Greifswald, 12. August 2008

Aus dem Institut für Pathophysiologie (Univ.- Prof. Dr. Heinrich Brinkmeier)
der Medizinischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Proteine im Liquor cerebrospinalis von Patienten mit entzündlichen Erkrankungen des Nervensystems

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften in der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald 2008

vorgelegt von — Ann-Kathrin Knöfel — geboren am 29.09.1979 — in Malchin

Dekan der Medizinischen Fakultät: Prof. Dr. rer. nat. Hayo K. Kroemer

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Brinkmeier

2. Gutachter: Prof. Dr. Th. C. Mettenleiter

3. Gutachter: Prof. Dr. H. Tumani

Tag der Disputation: 5.3.2009

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 15

1.1. Liquor cerebrospinalis 16
1.2. Proteine des Liquor cerebrospinalis 21
1.3. Multiple Sklerose 23
1.4. Das Guillain-Barré-Syndrom 26
1.5. Ziel der Arbeit 29

2. Material und Methoden 29

2.1. Materialien 31
2.1.1. Geräte/Hilfsmittel 31
2.1.2. Verwendete Chemikalien 32
2.1.3. Antikörper 33
2.1.1. Verwendete Peptidsequenzen zur Generierung des QC-Antikörpers 33
2.2. Proteinanalytik 34
2.2.1. Konzentrationsbestimmung für Protein (BCA) 34
2.2.2. Zweidimensionale Proteingelelektrophorese 34
2.2.3. Isoelektrische Fokussierung 35
2.2.4. Polyacrylamid-Gelelektrophorese 36
2.2.5. Silberfärbung 37
2.2.6. Auswertung der Spots 38
2.2.7. Analyse der relevanten Proteinspots 38
2.2.8. Massenspektrometrie 39
2.2.9. Western Blot nach 1-D Gelelektrophorese von CSF-Proteinen 40
2.2.10. Fluorimetrischer Assay zum Nachweis des Enzyms Glutaminylcyklase 42
2.3. Liquor- und Serumproben von Patienten 43
2.3.1. MS-Patienten 43
2.3.2. GBS-Patienten 44

3. Ergebnisse 45

3.1. Etablierung der 2D-Elektrophorese von Liquor-Proteinen 46
3.2. Etablierung der Färbung der Proteinspots 50
3.3. Auswertung mit Delta2D-Software 51
3.4. Das Proteinmuster im Liquor cerebrospinalis von MS-Patienten 52
3.4.1. Verstärkt auftretende Proteine im MS-CSF 52
3.4.2. Proteine mit verminderter Konzentration im MS-Liquor 57
3.5. Das Proteinmuster im Liquor cerebrospinalis von GBS-Patienten .. 61
3.5.1. Verstärkt auftretende Proteine im GBS-CSF 61
3.5.2. Vermindert auftretende Proteine im GBS-CSF 64
3.5.3. Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten bei den Änderungen im Proteinmuster des CSF zwischen MS und GBS 67
3.6. Western Blot von CSF-Proteinen 69
3.7. Fluorimetrischer Nachweis des Enzyms Glutaminylcyklase 73
3.8. Nachweis der Glutaminylcyklase mittels Western Blot 76

4. Diskussion 79

5. Literatur 88

Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
BNI	Benzylimidazol
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
GBS	Guillian-Barré-Syndrom
IEF	isoelektrische Fokussierung
MS	Multiple Sklerose
QC	Glutaminylcyklase
QYNAD	Glutamin-Tyrosin-Asparangin-Alanin-Aspartat
kDa	Kilo Dalton
ZNS	Zentralnervensystem
MW	Molekulargewicht
SDS	Sodiumdodecylsulfat
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight
MRT	Magnetresonanztomografie

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1a-c
Sauerstoffaustausch zwischen CSF und Extrazellularraum [AA = Aminosäuren; Gluc = Glukose; Quelle: Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen; Thews et al; 2007]..... 17

Abbildung 2
Innere & äußere Liquorräume [modifizierte Darstellung, Quelle: Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen; Thews et al; 2007] 18

Abbildung 3
Quotientendiagramm von Reiber [Quelle: http//www.Laborlexikon.de; Internet]..... 20

Abbildung 4
Schematische Illustration von potentiellen Faktoren bei der Multiplen Sklerose (Ag = Antigen; APC = Antigen-präsentierende Zelle; B = B-Zellen; B1 = B-Zelle, fetaler Typ; B2 = B-Zelle, adulter Typ; Fas = CD95 Molekül; FasL = Fas-Ligand; IFN_{γ} = Interferon-Gamma; IL = Interleukin; LPS = Lipopolysaccharid; MO = Monocyten/ Makrophagen; N = Neuronen; OD = Oligodendrocyten; T = T-Zellen; Tc = cytotoxische T-Zellen; Th = T-Helferzellen; TNF_{α} = Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha) [Quelle: MS & CSF; UK Zettl & H Tumani]..... 24

Abbildung 5
Schematische Illustration der Grundprinzipien der zellulären und humoralen Immunantwort. a) Autoreaktive T-Zellen (T) erkennen ein spezifisches Autoantigen, welches von der MHC-Klasse II präsentiert wird und gleichzeitig erkennen sie auch co-stimulierende Oberflächenantigene auf Makrophagen (MΦ). b) Aktivierte T-Zellen (T) wandern durch die Blut-HirnSchranke (BNB) mit der Aufgabe das periphere Nervensystem (PNS) anzugreifen, dieser Prozess wird durch Chemokine, zelluläre Adhäsionsmoleküle und Matrix-Metalloproteinasen vermittelt. c) Im PNS erhöhen die durch T-Zellen aktivierten Makrophagen, die phagozytotische Aktivität und die Abgabe von toxischen Mediatoren (z.B. Stickstoffmonoxyd (NO), Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)). Es werden auch proinflamatorische Cytokine wie TNFα oder IFNγ freigesetzt. Autoantikörper (Abs), welche die BNB durchqueren, oder lokal von den B-Lymphozyten (B) produziert werden, fördern den Prozess der Demyelinisierung und des Abbaus des Myelins. Abs können die Demyelinisierung vermitteln, sie können relevante Epitope für Reizleitung an den Nervenfasern blockieren und können das Komplement System C (C´) aktivieren. [Quelle: Hartung et al., 2002]..... 27

Abbildung 6
Silber gefärbtes 12,5%iges Polyacrylamidgel mit fraktioniertem Liquor (> 3 k Da) über den pH-Bereich von 3 – 10 nl (nicht-linear) 47

Abbildung 7
Silber gefärbtes 12,5 %iges Polyacrylamidgel mit fraktioniertem Liquor (> 3 k Da) und einer Fällung mit 2-Volumen TCA über den pH-Bereich von 3 – 10 nl (nicht-linear)..... 48

Abbildung 8
2D-Elektrophrese von Liquorproteinen; (A) Kontrollliquor, (B) MS-Liquor; pH-Bereich 3 – 10 nl und Molekulargewicht 15 – 180 kDa..... 52

Abbildung 9
2D-Fusionsgel aus elf Einzelgelen von Kontroll- (blau) und neun Einzelgelen von MS-Liquor (rot). Hervorgehoben und nummeriert wurden die verstärkt bei MS auftretenden Proteinspots..... 53

Abbildung 10
Quantitative Analyse der bei MS verstärkt auftretenden Proteinspots. Angegeben wird der Mittelwert des relativen Spotvolumens mit der dazugehörigen Standardabweichung aus den elf unabhängigen Einzelgelen der Kontrolle und den neun unabhängigen Einzelgelen der MS. Die ausgefüllten Balken zeigen den Mittelwert des relativen Spotvolumens mit der Standardabweichung der Spots von MS-CSF. Die schraffierten Balken stellen das relative Spotvolumen mit der Standardabweichung der Kontrollen dar..... 54

Abbildung 11
2D-Fusionsgel aus elf Einzelgellen von Kontroll- (blau) und neun Einzelgelen von MS-Liquors (rot). Hervorgehoben und nummeriert wurden die vermindert bei der MS auftretenden Proteinspots..... 57

Abbildung 12
Quantitative Analyse der bei MS vermindert auftretenden Proteinspots. Angegeben wird der Mittelwert des relativen Spotvolumens mit der dazugehörigen Standardabweichung aus den elf unabhängigen Einzelgelen der Kontrolle und den neun unabhängigen Einzelgelen der MS. Die ausgefüllten Balken zeigen den Mittelwert des relativen Spotvolumens mit der Standardabweichung der Spots von MS-CSF, die schraffierten Balken stellen das relative Spotvolumen mit der Standardabweichung der Kontrollen dar..... 58

Abbildung 13
2D-Elektrophrese von Liquorproteinen; (A) Kontrollliquor, (B) GBS-Liquor; pH-Bereich 3 – 10 nl und Molekulargewicht 15 – 180 kDa..... 61

Abbildung 14
2D-Fusionsgel aus neun Einzelgelen von Kontroll- (rot) und 12 Einzelgelen von GBS-Liquores (blau). Hervorgehoben und nummeriert wurden die verstärkt bei GBS auftretenden Proteinspots. 62

Abbildung 15
Quantitative Analyse der beim GBS verstärkt auftretenden Spots. Angegeben wird der Mittelwert des relativen Spotvolumens mit der dazugehörigen Standardabweichung aus den unabhängigen Einzelgelen. 63

Abbildung 16
2D-Fusionsgel aus neun Einzelgelen von Kontroll- (rot) und zwölf Einzelgelen von GBS-Liquors (blau). Hervorgehoben und nummeriert wurden die vermindert bei GBS auftretenden Proteinspots. 64

Abbildung 17
Quantitative Analyse der im GBS-CSF vermindert auftretenden Spots. Angegeben wird der Mittelwert des relativen Spotvolumens mit der dazugehörigen Standardabweichung aus den unabhängigen Einzelgelen 65

Abbildung 18
Western Blot zur Detektion von Cystatin C nach 1D-Gelelektrophorese von CSF-Proteinen der folgenden neurologischen Erkrankungen: MS, KO, Virusmeningitis und Neuroborreliose. A 1D-Gel mit der Bande des polyklonalen Antikörpers Cystatin C; B: 1D-Gel mit Actin als Kontrolle... 69

Abbildung 19
Quantitative Auswertung der Cystatin C 1D-Western Blots von jeweils drei vereinigten Liquorproben unterschiedlicher neurologischer Erkrankungen. (MOD = mittlere optische Dichte) 70

Abbildung 21
Quantitative Auswertung der Antithrombin III 1D-Western Blots von jeweils drei vereinigten Liquorproben unterschiedlicher neurologischer Erkrankungen. (MOD = mittlere optische Dichte) 71

Abbildung 20
WesternWestern Blot zur Detektion von Antithrombin III nach 1D-Gelelektrophorese von CSF-Proteinen der folgenden neurologischen Erkrankungen: MS, KO, Virusmeningitis und Neuroborreliose. A 1D-Gel mit der Bande des Antikörpers Antithrombin III bei den vier neurologischen Erkrankungen; B 1D-Gel mit Actin als Kontrolle 71

Abbildung 22
Quantitative Auswertung der Transthyretin 1D-Western Blots von jeweils drei vereinigten Liquorproben unterschiedlicher neurologischer Erkrankungen. (MOD = mittlere optische Dichte) 72

Abbildung 23
Fluorimetrische Messung der Aktivität der Glutaminylcyclase im Liquor. Aufgetragen ist die Zunahme der Fluoreszenz durch Freisetzung des AMC mit dem dazugehörigen Standardfehler über die Zeit. Die Messung erfolgte bei 30 °C über einen Zeitraum von 4 h. (rfu = relative fluorescence unit; AP = Pyroglutamat- Aminopeptidase; BNI = Benzylimidazol) 74

Abbildung 24
Fluorimetrische Messung der Aktivität der Glutaminylcyclase im Liquor cerebrospinalis. Aufgetragen wurde die Differenz aus End- und Anfangsfluoreszenz (siehe Abb. 23) mit dem dazugehörigen Standardfehler. (rfu = real fluorescence unit; AP = Pyroglutamat-Aminopeptidase; BNI = Benzylimidazol)..... 75

Abbildung 25
Nachweis der Glutaminylcylase in CSF- und Serumproben mittels Western Blot. A: Western Blot mit dem QC-Antikörper der Firma UNICUS sowie mit dem durch Peptide geblocktem QC-Antikörper, B: Western Blot mit dem QC-Antikörper der Firma. Probiodrug. Aufgetragen wurden jeweils 30 µg Protein pro Spur. 77

Abbildung 26
Quantitative Auswertung des QC-Western Blot mit Liquor von verschiedenen neurologischen Erkrankungen. Auswertung von jeweils drei gepoolten Liquors (MOD = Mittlere optische Dichte) 78

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1
Theoretische Auswertung der bei MS verstärkt auftretenden Proteinspots. Aufgelistet sind Spotnummer, theoretischer Name, pH-Wert und Molekulargewicht (MW). Des Weiteren ist der Expressionsunterschied zur Kontrolle gezeigt..... 55

Tabelle 2
Massenspektrometrische Analyse der bei MS verstärkt auftretenden Proteinspots. Aufgelistet sind Spotnummer, Name (laut Expasy) und pH-Wert und MW-Wert laut des genutzten Fusionsgels 56

Tabelle 3
Theoretische Auswertung der bei MS vermindert auftretenden Proteinspots. Aufgelistet sind Spotnummer, theoretischer Name, pH-Wert und MW. Des Weiteren ist der Expressionsunterschied zur Kontrolle gezeigt..... 59

Tabelle 4
Massenspektrometische Analyse der bei MS vermindert auftretenden Proteinspots. Aufgelistet sind Spotnummer, Name (laut Expasy) und pH-Wert und MW-Wert laut des genutzten Fusionsgels..... 60

Tabelle 5
Theoretische Auswertung der bei GBS verstärkt auftretenden Proteinspots. Aufgelistet sind Spotnummer, theoretischer Name, pH-Wert und MW. Des Weiteren ist der Unterschied zur Kontrolle gezeigt. 63

