitamin B6 and hemodialysis: the impact of high-flux/high-efficiency dialysis and review of the literature. *Am J Kidney Dis*, 27 (5):680-686.
- Kausz AT, Obrador GT, Arora P, Ruthazer R, Levey AS, Pereira BJ. 2000. Late initiation of dialysis among women and ethnic minorities in the United States. *J Am Soc Nephrol*, 11 (12):2351-2357.
- Kaysen GA, Stevenson FT, Depner TA. 1997. Determinants of albumin concentration in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis*, 29 (5):658-668.
- Kramar R, Oberbauer R. 2007. Jahresbericht 2007 - Österreichisches Dialyse- und Transplantationsregister Nierenersatztherapie in Österreich Österreichische Gesellschaft für Nephrologie in Zusammenarbeit mit Austrotransplant.

- Kreusch S, Schwedler S, Tautkus B, Cumme GA, Horn A. 2003. UV measurements in microplates suitable for high-throughput protein determination. *Anal Biochem*, 313 (2):208-215.
- Kurtal H, von Herrath D, Schaefer K. 1995. Is the choice of membrane important for patients with acute renal failure requiring hemodialysis? *Artif Organs*, 19 (5):391-394.
- Langlois RG, Trebes JE, Dalmaso EA, Ying Y, Davies RW, Curzi MP, Colston BW, Jr., Turteltaub KW, Perkins J, Chromy BA, Choi MW, Murphy GA, Fitch JP, McCutchen-Maloney SL. 2004. Serum protein profile alterations in hemodialysis patients. *Am J Nephrol*, 24 (2):268-274.
- Lesaffer G, De Smet R, Lameire N, Dhondt A, Duym P, Vanholder R. 2000. Intradialytic removal of protein-bound uraemic toxins: role of solute characteristics and of dialyser membrane. *Nephrol Dial Transplant*, 15 (1):50-57.
- Leygoldt JK, Cheung AK, Deeter RB. 1999. Rebound kinetics of beta2-microglobulin after hemodialysis. *Kidney Int*, 56 (4):1571-1577.
- Lippi G, Tessitore N, Salvagno GL, Bedogna V, Bassi A, Montagnana M, Lupo A, Guidi GC. 2007. Influence of haemodialysis on high-sensitivity C-reactive protein, lipoprotein(a), apolipoproteins A and B. *Clin Biochem*, 40 (16-17):1336-1338.
- Locatelli F. 2003. Dose of dialysis, convection and haemodialysis patients outcome--what the HEMO study doesn't tell us: the European viewpoint. *Nephrol Dial Transplant*, 18 (6):1061-1065.
- Locatelli F, Andrulli S, Pecchini F, Pedrini L, Agliata S, Lucchi L, Farina M, La Milia V, Grassi C, Borghi M, Redaelli B, Conte F, Ratto G, Cabiddu G, Grossi C, Modenese R. 2000. Effect of high-flux dialysis on the anaemia of haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*, 15 (9):1399-1409.
- Mansoor O, Cayol M, Gachon P, Boirie Y, Schoeffler P, Obled C, Beaufrere B. 1997. Albumin and fibrinogen syntheses increase while muscle protein synthesis decreases in head-injured patients. *Am J Physiol*, 273 (5 Pt 1):E898-902.
- Moshage HJ, Janssen JA, Franssen JH, Hafkenscheid JC, Yap SH. 1987. Study of the molecular mechanism of decreased liver synthesis of albumin in inflammation. *J Clin Invest*, 79 (6):1635-1641.
- Niwa T. 1997. Mass spectrometry in the search for uremic toxins. *Mass Spectrom Rev*, 16 (6):307-332.