Tabelle 6
Massenspektrometrische Analyse der bei GBS verstärkt auftretenden Proteinspots. Aufgelistet sind Spotnummer, Name (laut Expasy) und pH-Wert und MW-Wert laut den verwendeten Fusionsgelen..... 64

Tabelle 7
Theoretische Auswertung der bei GBS vermindert auftretenden Proteinspots. Aufgelistet sind Spotnummer, theoretischer Name, pH-Wert und MW. Des Weiteren ist der Unterschied zur Kontrolle gezeigt 66

Tabelle 8
Massenspektrometrische Auswertung der bei GBS vermindert auftretenden Proteinspots; Aufgelistet sind Spotnummer, theoretischer Name, pH-Wert und MW laut Espasy-Datenbank. 66

1. Einleitung

1.1. Liquor cerebrospinalis

Der französische Physiologe Francois Magendie, der im 19. Jahrhundert auf den Gebieten der Pharmakologie, Physiologie und Pathologie wirkte, gilt heute als der Entdecker des Liquors und seiner Kommunikationswege. Er beschrieb die Hauptfunktion des Liquors als Schutz des Gehirns und seiner Transportfunktionalität. Die Schutzfunktion wird durch die schwimmende Lagerung des Gehirns im Liquor erreicht. Liquor cerebrospinalis (CSF) ist eine Körperflüssigkeit, die mit der interstitiellen Flüssigkeit des Gehirns in Verbindung steht und durch sein farbloses und klares Aussehen normalem Wasser sehr ähnlich sieht. Der Liquor zirkuliert in sogenannten Liquorräumen und wird in den Pacchioni-Granulationen wieder resorbiert. So erfolgt im Verlauf von etwa sieben Stunden eine Liquorerneuerung (Thews et. al.; 2007). Der Liquor ist sehr proteinarm (Sayk; 1960). Der Eiweißgehalt des Liquors liegt bei etwa 0,15 – 0,45 g/l, während der Glukosegehalt zwischen 50 – 70% des jeweiligen Blutglukose-Wertes variiert. Der Liquor enthält eine sehr geringe Anzahl von Zellen, meist sind es Lymphozyten und Monozyten etwa im Verhältnis 70/30 (Sayk; 1962).

Gebildet wird der Liquor in den Plexus chorioidei, wobei die Ependymzellen eine große Rolle spielen. Im ersten Schritt findet über fenestrierte Kapillaren eine Ultrafiltration von Plasma in die extrazelluläre Flüssigkeit auf der basolateralen Seite der Ependymzelle statt (Abb. 1a). Im zweiten Schritt sezerniert die Ependymzelle auf der apikalen Seite Ionen in den Ventrikel, denen Wasser folgt. Hierbei ist der Nettotransport von Na^+ quantitativ am wichtigsten (Zettl und Tumani, 2005; Thews et. al., 2007). Seine endgültige Zusammensetzung erfährt der Liquor durch den Stoffaustausch mit dem Ventrikelependym und den Hirnhäuten. Hierbei werden Natrium-, Kalium-, Kalzium- und Magnesiumionen sowie Proteine und Aminosäuren in den Liquor transportiert (Tumani et. al., 2005; Abb. 1b, c).

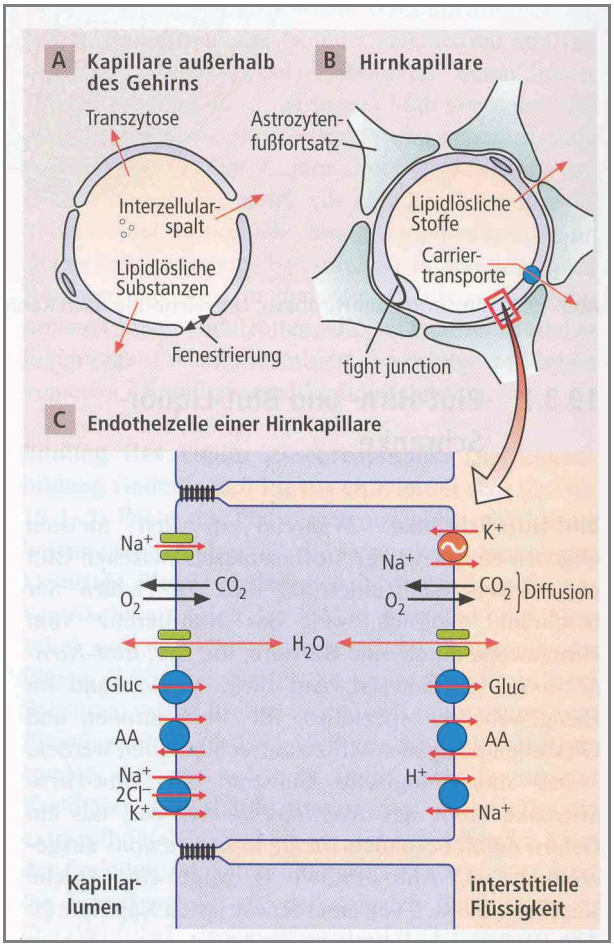

Abbildung 1a-c Sauerstoffaustausch zwischen CSF und Extrazellularraum [AA=Aminosäuren; Gluc = Glukose; Quelle: Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen; Thews et al; 2007]

Im Liquor sind die Konzentrationen dieser Stoffe immer geringer im Vergleich zum Plasma. Eine Verteilung der Stoffe findet im Wesentlichen durch Diffusion statt und kann durch die Pulsation des Plexus beschleunigt werden. Wasser strömt mit der Diffusion in das Hirngewebe und wird bei Überdruck aktiv in das venöse Blut abgegeben. Die Pulsation kann durch die Pacchionischen Granulationen gesteuert werden. Diese Granulationen besitzen ein Ventilsystem, welches sich bei Überdruck öffnet und bei Unterdruck des Liquors gegenüber dem Venendruck wieder schließt.

Der Transport durch den Plexus in den Liquor ist teilweise auch ein aktiver Transportmechanismus. Ausgetauscht werden hierbei Präalbumin (14-fach höher im Blut), Albumin (240-fach höher im Blut) oder IgA (1350-fach höher im Blut) (Boron et al., 2005).

Ein weiterer Transportmechanismus im Gewebe ist die Pinozytose. Es handelt sich hierbei um eine Stoffaufnahme, bei der sich die Membran um den aufzunehmenden Stoff

schließt und dieser dann, mit Hilfe der so entstandenen Vesikel, in die Zelle aufgenommen werden kann. Die Aufnahme wird durch die sogenannte Blut-Hirn-Schranke geregelt. Die Blut-Hirn-Schranke ist für Gase, Wasser und niedermolekulare lipidlösliche Stoffe weitestgehend durchlässig, dagegen für Ionen, hydrophile und hochmolekulare Stoffe eine unüberwindliche Barriere. Somit erfüllt sie gleichzeitig eine Sperr- und Transportfunktion für das ZNS.

Das Liquorsystem setzt sich aus miteinander verbundenen inneren und äußeren Liquorräumen zusammen. Aus dem Lumen des Neuralrohrs, welches sich in der Embryonalentwicklung bildet, entwickeln sich die inneren Liquorräume. Hintereinander geschaltet bilden sie ein Liquor- und Transportsystem aus insgesamt vier Ventrikeln, d.h. zwei Seitenventrikeln sowie dem dritten und vierten Ventrikel. Die Seitenventrikel werden in Vorderhorn, Vorderhornhauptteil, Cella media, Hinterhorn und Schläfenhorn unterteilt. Wenn das Vorderhorn ventrikulär erweitert ist, bezeichnet man es auch als den fünften Ventrikel. Die zwei Seitenventrikel stehen durch das „Foramen interventriculare“ mit dem dritten Ventrikel in Verbindung. Der vierte Ventrikel weißt durch das „Foramen MAGENDI“ und die beiden seitlichen „Foramina LUSCHKAE“ drei Verbindungen zu den äußeren Liquorräumen auf (Abb. 2, Firbas, 1995).

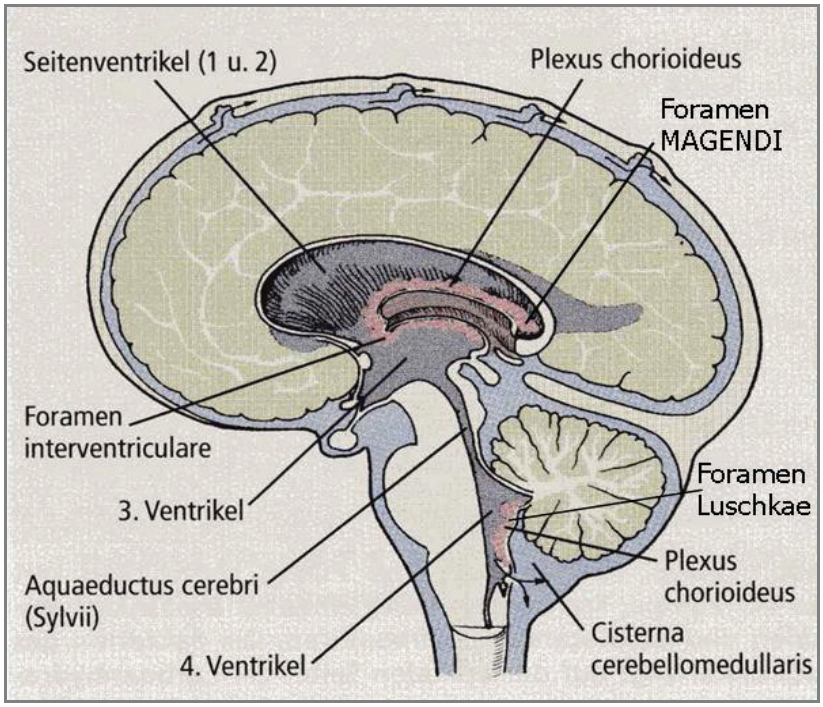

Abbildung 2 Innere und äußere Liquorräume [modifizierte Darstellung, Quelle: Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen; Thews et al; 2007]

Die Innenfläche des Ventrikelsystems trägt eine Ependymauskleidung mit einem Ziliensaum. Aus mesenchymalem Gewebe haben sich die äußeren Liquorräume entwickelt. Sie bestehen aus einer harten Hirnhaut (Pachymeninx), die gleichzeitig das Periost (Knochenhaut) des Schädelknochens darstellt. Die weiche Hirnhaut (Leptomeninx) besteht aus der Arachnoidea und der Pia mater. Die innere Membran ist untrennbar mit der Pia mater verwachsen. Zwischen diesen beiden Membranen liegt ein Maschenwerk feinster Bindegewebsfasern (Spatium leptomeningicum; Subarachnoidalraum), durch welchen der Liquor cerebrospinalis fließt (Schmidt; 1968).

Bei manchen Patienten mit neurologischen Erkrankungen ist der Eiweiß- und Glukosegehalt des Liquors stark erhöht. Dieses geht nicht einher mit einer Erhöhung der Zellzahl. Bei einer variablen Konzentration der genannten, typischen Stoffe im Liquor oder einer Anhäufung von atypischen Substanzen kann man von einer Störung der Blut-Hirn-Schranke ausgehen. In den Liquor können unter bestimmten Bedingungen auch andere Stoffe gelangen. Von Brinkmeier et al. (2000) konnte ein Pentapeptid (QYNAD) im Liquor identifiziert werden, welches ausschließlich bei entzündlichen, demyelinisierenden Erkrankungen vorzukommen scheint. QYNAD konnte im Liquor und Serum von Patienten mit Multipler Sklerose (MS) und Guillain-Barré-Syndrom (GBS) nachgewiesen werden, nicht aber im Liquor von Patienten mit Epilepsie, Alzheimer, Parkinson und gesunden Probanden. Dieses Pentapeptid fungiert unter bestimmten Bedingungen als Na^+-Kanalblocker, indem es die „steady-state“ Inaktivierungskurve der Na^+-Kanäle zu negativeren Potentialen verschiebt (Brinkmeier et al., 2000). Es konnte aber wegen seiner geringen Masse (MW = 609,2 Da) noch keinem bekannten menschlichen Protein zugeordnet werden. Wahrscheinlich wird das Peptid intrathekal gebildet bzw. freigesetzt, eventuell durch Abspaltung aus einem Vorläuferprotein.

Sowohl bei MS als auch bei GBS beruht die Diagnose und Verlaufskontrolle unter anderem auf einer Liquor- und Serumdiagnostik, da für Entzündungsreaktionen, Demyelinisierung und Neurodegeneration eine Reihe diagnostischer Marker existieren. Erhöhte Spiegel von Zytokinen in Serum und CSF gelten als Indikatoren für Entzündungsvorgänge (Kastenbauer et al., 2003), die erhöhte Aktivität zirkulierender Proteasen wird in Zusammenhang mit Myelin-Abbau und der Einwanderung von Leukozyten in das Nervengewebe gesehen (Sharshar et al., 2002). Myelin-Proteine im Liquor cere-brospinalis und Serum-Antikörper gegen solche Proteine (Berger et al., 2003) können als Indikatoren von Demyelinisierungsereignissen gelten. Das Bemessen der jeweiligen Konzentrationen des Albumins oder IgGs wird mit Hilfe des Quotientendiagramms nach Reiber durchgeführt (Reiber, 1993). Dieses dient unter anderem der Analyse der

Immunglobulinverteilung im Rahmen der Diagnostik neurologischer Erkrankungen. Hierbei werden jeweils Quotienten aus den Konzentrationen des Albumins und der Immunglobuline im Serum und Liquor gebildet und graphisch gegeneinander aufgetragen. Daraus ist ablesbar, ob bestimmte Immunglobuline im Plasma oder intrathekal produziert werden. Diese Information ist hilfreich bei der Diagnose von Erkrankungen des ZNS (Abb. 3).

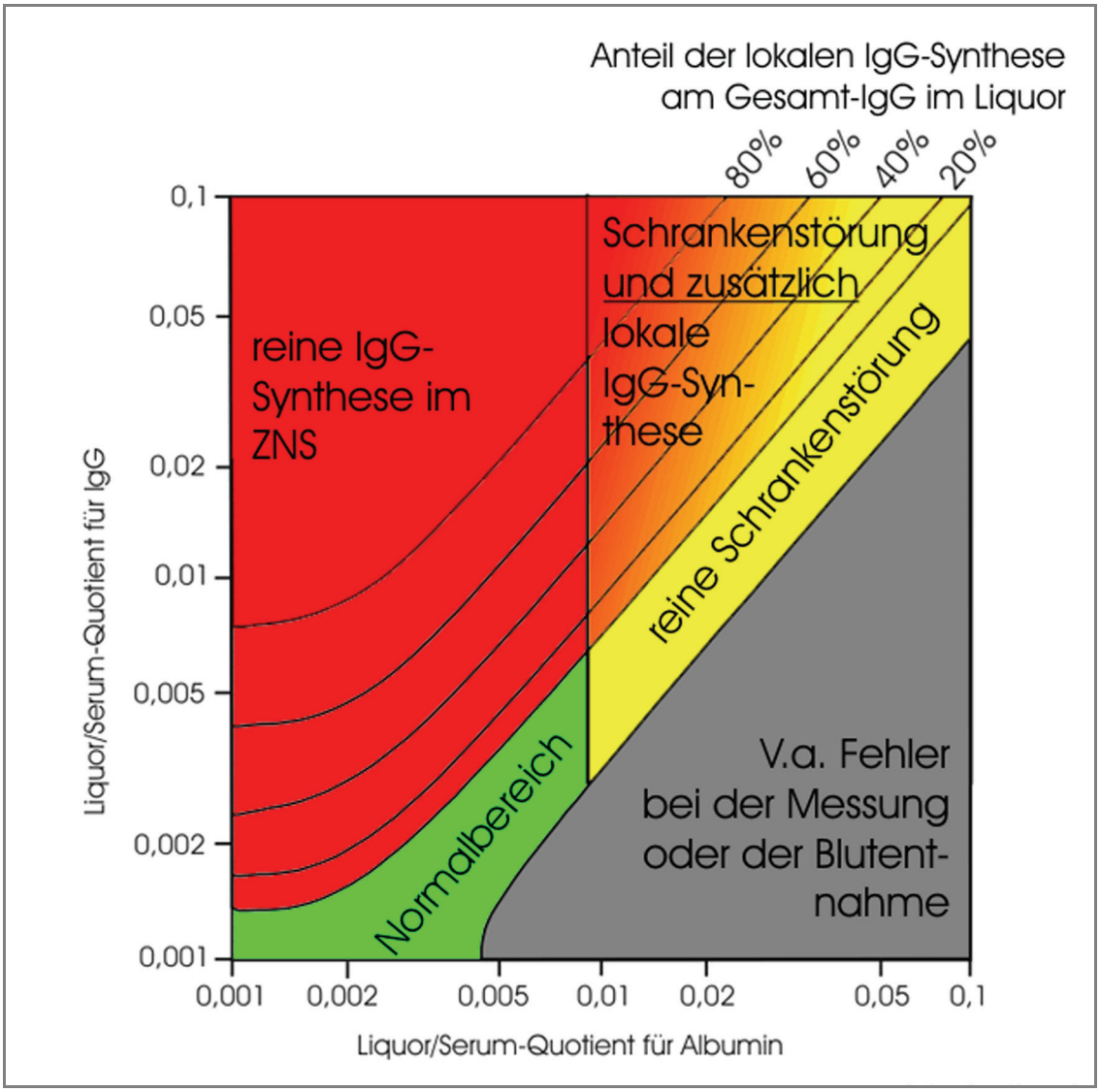

Abbildung 3 Quotientendiagramm von Reiber [Quelle: http//www.Laborlexikon.de; Internet]

Alle diese Markersysteme sind nicht krankheitsspezifisch, da Entzündungen, Bildung von Autoantikörpern, Demyelinisierung und Neurodegeneration bei einer Vielzahl neurologischer Erkrankungen vorkommen.

1.2. Proteine des Liquor cerebrospinalis

Die Inhaltsstoffe des eben beschriebenen CSF ist seit Einführung der Lumbalpunktion durch Quincke (Quincke; 1895) recht gut bekannt. Die meisten Liquorinhaltsstoffe lassen sich auch im Blut, in der Regel in viel höheren Konzentrationen nachweisen, Ausnahmen hiervon sind die zusätzlichen hirneigenen Proteine. Daher ist eine quantitative Bestimmung der Liquorinhaltsstoffe ohne Bezug auf die Blutwerte nicht sinnvoll. Liquor und Blut müssen daher parallel entnommen und untersucht werden (Tumani et al.; 2005). Für hydrophile Moleküle besteht eine klare Korrelation zwischen dem Liquor/Serum-Quotienten und den hydrodynamischen Molekülgrößen. Das gilt allerdings nur im „steady-state-Gleichgewicht“, d.h. bei stabilen Konzentrationen der Moleküle im Serum und bei ungestörter Blut-Liquor-Schranke. Umso größer die Moleküle, umso größer ist dann auch der vorliegende Gradient, da er molekülgrößenabhängig ist (Felgenbauer; 1995). Etwa 80% der Liquorproteine eines gesunden Patienten stammen aus dem Blut, wobei bestimmte Proteine wie Albumin, IgG, IgA oder Transferrin und Haptoglobin dominieren. Wenn Molekülgröße und Serumkonzentration dieser hydrophilen Moleküle bekannt sind, kann ihre Konzentration im Liquor annähernd berechnet werden. Ist die Konzentration im Liquor höher als rein rechnerisch zu erwarten wäre, so ist eine intrathekale Synthese anzunehmen, oder wie bei einer Erhöhung des Haptoglobins, ein Zeichen für einen entzündlichen Prozess im ZNS. Bei einer Funktionsstörung der Blut/CSF-Schranke nimmt die Relation von aus dem Plasma stammenden Proteinen entsprechend einer Hyperbel zu (Reiber; 1994). Das kann man dann mit Hilfe des Reiberdiagramms auch berechnen. Der Liquor/Serum-Quotient bei einer Schrankenstörung ändert sich für lösliche Proteine entsprechend einer Sättigungskurve (Lewczuk et al.; 1998).

Liquorproteine lokalen Ursprungs, also intrathekal synthetisierte, machen etwa 20% des Gesamtproteins im Liquor aus. Wesentliche Proteine sind hierbei Transthyretin, Prostaglandin-D-Synthase, Cystatin C, $ß_2$-Mikrolobulin, Apolipoprotein E und Transferrin. Der größte Anteil der intrathekalen Proteine wird in den Meningen synthetisiert, nur ein geringer Anteil entstammt dem Hirnparenchym. Bei einem erhöhten Albuminquotienten bleibt die Konzentration der meisten untersuchten Proteine lokalen Ursprungs mit Ausnahme von Prostaglandin-D-Synthase nahezu unverändert (Tumani et al.; 1998), da ihre Transportmechanismen unterschiedlich und von einander unabhängig sind.

Bei einer intakten Blut-Liquor-Schranke ist die Konzentration des Gesamteiweißes im lumbalen Liquor von Referenzpersonen um das zwei- bis dreifache höher als in den Seitenvent-

rikeln (z.B. Albumin 2,3-fach; IgG 2,6-fach). Entsprechend steigt die Konzentration der meisten Proteine von ventrikulär nach lumbal an. Meist gilt dieser ventrikulo-lumbale Gradient für Proteine, die aus dem Blut stammen, da über die bis in den Lumbalraum reichende leptomeningeale Blut-Liquor-Schranke zusätzlich Serumfiltrat hinzukommt (Tumani et al.; 2005). Das Albumin kann man aber trotzdem als einen Marker für eine Störung der Schrankenfunktion betrachten bzw. als Bezugsparameter für Synthese von Ig im ZNS ansehen.

Für ZNS-spezifische Proteine, die aus dem Parenchym kommen oder aus dem Plexus choroideus sezerniert werden (z.B. Trasthyretin) ist das ventrikulo-lumbale Verhältnis ausgeglichen. Für intrathekal synthetisierte Proteine, die primär aus den Leptomingen stammen (z.B. Prostaglandin-D-Synthase), ist wie bei den aus dem Blut stammenden Proteinen ein Konzentrationsanstieg zum lumbalen Liquor hin zu beobachten. Das ist dadurch erklärbar, da die leptomeningealen Strukturen entlang der cranio-caudalen Neuroaxis Proteine zusätzlich sezernieren (Blödorn et al.; 1999). Die Prosta-glandin-D-Synthase ist ein Enzym und Transporter und dient als Nachweis für eine Liquorfistel (Tumani et al.; 2005).

Die im Liquor vorkommenden Ig-Formen sind Träger der humoralen Immunreaktion im ZNS und Indikatoren für chronische oder zurückliegende ZNS-Erkrankungen.

Es sind auch noch weitere Proteine aus dem CSF bekannt, die als Marker für verschiedene neurologische Erkrankungen gelten, aber noch keinen absolut relevanten Marker für die MS oder das GBS.

Proteine werden durch die moderne Technik mit einer Vielzahl Methoden identifiziert bzw. analysiert. Für die Identifikation bzw. Auftrennung von Proteinen werden chromatografische Methoden, Elektrophoresetechniken oder MALDI-Analysen genutzt. Um im weiteren Regulationsmechanismen zu erkennen, werden Array-Analysen, ELISA-Tests oder WesternBlot-Analysen durchgeführt. Somit steht eine Reihe von Analysetechniken zur Auswahl. In der vorliegenden Arbeit wurde das Hauptaugenmerk auf die 2D-Elektrophorese und die sich anschließenden MALDI-TOF-Analysen gerichtet. Mit dem Verfahren des Proteinblottings wurden dann einige Proteine näher untersucht. Und mithilfe des fluorimetrischen Assays wurde die Aktivität eines Enzyms detektiert.

1.3. Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (Encephalomyelitis disseminata; MS) ist eine entzündliche, demyelinisierende und degenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems. Der französische Pathologe Jean Cruveilhier (1791-1873) beschrieb sie zuerst.

Die Krankheit zeichnet sich durch zwei wesentliche Merkmale aus. Es treten im Gehirn und teilweise auch im Rückenmark Entzündungen auf. Dabei kommt es zu einer Schädigung der Myelinschicht der Axone und manchmal auch zur Schädigung der Axone selbst. Die Entzündungen sind vermutlich auf den Angriff körpereigener Abwehrzellen auf die Myelinscheiden der Nerven zurückzuführen, wodurch die MS als eine immunvermittelte Krankheit bezeichnet werden kann. Alle diese Veränderungen vermindern oder unterbrechen im Krankheitsverlauf die Leitfähigkeit der Nervenbahnen, was zu Symptomen wie Gefühlsstörungen, Spastik oder Lähmungen führt. Diese so geschädigten Nervenfasern können teilweise ihre Leitfähigkeit zurück gewinnen, indem sie vermehrt Natrium-Kanäle exprimieren und in die Zellmembran einbauen (Waxman; 2006) oder indem Remyelinisierung einsetzt.

Wie genau die MS entsteht, ist noch nicht geklärt. Genetische Faktoren könnten eine Rolle spielen (Compston 1998; Ebers et. al 1995). Eine permeable Blut-Hirn-Schranke in der frühen Phase der Pathogenese von MS ist wichtig für die klinische Manifestation der Krankheit. Mögliche Mechanismen der Entstehung der MS könnten eine Dysfunktion bei der Regulation des Immunsystems sein oder eine reduzierte Fähigkeit, die Antwort des Immunsystems im ZNS zu beenden (Gold et al. 1997; Macci et al. 2001).

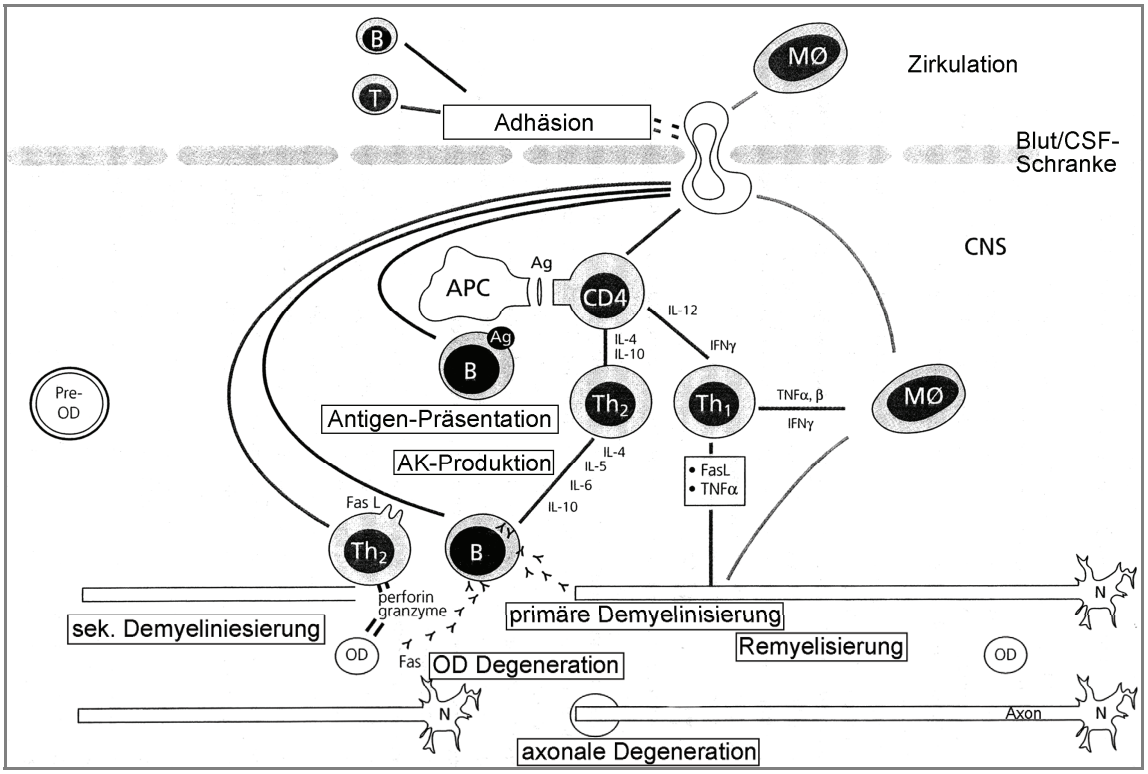

Abbildung 4 Schematische Illustration von potentiellen Faktoren bei der Multiplen Sklerose (Ag = Antigen; APC = Antigen-präsentierende Zelle; B = B-Zellen; B1 = B-Zelle, fetaler Typ; B2 = B-Zelle, adulter Typ; Fas = CD95 Molekül; FasL = Fas-Ligand; IFN_γ = Interferon-Gamma; IL = Interleukin; LPS = Lipopolysaccharid; MO = Monocyten/ Makrophagen; N = Neuronen; OD = Oligodendrocyten; T = T-Zellen; Tc = cytotoxische T-Zellen; Th = T-Helferzellen; TNF_α = Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha) [Quelle: MS & CSF; UK Zettl & H Tumani]

Anhand der oben dargestellten Abbildung (Abb. 4) ist zu erkennen, dass immunologische Mechanismen, genau wie degenerative Mechanismen in den Pathomechanismus der MS involviert sind. Die B- und T-Zellen verbinden sich mit den Makrophagen und wandern in den Liquor durch die Blut/CSF-Schranke. Die axonale Degeneration wird durch fehl geleitete Makrophagen hervorgerufen, die die Antigene gegen den eigenen Organismus von den T- und B-Zellen präsentiert bekommen und daher eine primäre Demyelinisierung durchführen. Die Makrophagen bekommen die Antigene präsentiert, welche gegen das körpereigene Myelin gerichtet sind, und regeln die Aktivität der B- und T-Zellen hoch. Die B- und T-Zellen sorgen auch dafür, dass die Oligodendrozyten nicht mehr arbeiten können, wodurch es auch zu einer Demyelinisierung kommt. Die neuropathologischen Erkenntnisse zeigen, dass der chronisch inflammatorische Prozess im ZNS von der Quantität und Qualität des genetischen Hintergrundes der Patienten abhängt, was wiederum zur Heterogenität dieser Krankheit beiträgt (Lassmann, 2001; Lucchinetti, 2004). Die Autoimmunreaktion wird vermutlich dadurch hervorgerufen, dass spezielle Zellen des Immunsystems, nämlich CD4-positive Zellen die Blut-Hirn-Schranke überwinden und in das ZNS einwandern. Die aktivierten CD4-Zellen schütten Botenstoffe (Zytoki-

ne) aus, die eine entzündungs- und immunreaktionsfördernde Wirkung haben. Auf diesem Wege wird eine Entzündungsreaktion gegen die Nervenzellen des Gehirns und deren Myelin hervorgerufen und somit der Abbau initialisiert (Cannella und Raine, 1995).

Die Diagnose der MS beruht auf neurologischen Symptomen, dem Nachweis von Läsionen im ZNS mittels MRT-Verfahren und der CSF-Analytik (McDonald et al., 2001). Die CSF-Analytik beruht auf den pathologischen Befunden der Patienten. Bei 50% der Patienten findet sich eine leichte Vermehrung lymphozytärer Zellen im Liquor (lymphozytäre Pleozytose). Eine intrathekale Antikörpersynthese mit Nachweis oligo-klonaler Banden in der isoelektrischen Fokussierung ist bei über 95% der Patienten nachweisbar (Link & Huang, 2006). Eine intrathekale Synthese von Antikörpern gegen Masern, Röteln und Varizella-Zoster-Viren (MRZ-Reaktion) findet sich bei 89% der Patienten (Reiber et al., 1998).

Es gibt eine Menge verschiedener Therapiemöglichkeiten, aber noch bietet keine der Therapien eine Chance auf Heilung. Eine Langzeittherapie mit ß-Interferon und/oder Antikörpern führt jedoch zu einer Verzögerung des Krankheitsverlaufs (Linker et al., 2006).

1.4. Das Guillain-Barré-Syndrom

Das Guillain-Barré-Syndrom (GBS), auch Polyradikulitis genannt, ist eine klinisch heterogene immunvermittelte Erkrankung (Radziwill et al., 2000), bei der es durch die Zerstörung der isolierenden Myelinschicht des peripheren Nervensystems (Hughes et al., 1999) zu Leitungsstörungen, Leitungsblock und Lähmungserscheinungen kommt. Es handelt sich um eine akute, immunologisch-postinfektiös entzündliche Erkrankung der peripheren Nerven und Nervenwurzeln (Polyradikulitis). Es sind vier Unterformen des GBS bekannt, zum einen die klassische akute inflammatorisch-demyelinisierende Polyradikuloneuropathie (AIDP), die akute motor- und sensorisch-axonale Neuropathie (AMSAN), die ohne sensorische Beteiligung verlaufende Neuropathie (acute motor axonal neuropathy, AMAN) und klinische Varianten wie das Miller-Fisher-Syndrom (Hughes und Cornblath, 2005; Hartung et al., 2002). Am häufigsten tritt in der westlichen Hemisphäre die AIDP-Variante auf (Hartung et al., 2002).

In die Pathogenese des GBS sind sowohl zelluläre als auch humorale Immunantwortreaktionen involviert (Hartung et al., 2002). Einige nicht lebensbedrohliche Primärerkrankungen wie Infektionen mit Herpes-Simplex-Viren, Epstein-Barr-Viren, Mykoplasmen und Chlamydien werden mit dem Auftreten des GBS assoziiert. Infektionen mit dem enteralen Erreger Campylobacter jejunii werden als Hauptauslöser der AMAN vermutet (Hartung; 1999). Bei Patienten lassen sich Autoantikörper gegen Glykolipide nachweisen. Möglicherweise kommt es durch die Infektion mit dem Erreger zu einer Kreuzreaktion gegen Nervenbestandteile. Dieses geschieht durch gemeinschaftlich vom Erreger und Nerv produzierte Antigene, dieser Mechanismus wird molekulares Mimikry genannt (Ang et al., 2001; Yuki, 2001a; Yuki et al., 2001b).

Campylobacter jejunii ist aber nicht der einzige Erreger, der über molekulares Mimikry GBS auslösen kann (Hartung et al., 2002). Nach einer Latenzzeit von zwei bis vier Wochen nach einer Infektion können erste Symptome des GBS nachgewiesen werden. Die Abbildung 5 spiegelt die inflammatorische Immunreaktion des Körpers gegen das Nervengewebe wider. Das Eindringen von Lymphozyten und Leukozyten in das periphere Nervengewebe ist ein sehr kritischer Schritt. Dieser wird durch die unterschiedliche Expression von endothelialen Adhäsionsrezeptoren, Chemokinen und Chemokinrezeptoren vermittelt (Hartung et al., 2002). Das Ende der inflammatorischen Reaktion ist teilweise über Makrophagen vermittelt, welche hierbei die T-Zellen zur Apoptose anregen und anti-inflammatorische Cytokine wie IL-10 und TGFβ freisetzen (Hartung et al., 2002).

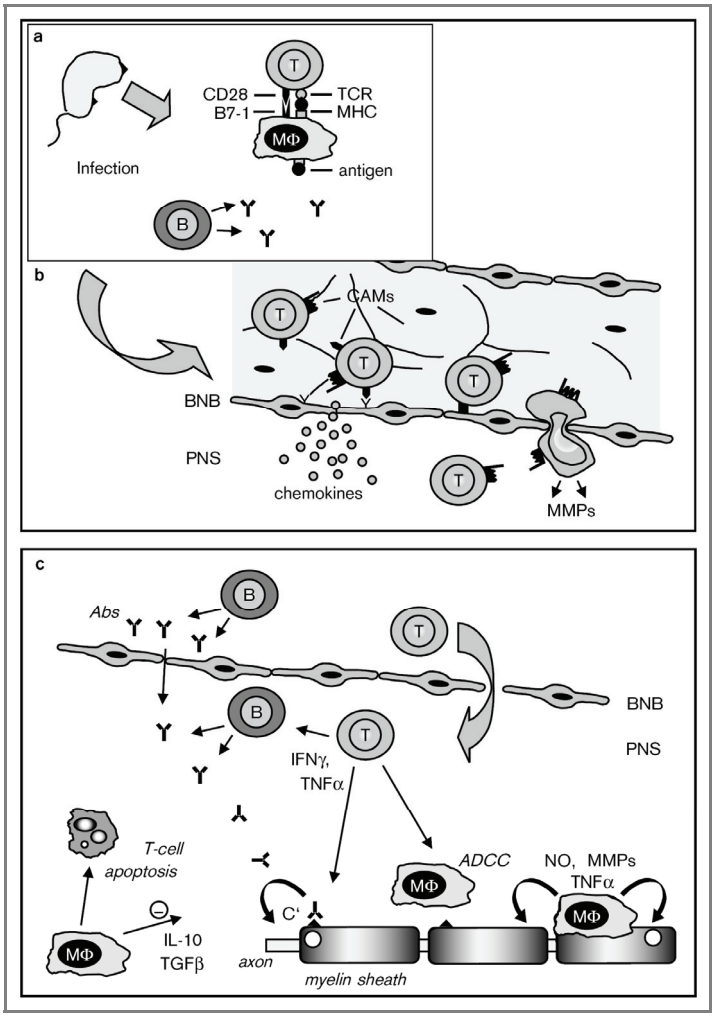

Abbildung 5. Schematische Illustration der Grundprinzipien der zellulären und humoralen Immunantwort. a) Autoreaktive T-Zellen (T) erkennen ein spezifisches Autoantigen, welches von der MHC-Klasse II präsentiert wird und gleichzeitig erkennen sie auch co-stimulierende Oberflächenantigene auf Makrophagen (MΦ). b) Aktivierte T-Zellen (T) wandern durch die Blut-Hirn-Schranke (BNB) mit der Aufgabe das periphere Nervensystem (PNS) anzugreifen. Dieser Prozess wird durch Chemokine, zelluläre Adhäsionsmoleküle und Matrix-Metalloproteinasen vermittelt. c) Im PNS erhöhen die durch T-Zellen aktivierten Makrophagen, die phagozytotische Aktivität und die Abgabe von toxischen Mediatoren (z.B. Stickstoffmonoxyd (NO), Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)). Es werden auch proinflamatorische Cytokine wie TNFα oder IFNγ freigesetzt. Autoantikörper (Abs), welche die BNB durchqueren, oder lokal von den B-Lymphozyten (B) produziert werden, fördern den Prozess der Demyelinisierung und des Abbaus des Myelins. Abs können die Demyelinisierung vermitteln, sie können relevante Epitope für Reizleitung an den Nervenfasern blockieren und das Komplement System C (C´) aktivieren. [Quelle: Hartung et al., 2002]

Bei allen GBS-Formen treten zu Beginn der Krankheit Dysästhesien an Händen und Füßen auf. Die Patienten leiden an unspezifischen Symptomen wie Rücken-, Gelenk- und Gliederschmerzen. Durch Störungen der Tiefensensibilität kann es zu Gang- und Standataxien kommen. Des Weiteren kann eine von distal nach proximal symmetrisch verlaufende Muskelschwäche auftreten (Hartung et al., 1995). Außerdem kommt es in ungefähr 50% der Fälle zu einem Befall der myelinisierten Fasern des autonomen Nervensystems, wobei auch Hirnnerven betroffen sein können. Parasympathische und sympathische Nerven können unterschiedlich stark betroffen sein. Im Hirnbereich kommt es häufig zu einer ein- oder doppelseitigen Facialisparese (Radziwill, 2000).

Im Bezug auf die vier Unterformen zeigt sich das GBS wie folgt: AIDP und die zwei axonalen Subtypen beeinträchtigen gewöhnlich alle vier Extremitäten und können auch die kranialen Nerven und die Respiration beeinflussen. Eine Beteiligung des autonomen Nervensystems ist bei der AIDP bekannt, besonders mit respiratorischem Ausfall, aber nicht bei der AMAN (Asahina et al., 2002). Das GBS wird in erster Linie durch die klinische Untersuchung des Patienten diagnostiziert. Ein Hauptaugenmerk wird auf den Verlust der Muskeleigenreflexe und die Störung des autonomen Nervensystems gelegt. Im Zuge der Anamnese wird insbesondere nach kürzlich zurückliegenden Infektionen gefragt. Bei knapp 90% der Patienten wird eine Liquoruntersuchung als weiterer Diagnostikschritt durchgeführt. In der Mehrzahl der Fälle ist eine deutliche Eiweißerhöhung (1 – 10 g/l) bei meist gleichbleibender oder gering erhöhter Zellzahl zu beobachten. Die Erhöhung des Eiweißes im Liquor korreliert jedoch nicht mit der Schwere der Erkrankung. Die Diagnose und Verlaufskontrolle der Polyradikulitis beruht neben klinischem Bild und Anamnese auch auf elektrophysiologischen Untersuchungen (Van der Meche et al., 2003).

Zurzeit kann das GBS am besten mit einer Plasmapherese (Brettle et al., 1978) und einer Immunglobulingabe (Kleyweg et al., 1988) behandelt werden. Eine kausale Therapie steht bisher nicht zur Verfügung (Hughes et al.; 2003).

1.5. Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, Proteine aus menschlichem Liquor cerebrospinalis aufzutrennen, zu quantifizieren und zu identifizieren. Es sollen insbesondere solche Proteine charakterisiert werden, die bei den beiden entzündlichen, demyelinisierenden neurologischen Erkrankungen Multiple Sklerose und Guillian-Barré-Syndrom in ihrer Konzentration verändert sind oder neu auftreten. Weiterhin soll geprüft werden, ob einige der identifizierten Proteine als Krankheits-Marker herangezogen werden können und ob sie sich für eine Therapie- und Verlaufskontrolle der beiden Krankheiten eignen. Darüber hinaus wäre es grundsätzlich interessant, neue CSF-Proteine zu entdecken und deren physiologische und pathophysiologische Rolle aufzuklären. Diese Arbeit soll einen Beitrag dazu leisten, Kandidaten für spezifische Krankheitsmarker für demyelinisierende neurologische Erkrankungen zu identifizieren. Die Ergebnisse könnten langfristig die Diagnose und Verlaufskontrolle der genannten Krankheiten verbessern.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Geräte/Hilfsmittel

	Firmen
MultiphorII unit	Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig, Deutschland
Protean Plus Dodeca™ Cell	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Investigator 2-D electrophoresis system	Genomic solutions, Maryland, USA
Immobiline™ DryStrip, pH 4-7, 24 cm	Amersham Biosciences AB, Uppsala, Schweden
Immobiline™ DryStrip, pH 6-11, 24 cm	Amersham Biosciences AB, Uppsala, Schweden
Immobiline™ DryStrip, pH 3-10, 24 cm	Amersham Biosciences AB, Uppsala, Schweden
IPG Buffer, pH 6-11, 1 ml	Amersham Biosciences AB, Uppsala, Schweden
Mineralöl für IEF	Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden
BCA™ Protein Assay	Perbio, Bonn, Deutschland
AURUM™ Serum Protein Mini Kit	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Amersham ECL Plus Western Blotting	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Microcon, Centrifugal Filter Divices	Amicon Bioseperations Bedford, MA Amersham
Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Restore™ Plus WesternBlot Stripping Buffer	Perbio, Bonn,Deutschland

2.1.2. Verwendete Chemikalien

	Firmen
Acrylamid (40%)	AppliChem, Deutschland
Aqua ad injectabilia	Braun, Deutschland
Bisacrylamid (2%)	AppliChem, Deutschland
Blockingreagenz	Roche Biochemicals, Deutschland
Coomassie®Brilliantblau G250	Carl Roth GmbH, Deutschland
Prestained SDS-PAGE Standards	Bio-Rad Laboratories, Kanada
Ponceau S Solution	Sigma, USA
Roti®-Load 1	Carl Roth GmbH, Deutschland
Silbernitrat	Carl Roth GmbH, Deutschland
Pharmalyte, 3-10	Amersham,Biosciences, Braunschweig

Alle anderen in dieser Tabelle nicht erwähnten Chemikalien wurden von den Firmen Appli-Chem, Fluka, ICN Biomedicals, peQLab, Merck (Darmstadt), BfB, Serva (Heidelberg) in *p.A.* Qualität bezogen.

2.1.3. Antikörper

Bezeichnung, Antigen	Verdünnung	Verdünnungs-medium	Firma
Glutaminylcyklase	1:100	PBS	Unicus und Probiodrug
Antithrombin III	1:500	PBS	BDI 205
Cystatin C	1:10.000	PBS	Abcam 2123-100
Prealbumin	1:750	PBS	Abcam 9015-1
Polyclonal Swine Anti-Rabbit Immunoglobuline/HRP	1:2.000	PBS	Dako cytomation
Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobuline/HRP	1:1.000	PBS	Dako cytomation
Polyclonal Rabbit Anti-Sheep Immunoglobuline/HRP	1:1.000	PBS	Dako cytomation
F-Actin	1:2.000	PBS	Chemicon
Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobuline/HRP	1:5.000	PBS	Dako cytomation

Verwendete Antikörper und die entsprechenden Verdünnungen für den Western Blot

2.1.4. Verwendete Peptidsequenzen zur Generierung des QC-Antikörpers

Es sollte überprüft werden, gegen welches von den vier genannten Peptiden eine Reaktion im Kaninchen stattfinden konnte. Diese vier verschiedenen QC-Peptide wurden verwendet, da nicht bekannt war, welches von ihnen eine immunreaktive Wirkung hervorrufen würde. Zur Prüfung der Spezifität wurde die Bindung des Kaninchenantiserums an die Peptide 1-4 getestet sowie die Inhibition der Bindung durch diese Peptide. Dabei wurde festgestellt, dass die Peptide 1 und 4 eine Reaktion im Kaninchen auslösten, wohingegen die Peptide 2 und 3 keine Reaktion auslösten.

Peptide: 1) GEEAFLHWSPQDSLYG
2) TFLSQTPYGYRSF
3) NLMKILQVFVLEYLHL
4) VSPSASAWPEEKNYHQPA

2.2. Proteinanalytik

2.2.1. Konzentrationsbestimmung für Protein (BCA)

Im ersten Arbeitsschritt wurden die Liquor-Proben in zwei Fraktionen nach ihrem Molekulargewicht (< 3 kDa / > 3 kDa) getrennt. Der Proteingehalt der > 3 kDa Fraktion wurde mit Hilfe des BCA™ Protein Assay Kits (Pierce) gemäß dem Protokoll des Herstellers ermittelt, bevor die Probe x > 3kDa 1:10 verdünnt werden konnte.

Zur Proteinbestimmung: 10 µl der Proben bzw. je 10 µl der Eichkurve des BSA-Standards (1mg/ml BSA) wurden mit 200 µl des Färbereagenz (50 Teile BCA-Reagenz A + 1 Teil BCA-Reagenz B) versetzt, auf eine 96-Well-Platte aufgetragen und anschließend 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte im Anschluss mittels eines Photometers bei 490 nm. Die Proteinkonzentration wurde in Bezug auf die mitgeführte Standardkurve berechnet.

2.2.2. Zweidimensionale Proteingelelektrophorese

Behandlung der Liquor-Proben: Um eine gute Trennung des Proteingemisches zu gewährleisten, wurden die Liquor- und Serumproben in zwei Fraktionen (Liquorfraktion < 3 kDa / > 3 kDa) aufgetrennt. Anschließend wurde die Proteinbestimmung durchgeführt und die entsprechende Menge Liquor-Protein (80 µg für die Silberfärbung) mit dem vierfachen Volumen Ethanol gemischt und bei 2 – 8 °C für 12 – 16 h gefällt. Anschließend wurden die gefällten Proteine zentrifugiert (20000 g; 4 °C; 15 min) und dreimal mit kaltem 70%igem Ethanol gewaschen. Nach dem letzten Waschschritt wurde die restliche Flüssigkeit vollständig abgenommen und die Pellets für 10 min mit offenem Deckel bei 30°C getrocknet. Die getrockneten Pellets wurden in 450 µl Rehydratisierungspuffer gelöst und 1,5 h geschüttelt (700 rpm). Dieses Gemisch wurde anschließend auf die 24 cm IPG-Streifen gegeben und es erfolgte über Nacht bei 20 °C die Rehydratisierung.

2.2.3. Isoelektrische Fokussierung

In der ersten Dimension erfolgt eine Trennung der Proteine nach ihrer Ladung. Dazu wurden die IPG-Streifen auf die IEF-Apparatur (Multiphor II) aufgelegt. Über die Enden der Streifen wurden mit A.dest befeuchtete Elektrodenpapierstreifen gelegt und anschließend die Elektroden der Apparatur aufgesetzt. Die IPG-Streifen wurden mit Öl überschichtet, um ein Austrocknen zu verhindern. Der Lauf erfolgte nach dem unten beschriebenen Programm bei einer konstanten Temperatur von 20 °C.

Programm zur isoelektrischen Fokussierung mit pH 3 – 10 IPG-Streifen

1. Phase	Gradient	500 V	500 Vh	1 mA	2 h
2. Phase	Stufe	500 V	2500 Vh	1 mA	5 h
3. Phase	Gradient	3500 V	10.000 Vh	1 mA	5 h
4. Phase	Stufe	3500 V	35.000 Vh	1 mA	14 h

Programm zur isoelektrischen Fokussierung mit pH 4 – 7 IPG-Streifen

1. Phase	Gradient	500 V	500 Vh	1 mA	2 h
2. Phase	Stufe	500 V	2500 Vh	1 mA	5 h
3. Phase	Gradient	3500 V	10.000 Vh	1 mA	5 h
4. Phase	Stufe	3500 V	35.000 Vh	1 mA	10 h

Programm zur isoelektrischen Fokussierung mit pH 7 – 11 IPG-Streifen

1. Phase	Gradient	500 V	500 Vh	1 mA	2 h
2. Phase	Stufe	500 V	2500 Vh	1 mA	5 h
3. Phase	Gradient	3500 V	17.500 Vh	1 mA	5 h
4. Phase	Stufe	3500 V	66.500 Vh	1 mA	18 h

Chemikalien für die isoelektrische Fokussierung

10 x CHAPS:	150 mg	DTT
	500 mg	CHAPS
	0,5% Pharmalyte 3-10 (IPG-Puffer)	+ Spatelspitze Bromphenolblau
Rehydratisierungslösung:	8 M Harnstoff	
	2 M Thioharnstoff	
	1% CHAPS	

2.2.4. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die fokussierten IEF-Streifen wurden vor dem Aufbringen auf die zweite Dimension äquilibriert, d.h. die fokussierten Proteine wurden „mobil“ gemacht, um ihnen den Übergang ins Gel zu erleichtern. Die Äquilibrierung erfolgte je 15 min in Lösung A und anschließend in Lösung B. Danach wurden die äquilibrierten Streifen auf zuvor gegossene 12,5%ige SDS-Polyacrylamid-Gele gelegt und mit 1%iger Agarose fixiert. Die Trennung erfolgte mit 2 – 3 W pro Gel bei 8 °C für 12 – 16 h. Sobald die Bromphenolbande den unteren Rand des Trenngels erreicht hatte, wurde der Lauf abgebrochen.

Equilibrierungslösungen

Substanz	**Lösung A**	**Lösung B**
1,5 M Tris/HCL pH8,8 (375 mM)	2,5 ml	2,5 ml
6 M Harnstoff	3,6 g	3,6 g
87% Glycerol (20%)	2,3 ml	2,3 ml
20% SDS (2%)	1 ml	1 ml
10 mg/ml Dithiothreitol (DTT)	100 mg	
25 mg/ml Iodacetamid		250 mg
add A.dest	to 10 ml	to 10 ml

Polyacrylamid-Gel (Trenngel)	27,45%	A.bidest
	30,24%	40% (v/v) Acrylamid
	16,91%	2% (v/v) Bisacrylamid
	24,86%	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
	0,49%	10% (w/v) APS
	0,0024%	0,05% (w/v)TEMED
	3%	Tris
	14,4%	Glycin
	1%	SDS
	ad 5 l	A.dest

2.2.5. Silberfärbung

Die Silberfärbung ist eine der empfindlichsten Methoden zur Detektion von Proteinen. Silberionen bilden nichtstöchiometrische Komplexe mit Proteinen, indem sie mit sauren Gruppen und Sulfhydrylresten in Wechselwirkung treten. Sie reagieren ebenfalls mit entsprechenden funktionellen Gruppen in Lipid- und Zuckerresten. Dass dazugegebene Formaldehyd reduziert die Silber-Ionen in alkalischer Lösung zu Silber. Die Färbung erfolgte mit einem leicht modifizierten Protokoll nach Vorum (Mortz et al., 2001).

Der erste Schritt beginnt mit einer Fixierung (50% Methanol, 12% Essigsäure) der Gele von mindestens 30 min. Dann schließt sich ein Waschschritt (2*20min 50% Ethanol) an, gefolgt von 1 min Sensitivierung (0,02 % $Na_2S_2O_3$ * 5 H_2O). Anschließend wird mit A.dest für 2*20 sec gewaschen und die Färbung der Gele in der Färbelösung (0,2 % (w/v) Silbernitrat; 0,0375% Formaldehyd) für 20 min erfolgt danach. Ein nächster Waschschritt (2*20 sec A.dest) schließt sich der Färbung an, bevor die Entwicklung der Gele stattfindet. Hier werden die Gele für 3 – 8 min, je nach Färbung, in der Entwicklerlösung (6% Na_2CO_3; 0,0004% $Na_2S_2O_3$ * 5 H_2O; 0,025% Formaldehyd) geschwenkt. Gestoppt wird die Entwicklung mit 1% Glycin für 20 sec und anschließend mit 1% Glycin für 30 min. Als abschließender Schritt erfolgt Waschen in A.dest für mindestens 1 h.

2.2.6. Auswertung der Spots

Die Auswertung der Gele fand mit Hilfe der Delta2D-Software Version 3.5 von Decodon (Greifswald, Deutschland) statt. Hierzu wurden die Silbergele in Gruppen eingeteilt, in denen die Krankheiten und die Kontrollen miteinander verglichen wurden. Mit Hilfe der Einzelgele aus den Gruppen wurde ein Fusionsgel mit der Softwareeinstellung „UNION“ gebildet. Damit wurde gewährleistet, dass kaum sogenannte „Schlieren“ detektiert werden, sondern nur Färbungen, die als Spots gelten können.

Während der Erstellung der Fusionsgele wurden sie „normalisiert“. Man normalisiert um unterschiedlich aufgetragene Proteinmengen, Färbeunterschiede usw. auszugleichen. Die Normalisierung beeinflusst die Umwandlung des absoluten Spotvolumens in das prozentuale Volumen, was den Anteil eines bestimmten Spots am Gesamtvolumen beschreibt. Die Fusionsgele wurden anschließend genutzt, um Spots zu detektieren und auf die Einzelgele der Gruppe zurück zu übertragen. So wurde gewährleistet, dass auf allen Gelen der Gruppe die gleiche Anzahl an Spots und auch die gleiche Lage von Spots ausgewertet wurde.

Die Fusionsgele der Kontrollproteine bzw. Proteine von Patienten mit Krankheiten wurden dann untereinander verglichen. Die einzelnen detektierten Spots auf den Fusionsgelen wurden auf die Einzelgele übertragen und danach nur die Spots ausgewählt, die entweder mindestens um den Faktor 2 erhöht oder um den Faktor 0,5 erniedrigt in der gewählten Krankheit im Vergleich zur Kontrolle auftraten. In die Auswertung wurden nur die Spots einbezogen, die laut t-Test einen signifikanten Unterschied zwischen Kontrolle und Krankheit zeigen ($p \leq 0{,}05$).

2.2.7. Analyse der relevanten Proteinspots

Zur Identifikation relevanter Proteinspots wurden diese aus dem Silbergel ausgeschnitten und entfärbt. Dies erfolgt mit 30 µl Entfärberlösung (1:1; 30 mM $K_3[Fe(CN)_6]$, 100 mM $Na_2S_2O_3$). Anschließend werden die Spots 3*10 min mit 100 µl A.dest und 1*15 min mit 200 mM NH_4HCO_3 in 50% Acetonitril (ACN) gewaschen. Durch zweimalige Inkubation mit 100 µl ACN für je 15 min werden die Gelstücke getrocknet und anschließend zum proteolytischen Verdau der Proteine mit 15 – 20 µl Trypsin (10 ng/ml) überschichtet und für 12 – 16 h bei 37 °C inkubiert (Thiele et al., 2007).

Die Extraktion der Peptide erfolgt zunächst mit 20 µl Wasser mit 0,1% Essigsäure für 30 min im Ultraschallbad. Nach Überführen des Überstandes in Mikrovials schließt sich eine

zweite Extraktion mit 50% ACN in 0,05% Essigsäure an. Die Überstände werden vereinigt und in der Speed Vac auf circa 5 µl eingeengt. Diese 5 µl Probe werden mit 0,05% Essigsäure und 2% ACN auf 12 µl aufgefüllt und massenspektrometrisch analysiert.

2.2.8. Massenspektrometrie

Die Analyse der Peptidgemische zur Identifikation der Proteine erfolgte mittels LC-ESI-MS (Flüssigkeitschromatographie-gekoppelte Elektrosprayionisationsmassenspektrometrie). Die Peptidgemische werden zunächst mittels revers phase und dann in einem on-line-gekoppelten hochauflösenden LTQ-FT (Hochleistungs-Ionenfallen-Fourier-Transformations-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometer) oder LTQ-Orbitrap (Hochleistungs-Ionenfallen-Hybrid-Massenspektrometer) Massenspektrometer (Thermo Electron, Bremen) analysiert.

Die chromatographische Trennung der Peptide erfolgte in der Regel in einer UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) „nanoAquity“ der Firma Waters (Manchester, Großbritannien) auf einer nanoAcquity UPLC Säule (C18, 1.7 µm, 100 µm x 100 mm) in einem linearer 5 – 25% Acetonitril (ACN) Gradienten in 0,1% Essigsäure über 25 min bei einer Flussrate von 0,9 µl/min. Identifiziert wurden die Proteine durch Suche der MS/MS-Spektren in der humanen Expasy Datenbank (Version 51.5 vom 23. Februar 2007) mit der Software SEQUEST (Bioworks 3.2/Sequest 2.7, Thermo Electron).

Die Peptid-Massen-Toleranz beträgt 10 ppm, wobei zwei fehlende tryptische Spaltungen erlaubt waren. Methionin-Oxidation und Carbamidomethylierung am Cystein wurden als variable Modifizierungen in Betracht gezogen. Die Proteinidentifizierung erfolgte in der Regel auf der Basis von zwei signifikanten Peptiden oder zweier unabhängiger Identifikationen des Proteins im jeweiligen Proteinspot. Folgende Parameter wurden zur signifikanten Identifikation von Peptiden herangezogen: Ladungsabhängige X-Korrelationsfaktor für einfach geladene Peptide > 1.9; für zweifach geladene Peptide > 2.2; für dreifach geladene Peptide > 3.75; RSp Value = 4; Ion Prozent > 60 %.

2.2.9. Western Blot nach 1-D Gelelektrophorese von CSF-Proteinen

Die Auftrennung der Proteine erfolgte eindimensional. Hierzu wurden die Proben auf ein 12%iges Mini-Gel aufgetragen und die Proteine durch Anlegen einer elektrischen Spannung für 1 h getrennt (60 – 70 mA).

Anschließend werden die aufgetrennten Proteine auf eine Membran geblottet. Dieser Blot lief in einem nassen Milieu ab, daher bezeichnet man ihn als „Wet-Blot“.

Die Gele wurden nach dem Lauf mindestens 30 min im Laufpuffer gewaschen und anschließend in die Western-Blot-Apparatur überführt. Der Aufbau der Apparatur erfolgte nach folgendem Prinzip:

- Kathode
- 3 Lagen Filterpapier in Laufpuffer getränkt
- Proteingel
- Membran
- 3 Lagen Filterpaper in Laufpuffer getränkt
- Anode

Das Blotten der Proteine erfolgte für 12 – 16 h bei 4 °C, wobei 30 V und 50 mA nicht überschritten werden dürfen. Anschließend wurde die Membran kurz in A.dest gewaschen und intensiv getrocknet. Die getrocknete Membran wurde mit A.dest angefeuchtet und mit PonceauS angefärbt. Im nächsten Schritt wurde die Membran mit 100 ml 5% Magermilch für 2 – 3 h geblockt. Nun wurde die Membran mit dem Primärantikörper (AK unter Punkt 2.1.3) für 12 – 16 h bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Lösung mit dem Primärantikörper entfernt und die Membran dreimal mit PBS/0,05% Tween je 5 min gewaschen, anschließend mit dem Sekundärantikörper (AK unter Punkt 2.1.3) für mindestens 1 h inkubiert und dieser durch zweimaliges Waschen mit PBS/0,05% Tween für je 5 min entfernt.

Es schloss sich ein Waschschritt mit reinem PBS an. Dann wurde für 5 min das Entwicklerreagenz (ECL Plus) dazugegeben und die Membran im Dunkeln inkubiert. Die Entwicklung (Chemiluminesenz) erfolgte mit Hilfe eines Fotofilmes. Dieser wurde auf die Membranen gelegt und 1 – 5 min im Dunkeln gelagert. Die Entwicklung des Filmes erfolgte mit Chemikalien der Firma Agfa und dem dazugehörigen Protokoll.

12 %iges Polyacrylamid-Gel	16,4 % A. dest
	12,6% Trenngelpuffer (1,5 M Tris, pH 8,8)
	20% Acryl-Bis-Amidlösung (30%)
	0,25% SDS (20%)
	0,05% TEMED
	5% APS
Laufpuffer	1,92 M Glycin
	0,25 M TRIS
	1% SDS
Blotpuffer	1,92 M Glycin
	0,25 M TRIS
	10% Methanol
10x PBS	1,5 M NaCl
	30 mM KH_2PO_4
	100 mM Na_2HPO_4 x 12
	pH 7,4
Reagenz für Fotoentwicklung	AGFA Rapid Fixierer
	AGFA Developer Entwickler

2.2.10. Fluorimetrischer Assay zum Nachweis des Enzyms Glutaminylcyklase

Mithilfe eines fluorimetrischen Assays nach Schilling und Mitarbeitern (2002) sollte die Aktivität des Enzyms Glutaminylcyklase im Liquor überprüft werden.

Die Glutaminylcyklaseaktivität wurde mithilfe von L-glutaminyl-4-methylcoumarinyl-amide (Gln-AMC) bestimmt. Gln-AMC (50 µM) und das Enzym Pyroglutamate-Amino-peptidase (0.002 U/ml, Sigma) wurde zu Liquorproben zugegeben und bei 37 °C inkubiert. Wenn QC im Liquor enthalten ist, wandelt es Glutamat in eine zyklische Form (pGLU) um. Danach ist das Enzym Pyroglutamat-Aminopeptidase in der Lage eine proteolytische Spaltung zu vollziehen und pGLU von AMC abzuspalten. Das frei werdende Endprodukt 7-Amino-4-Methylcoumarin (AMC) wurde fluorimetrisch quantifiziert durch die Emission des Fluoresenz-lichtes bei einer Wellenlänge von 410 nm und nach Anregung bei 320 nm (Schilling et al., 2002).

2.3. Liquor- und Serumproben von Patienten

2.3.1. MS-Patienten

Um Markerproteine zu identifizieren, verwendeten wir für unsere Untersuchungen Liquorproben von Patienten, die zum Zeitpunkt der Liquorentnahme nicht medikamentös behandelt wurden. Es wurden weiterhin Liquorproben von verschiedenen MS-Formen für die Untersuchung verwendet. Die Patienten litten unter anderem an einer schubförmig verlaufender MS (Relapsin/Remitting MS = RRMS), an primär progredient verlaufender MS (PPMS) und an sekundär progredient verlaufender MS (SPMS). Zwei Patienten besaßen zudem Gd-Herde. Dabei handelt es sich um entzündlich-aktive Herde, die aber für den Patienten nicht relevant sind, da sie sich in nicht-eloquenten Hirnarealen befinden. Außerdem befand sich ein Patient im direkten Schub. Es wurden Proben von zwei Frauen und acht Männern verwendet, die zwischen 19 und 65 Jahren alt waren.

Bei allen als Kontrollen ausgewählten Patienten wurde Kopfschmerz als Krankheitssymptom diagnostiziert ohne weiteren neurologischen Hintergrund. An Geschlecht und Alter stimmten sie mit den MS-Patienten weitgehend überein; es waren zwei Männer und sechs Frauen im Alter von 31 bis 56 Jahren.

Von allen Patienten standen für die Untersuchungen 1 – 1,5 ml Liquor zur Verfügung.

Der Q_{ALB} 10^{-3} lag bei den MS-Liquors im Mittel bei 6,37 (3,6 – 9,6) und bei den Kontrollen um 6,63 (2,5 – 13). Der Q_{ALB} (Albuminquotient) spiegelt (in reziproker) Weise die Liquorflussgeschwindigkeit wider, dieser kann unter pathologischen Bedingungen verändert sein (Reiber, 2005).

2.3.2. GBS-Patienten

Des Weiteren wurden Liquorproben von Patienten mit dem Guillain-Barré-Syndrom (GBS) untersucht. CSF-Proben wurden von der Abteilung für Neurologie der Universität Ulm durch Lumbarpunktion gewonnen. Die Proben der GBS-Patienten (n = 10) wurden nach den europäischen Kriterien von Asbury und Cornblath (Asbury and Cornblath, 1990) eingeordnet. Zum Zeitpunkt der Lumbarpunktion erhielt keiner der Patienten eine immunmodulierende Therapie wie Steroide, IVIg oder Plasmapherese. Es wurden zwei Proben von erkrankten Frauen und acht Proben von erkrankten Männern für die GBS-Gruppe verwendet. Das Alter schwankte zwischen 35 und 82 Jahren.

Die Kontrollliquorproben wurden von Patienten (n = 10) verwendet, die an diabetischer Polyneuropathie (n = 4), Spannungskopfschmerz (n = 2), Myopathie (n = 1), Myelopathie assoziiert mit Vitamin B12 Mangel (n = 1) und ischämischem Schock (n = 2) litten. Die Patienten zeigten keine Form der Entzündung im Blut oder der CSF. Die Studie war durch die Ethikkommision der Universität Ulm (Nummer: 67/2001) genehmigt. Aliquots von 1 ml CSF wurden 30 min zentrifugiert, um die vorhandenen Zellen zu eliminieren. Anschließend wurden sie bei – 80 °C eingefroren. Bei den Kontrollen war der Geschlechteranteil genau wie bei den GBS-Patienten verteilt. Der Altersbereich schwankte zwischen 40 bis 71 Jahren.

Der Q_{ALB} 10^{-3} lag bei den GBS-Liquors im Mittel bei 21,2 (8 – 42,8) und bei den Kontrollen um 13,3 (6,6 – 24,5).

3. Ergebnisse

3.1. Etablierung der 2D-Elektrophorese von Liquor-Proteinen

Ein in unserem Labor bekanntes 2D-Protokoll konnte für die Auftrennung von CSF nicht genutzt werden. Im Liquor befinden sich zu viele Salze, um eine gute Trennung der Proteine zu gewährleisten. Außerdem verhindert die große Menge Albumin die optimale Fokussierung der CSF-Proteine. Aus diesem Grunde musste zunächst ein Protokoll für die optimale Auftrennung von CSF-Proben etabliert werden. Hierzu waren einige Einzellschritte nötig. Zuerst wurde die Beladungsmenge der Gele optimiert. Hierzu wurde mit einer Proteinmenge von 30 µg begonnen. Das Proteinbild zeigte eine zu geringe Beladung, es waren zu wenige Proteinspots erkennbar, daher wurde die Proteinmenge in 10 µg-Schritten bis auf das Maximum von 100 µg erhöht. Nach mehreren Versuchen wurde die benötigte Proteinmenge pro Gel auf 80 µg festgelegt. Bei dieser Proteinmenge lag keine Über- oder Unterbeladung der Gele vor.

Nachdem die einzusetzende Proteinmenge geklärt war, wurde die Zeit für die optimale Dauer der Isoelektrischen Fokussierung (IEF) bestimmt. In den Gelbildern war zu erkennen, dass bei einer 10stündigen Fokussierung bei 35.000 Vh als letzter Schritt der IEF keine vollständige Fokussierung der Proteinspots stattgefunden hatte. Dieses wurde durch die teilweise recht deutlichen Streifen über einen größeren pH-Bereich im Gelbild ersichtlich. Der letzte Schritt der IEF wurde daher von 10 h auf 14 h erhöht, sodass die gesamte IEF 26 h benötigte und jetzt eine recht vollständige Fokussierung erfolgen konnte.

Eine eventuelle Änderung der Rehydratisierungslösung sollte getestet werden, da trotz der Verlängerung der IEF immer noch keine 100%ige Fokussierung aller Proteinspots stattfand. Es gab immer noch einige größere sogenannte Schlieren im Gel. Dazu wurde die Rehydratisierungslösung der Firma Amersham mit selbst hergestellten Lösungen verglichen. Für die beste Fokussierung eignete sich die Lösung, die unter Punkt 2.2.3. (Material und Methoden) beschrieben wird. Verbessert wurde die Fokussierung zusätzlich durch Zugabe von DTT, welches die Faltung von Proteinen, deren Struktur durch Disulfidbrücken stabilisiert wird, zerstört.

Die Fraktionierung von CSF-Proben in eine hochmolekulare (> 3 kDa) und eine niedermolekulare Fraktion (< 3 kDa) wurde eingeführt. Dieser Schritt sollte eingebaut werden, da die MW-Trennung gleichzeitig auch eine Reinigung von Salzen darstellt, sodass mehr Proteine auf dem Gel sichtbar sind, da die Proteine aus der > 3 kDa-Fraktion nicht gehindert, werden in die IPG-Streifen einzuwandern. Nach der Größentrennung > 3 kDa wurde eine bessere Fokussierung der Spots im pH-Bereich 3 – 7 (Abb. 6) erzielt.

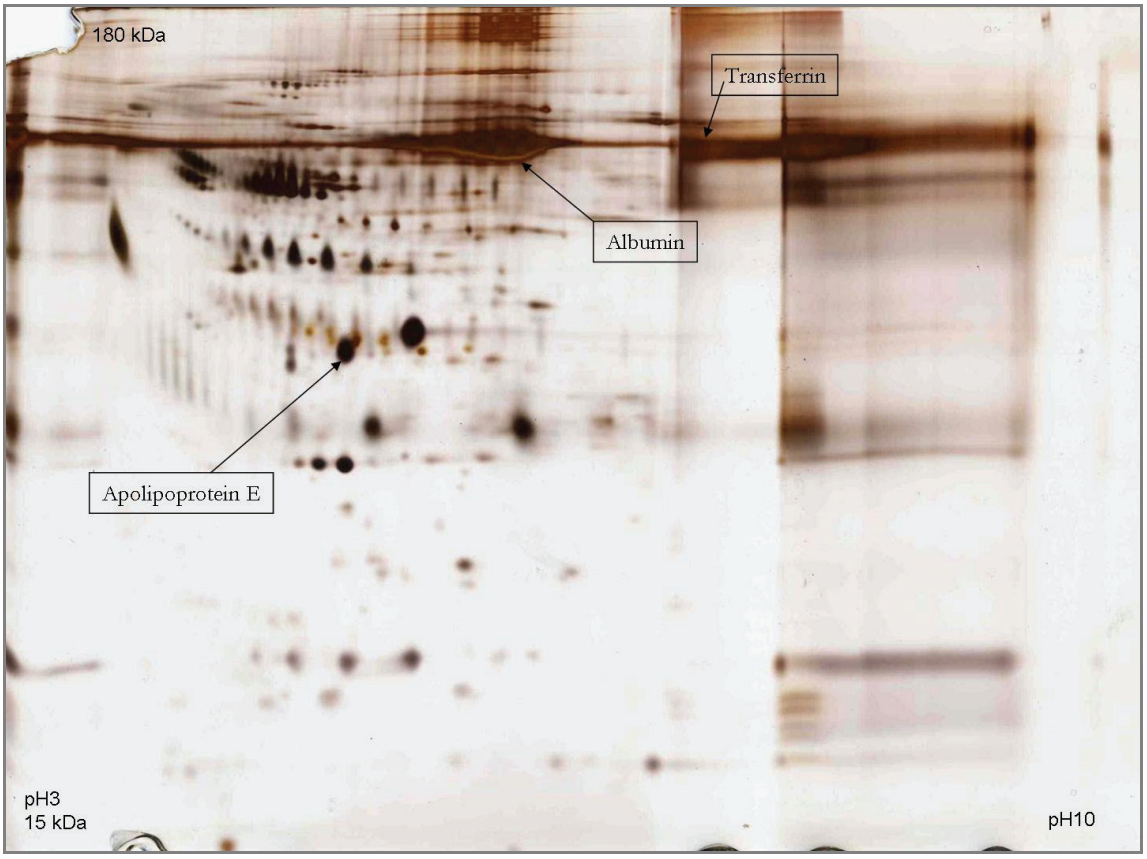

Abbildung 6 Silber gefärbtes 12,5 %iges Polyacrylamidgel mit fraktioniertem Liquor (> 3 k Da) über den pH-Bereich von 3 – 10 nl (nicht-linear)

Im pH-Bereich 7 – 10 kam es noch immer zu Fokussierungsproblemen (Abb. 6). Daher wurde ein zusätzlicher Fällungsschritt eingebaut. Mithilfe der Proteinfällung sollten weitere Salze aus den Proben entfernt werden. Diese verhindern eine Fokussierung, da die Proteine in ihrer Bewegung zu ihrem isoelektrischen Punkt verzögert werden. Hierbei wurden Ethanol-, Trichloressigsäure- und Acetonfällung miteinander verglichen. Bei allen Fällungen wurde das doppelte Volumen Fällungsreagenz zum eingesetzten Probenvolumen verwendet. Ethanol (EtOH) sorgte für eine sehr gute Abtrennung der Salze von den Proteinen. Bei der Acetonfällung wurden sowohl Salze als auch Proteine entfernt, sodass kein nutzbares Proteinmuster detektiert werden konnte. Bei der TCA-Fällung zeigten sich der geringste Proteinverlust und die bestmöglichste Fokussierung über den gesamten pH-Bereich von pH 3 – 10 (Abb.7).

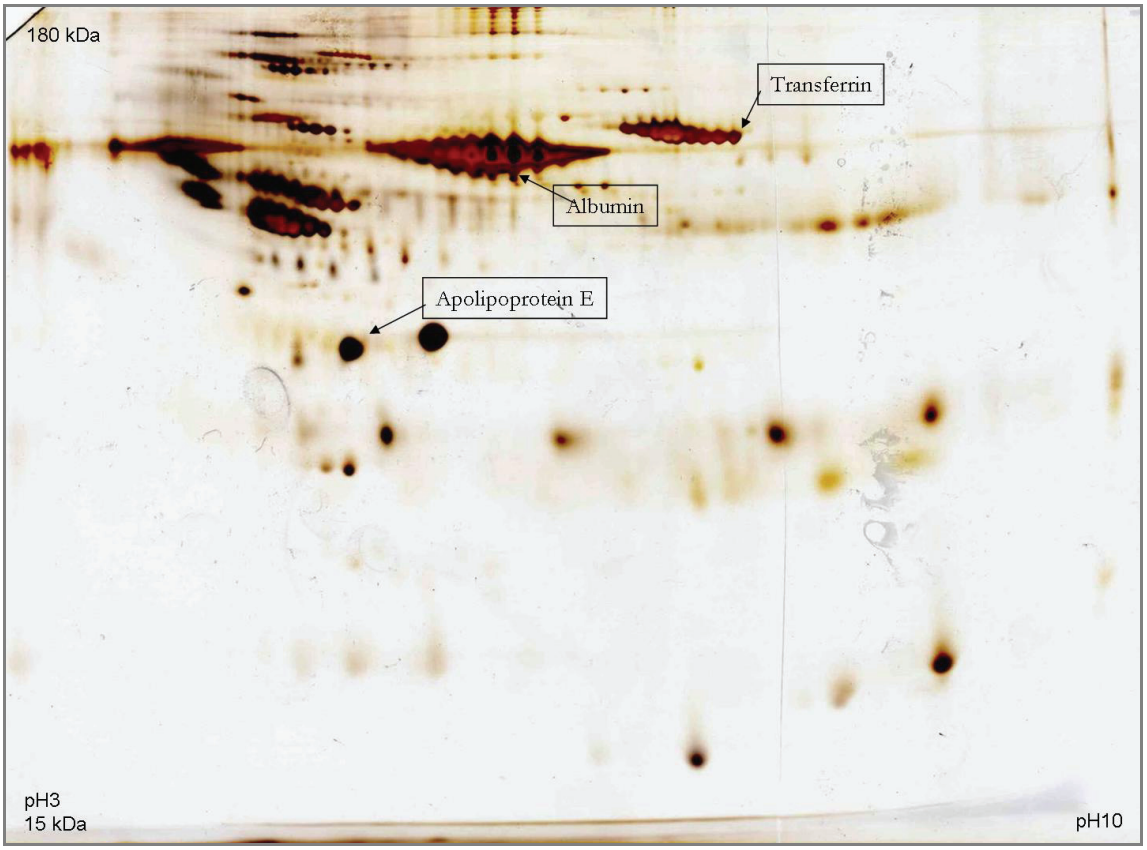

Abbildung 7 Silber gefärbtes 12,5 %iges Polyacrylamidgel mit fraktioniertem Liquor (> 3 k Da) und einer Fällung mit 2-Volumen TCA über den pH-Bereich von 3 – 10 nl (nicht-linear)

Durch die Etablierung einer neuen Silber-Färbung musste das Fällungsprotokoll nochmals überarbeitet werden. Hierzu wurden die EtOH- und TCA-Fällung noch einmal miteinander verglichen. Im Unterschied zur vorherigen Fällung wurde die vierfache Menge Ethanol genutzt. Es zeigten sich jetzt identische Bilder bei Verwendung der EtOH- bzw. TCA-Fällung. Da EtOH besser für die Weiterverarbeitung der Proteine geeignet ist, wurde die Fällung auf EtOH umgestellt. In einem zweiten Teilschritt, der sich durch die Umstellung der Färbung ergab, musste die Menge des zu fällenden Proteins verändert werden. Um vergleichbare Bilder zu erzielen, wurde die Proteinmenge in mehreren Tests von 80 µg auf 300 µg erhöht.

Ein großes Problem bei der Analyse von CSF-Proben ist der Albumin- und IgG-Gehalt. Das Albumin erzeugt auf den Gelen einige sehr große Spots, die sehr wahrscheinlich viele andere Proteine überlagern bzw. Proteine an einem ungehinderten Lauf ins Gel hindern. Als letzter Optimierungsschritt wurde deshalb versucht, die Albuminkonzentration in den Liquorproben zu reduzieren. Alle kommerziell erhältlichen Säulen zur Abtrennung von Albumin und IgG benutzen ein Sättigungsprinzip bei der Entfernung von Albumin und sind für Serum optimiert. Im Liquor kommt ungefähr ein Hundertstel der Albuminkonzentration vor im Vergleich zum Se-

rum. Dadurch ergab sich das Problem, dass bei Verwendung der Säulen diese nicht mit dem Albumin aus dem Liquor gesättigt waren und dadurch auch alle restlichen Proteine des Liquors binden. Somit war es nicht möglich, per 2D-Gelelektrophorese Proteine aufzutrennen, da alle Proteine des Liquors an die Säulen gebunden waren.

Des Weiteren wurde versucht mithilfe der HPLC eine Albuminabtrennung vorzunehmen. Hierzu wurde eine Multi-Affinitäts-Removal Säule für sechs High-Abundant Proteine (Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland) genutzt. Mithilfe dieser Säule wurde unter anderem Albumin aus dem Liquor entfernt. Das Problem bestand darin, dass es durch die zu verwendenden Salzpuffer es wieder zu einer verminderten Fokussierung kam. Eine Fällung sowie eine Umpufferung der Lösung führten aber nicht zum Erfolg, sodass die Albuminabtrennung verworfen wurde.

Aus allen diesen Vorarbeiten konnte folgendes Protokoll für eine zweidimensionale Auftrennung von CSF-Proteinen etabliert werden. Dieses Protokoll wurde für alle in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse genutzt.

Protokoll:

1. Trennung der Proteine nach Molekulargewicht (≥ 3kDa)
2. Fällung der gewünschten Proteinmenge mit dem vierfachen Volumen Ethanol
3. Lösen des Pellets in Rehydratisierungslösung (unter Punkt 2.2.3) und Einquellen der Streifen
4. IEF für 26 h (detailierte Beschreibung im Material und Methodenteil unter Punkt 2.2.3)

3.2. Etablierung der Färbung der Proteinspots

Zu Beginn der Experimente wurde die Silberfärbung nach Blum et al. (1987; modifiziert 1998) eingesetzt. Dabei ergab sich das Problem des Silberspiegels und einer unregelmäßigen Färbung der Gele. Silberspiegel bedeutet, dass Proteine, die in einer hohen Konzentration in den Liquorproben vertreten waren, zu stark gefärbt wurden, sodass der Mittelpunkt der Spots silbern glänzte und es zu keiner eindeutigen Auswertung mithilfe der verwendeten Software kommen konnte. Um konstantere Ergebnisse zu erzielen, wurde eine Färbekammer von BioRad verwendet. Mithilfe dieser Kammer war eine gleichmäßigere Färbung von 12 Gelen möglich und somit eine hohe Reproduzierbarkeit gewährleistet.

Um relevante Spots per Massenspektrometrie identifizieren zu können, musste die Silberfärbung modifiziert werden, da mit der bisher genutzten Färbung keine massenspektrometrischen Analysen möglich waren. Die Silberfärbung nach Blum et al. (1987; modifiziert 1998) führte zu einer starken Modifizierung der Proteine und ließ somit keine eindeutige Identifizierung zu. Eine Coomassiefärbung der Proteine konnte aufgrund der sehr hohen zu verwendeten Proteinmengen nicht genutzt werden, da nicht genügend CSF-Protein zur Verfügung standen. Daher wurde auf die Silberfärbung nach Vorum et al. (2001) umgestellt. Mithilfe dieser Färbung war eine Analyse der relevanten Spots mittels Massenspektrometrie möglich. Vorum und Mitabeiter (2001) verwenden weniger Formaldehyd im Laufe der einzelnen Färbungsschritte, somit ist die Modifizierung der Proteine weniger stark ausgeprägt und eine massenspektrometrische Analyse der Proteinspots möglich.

3.3. Auswertung mit Delta2D-Software

Die aus den einzelnen Gruppen resultierenden Gelbilde wurden zu einem Fusionsgelbild zusammengefasst. Die Fusionsbilder wurden anschließend untereinander verglichen. In die Auswertung wurden nur die Proteinspots einbezogen, die mindestens um den Faktor zwei erhöht bzw. um den Faktor 0,5 erniedrigt waren. Darüber hinaus erfolgte die Auswertung nur dann, wenn sich im relativen Spotvolumen zwischen Kontroll- und Patientengelen ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zeigte. Für letztere Analyse wurden die Spotvolumina der Einzelgele der Kontrollgruppe herangezogen, denen der Patientengruppe gegenübergestellt und der Students t-Test zur Prüfung auf einen signifikanten Unterschied angewendet. Die Auswertung wurde mittels Delta-2D-Software generiert. Eine detailliertere Erklärung ist im Material und Methodenteil unter Punkt 2.2.7 beschrieben.

3.4. Das Proteinmuster im Liquor cerebrospinalis von MS-Patienten

3.4.1. Verstärkt auftretende Proteine im MS-CSF

Mehrere Liquorproben von Kontroll- und MS-Patienten wurden für die nachfolgenden Untersuchungen vereinigt und entsprechend der Beschreibung im Methodenteil aufgearbeitet.

Es ergaben sich hierbei elf Kontroll-Gele (beispielhaft Abb. 8A) und neun MS-Gele (beispielhaft Abb. 8B). Diese Gele wurden mittels der Delta-2D-Software verglichen und das Fusionsgel ausgewertet.

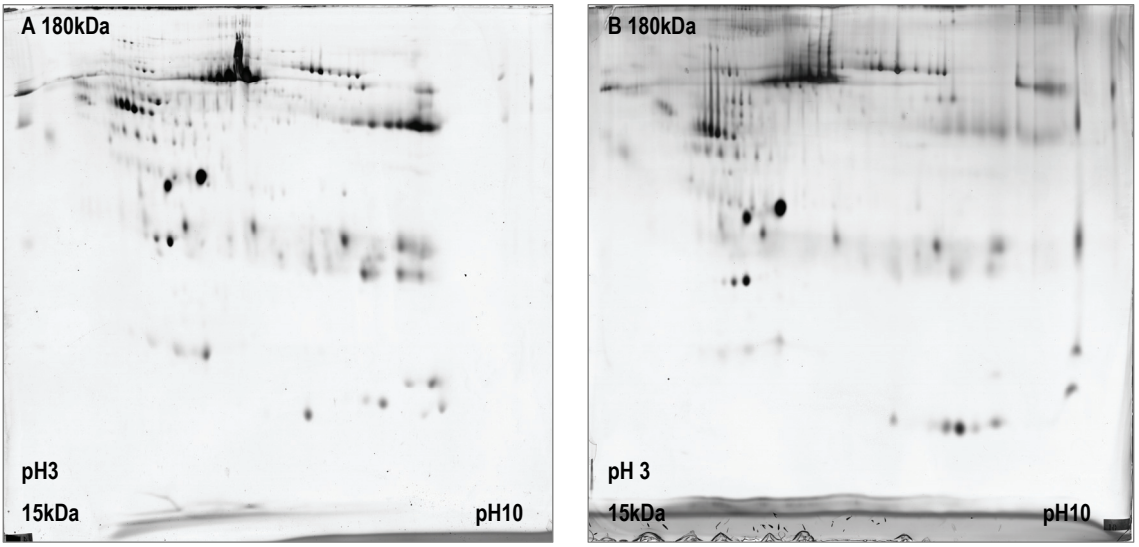

Abbildung 8 2D-Elektrophrese von Liquorproteinen;
(A) MS-Liquor, (B) Kontrollliquor; pH-Bereich 3 – 10 nl und Molekulargewicht 15 – 180 kDa

Insgesamt wurden sowohl auf den Kontroll- wie auch auf den MS-Gelen 562 Proteinspots detektiert. In Abb. 9 ist ein Fusionsgel dargestellt, auf dem alle Spots markiert wurden, welche bei MS bei den vorgegebenen Parametern (Auftreten = 100%, mindestens zweifache Expression) nachgewiesen wurden.

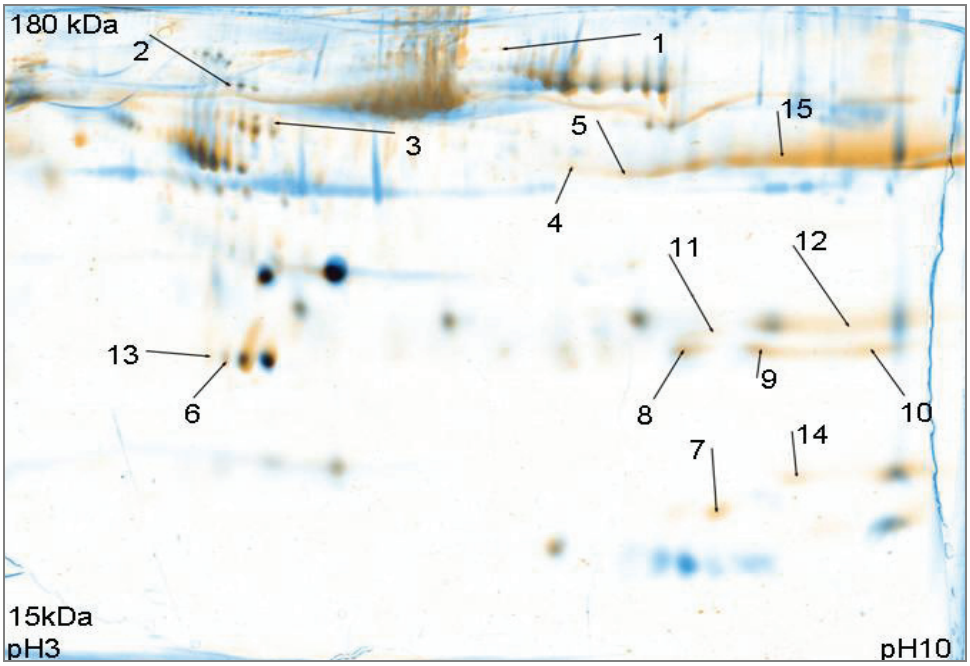

Abbildung 9 2D-Fusionsgel aus elf Einzelgelen von Kontroll- (blau) und neun Einzelgelen von MS-Liquor (rot). Hervorgehoben und nummeriert wurden die verstärkt bei MS auftretenden Proteinspots.

Wie in Abbildung 9 zu erkennen ist, treten die in ihrer Menge erhöhten Proteine über den gesamten pH-Bereich verstreut auf. Auch beim Molekulargewicht zeigen sie keine Häufung, der Bereich schwankt zwischen 30 – 120 kDa.

In Abbildung 10 werden die Unterschiede zwischen den in Abbildung 9 abgebildeten Spots dargestellt. Die Erhöhung der sogenannten MS-Spots schwankt zwischen dem Faktor 2 – 39. Dargestellt und ausgewertet wurden nur die Spots, die einen signifikanten Unterschied in der Analyse aller Spots zeigten.

Deutlich ist bei Spot 8 und 14 zu erkennen, dass beide Spots kaum in den Kontrollen nachweisbar waren im Vergleich zur MS. Alle anderen Spots traten dagegen auch deutlich in den Kontrollen auf.

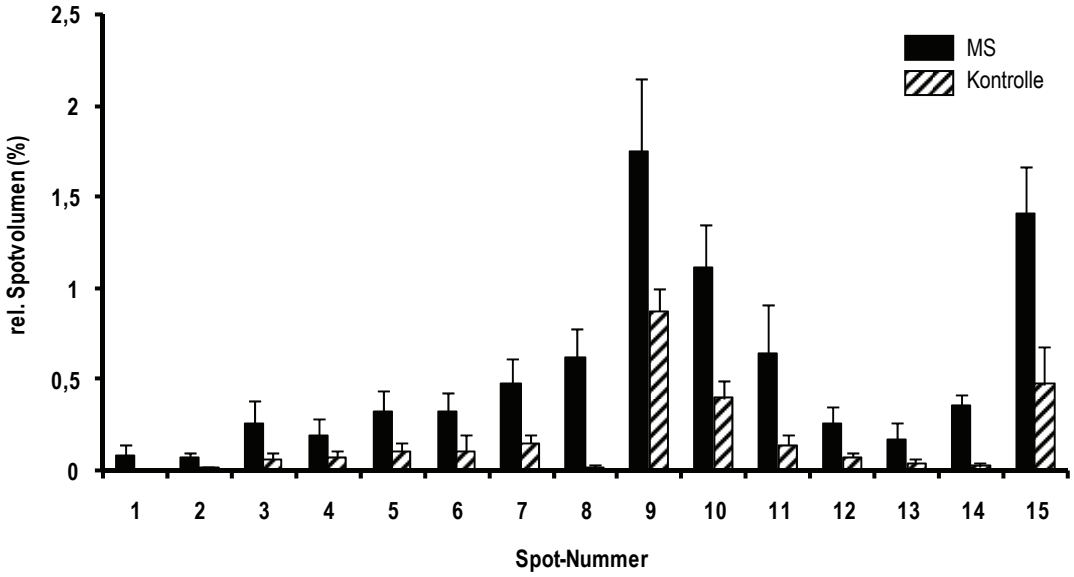

Abbildung 10 Quantitative Analyse der bei MS verstärkt auftretenden Proteinspots. Angegeben wird der Mittelwert des relativen Spotvolumens mit der dazugehörigen Standardabweichung aus den elf unabhängigen Einzelgelen der Kontrolle und den neun unabhängigen Einzelgelen der MS. Die ausgefüllten Balken zeigen den Mittelwert des relativen Spotvolumens mit der Standardabweichung der Spots von MS-CSF. Die schraffierten Balken stellen das relative Spotvolumen mit der Standardabweichung der Kontrollen dar.

In Tabelle 2 sind die verstärkt auftretenden Proteine mit ihrem pH-Wert, ihrem Molekulargewicht und der jeweiligen Proteinmengenerhöhung im Vergleich zur Kontrolle aufgeführt, die mithilfe der Delta-2D-Software ermittelt wurden. Anschließend wurde anhand des pH-Wertes und des Molekulargewichts eine theoretische Zuordnung von möglichen Proteinen zu den identifizierten Proteinspots durchgeführt.

Eine genaue theoretische Zuordnung des pH-Bereiches ist nicht möglich, da nichtlineare IPG-Streifen verwendet wurden. Das bedeutet, wenn eine große Anzahl Proteine mit vielen sauren Aminosäuren auftritt, verschiebt sich der gut fokussierte Teil zum sauren Bereich, wenn aber die basischen Aminosäuren überwiegen, erfolgt eine deutlichere Fokussierung im basischen Bereich. Diese Streifen wurden verwendet, weil unbekannt war, in welchem Bereich die meisten Proteine zu erwarten waren und damit die beste Fokussierung erhalten wurde.

Die theoretische Zuordnung war leider nur für einige Proteine möglich. Die meisten Spots zeigten bei Verwendung der Expasy-Analyse-Datenbank keine Lageübereinstimmung. Daher wurden in den meisten Fällen nur die Größe und der pH-Wert zugeordnet. Eine theoretische Zuordnung war für Spot 1 (Complement Faktor B), Spot 2 (Ceruloplasmin), Spot 3

(Alpha-1-B-Glykoprotein), Spot 6 (Apolipoprotein A-I) sowie Spot 13 (Apolipoprotein A-I) möglich. Nach der pH-Wert und der Molekulargewichtauswertung konnte festgestellt werden, dass es sich bei Spot 5 und 15 aller Wahrscheinlichkeit nach um denselben Spot handelt.

Spotnr.	Theoretischer Name	pI-Wert	Molekulargewicht kDa	Erhöhungs-faktor
1	Complement Faktor B	6,81	83,36	21,3
2	Ceruloplasmin	5,51	77,64	5,3
3	Alpha-1-B-Glykoprotein	5,64	65,03	4,2
4		6,82	49,95	2,8
5		7,04	48,23	3,3
6	Apolipoprotein AI	5,05	38,45	3,2
7		6,6	11,44	3,2
8		6,86	22,64	39
9		7,17	22,05	2
10		7,68	21,23	2,8
11		7,03	24,34	4,7
12		7,63	24,14	3,5
13	Apolipoprotein AI	4,99	34,63	4,2
14		7,04	12,77	15,9
15	= 5	7,77	48,67	3

Tabelle 1 Theoretische Auswertung der bei MS verstärkt auftretenden Proteinspots. Aufgelistet sind Spotnummer, theoretischer Name, pH-Wert und Molekulargewicht (MW). Des Weiteren ist der Expressionsunterschied zur Kontrolle gezeigt.

Um die theoretischen Daten zu bestätigen und die noch nicht identifizierten Proteine zu bestimmen, wurden für alle Proteinspots mindestens zwei unabhängige MALDI-TOF Analysen durchgeführt. Beide Analysen brachten reproduzierbare Ergebnisse. So war es möglich, alle Proteine zu identifizieren. Mithilfe dieser Methode konnten die theoretischen Daten zu einem großen Teil bestätigt werden, wie man an Spot 1, 6 und 13 erkennen kann. Spot 2 (Theorie: Ceruloplasmin) und Spot 3 (Theorie: Alpha-1B-Glykoprotein) brachten in der massenspektrometrischen Analyse andere Ergebnisse. Spot 2 wurde als Alpha-1-B-Glykoprotein identifiziert sowie Spot 3 als Ig Alpha-1-Ketten C Region. In vielen Analysen zeigten sich Abweichungen bei den Molekulargewichtsangaben in der Tabelle zu den Größen auf dem Gel. Die in der Tabelle 2 angegebenen Daten entsprechen den massenspektrometrischen Analysen.

Spotnr.	Name	pI-Wert	Molekulargewicht kDa	Erhöhungs-faktor
1	Complement Faktor