- Ponikvar JB, Rus RR, Kenda RB, Bren AF, Ponikvar RR. 2001. Low-flux versus high-flux synthetic dialysis membrane in acute renal failure: prospective randomized study. *Artif Organs*, 25 (12):946-950.
- Ruot B, Breuille D, Rambourdin F, Bayle G, Capitan P, Obled C. 2000. Synthesis rate of plasma albumin is a good indicator of liver albumin synthesis in sepsis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 279 (2):E244-251.
- Schiffl H, Lang SM, Haider M. 1998. Bioincompatibility of dialyzer membranes may have a negative impact on outcome of acute renal failure, independent of the dose of dialysis delivered: a retrospective multicenter analysis. *Asaio J*, 44 (5):M418-422.
- Schiffl H, Lang SM, Konig A, Strasser T, Haider MC, Held E. 1994. Biocompatible membranes in acute renal failure: prospective case-controlled study. *Lancet*, 344 (8922):570-572.
- Schreiber G, Howlett G, Nagashima M, Millership A, Martin H, Urban J, Kotler L. 1982. The acute phase response of plasma protein synthesis during experimental inflammation. *J Biol Chem*, 257 (17):10271-10277.
- Seres DS, Strain GW, Hashim SA, Goldberg IJ, Levin NW. 1993. Improvement of plasma lipoprotein profiles during high-flux dialysis. *J Am Soc Nephrol*, 3 (7):1409-1415.
- Traut M, Haufe CC, Eismann U, Deppisch RM, Stein G, Wolf G. 2007. Increased binding of beta-2-microglobulin to blood cells in dialysis patients treated with high-flux dialyzers compared with low-flux membranes contributed to reduced beta-2-microglobulin concentrations. Results of a cross-over study. *Blood Purif*, 25 (5-6):432-440.
- Van Vlierberghe H, Langlois M, Delanghe J. 2004. Haptoglobin polymorphisms and iron homeostasis in health and in disease. *Clin Chim Acta*, 345 (1-2):35-42.
- Vanholder R, De Smet R, Glorieux G, Argiles A, Baurmeister U, Brunet P, Clark W, Cohen G, De Deyn PP, Deppisch R, Descamps-Latscha B, Henle T, Jorres A, Lemke HD, Massy ZA, Passlick-Deetjen J, Rodriguez M, Stegmayr B, Stenvinkel P, Tetta C, Wanner C, Zidek W. 2003. Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int*, 63 (5):1934-1943.
- Winchester JF, Silberzweig J, Ronco C, Kuntsevich V, Levine D, Parker T, Kellum JA, Salsberg JA, Quartararo P, Levin NW. 2004. Sorbents in acute renal failure and end-stage renal disease: middle molecule and cytokine removal. *Blood Purif*, 22 (1):73-77.
- Woods HF, Nandakumar M. 2000. Improved outcome for haemodialysis patients treated with high-flux membranes. *Nephrol Dial Transplant*, 15 Suppl 1:36-42.

Yavuz A, Tetta C, Ersoy FF, D'Intini V, Ratanarat R, De Cal M, Bonello M, Bordoni V, Salvatori G, Andrikos E, Yakupoglu G, Levin NW, Ronco C. 2005. Uremic toxins: a new focus on an old subject. *Semin Dial*, 18 (3):203-211.

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: Frau Dr. habil. Rhode, Herr Dr. Kreusch, Frau Colditz, Frau Endmann, Herr Rieger, Herr Dr. Klemm,

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 vorgelegten 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 Verfasser

Danksagung

Ich möchte mich bei den Mitarbeitern des Instituts für Biochemie I der medizinischen Fakultät der FSU Jena, sowie allen Personen, die mich bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit unterstützt haben, herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt der AJZ-Engineering GmbH und dem Förderverein des Klinikums der Friedrich-Schiller-Universität e.V., die mir durch die Verleihung eines Stipendiums für ein Jahr, die praktische Forschungsarbeit im Labor ermöglichten.

Lebenslauf

Name: Hallbauer, Julia

Geburtsdatum: 21.02.1983

Geburtsort: Leipzig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

1989 - 1993 Staatliche Grundschule Teichwolframsdorf

1993 - 1999 Pestalozzi Gymnasium Greiz

1999 - 2000 Austauschschülerin an der Picher-Cardin Highschool in Picher, Oklahoma USA

2000 - 2002 Hochschulreife am Pestalozzi Gymnasium Greiz

ab 01.09.2002 Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Oktober 2005 -
September 2006 Forschungsarbeiten am Institut für Biochemie 1 der Friedrich-Schiller-Universität Jena im Rahmen eines Promotionsstipendiums des Fördervereins des Klinikums der Friedrich-Schiller-Universität Jena

ab 01.09.2006 Fortsetzung des Studiums der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena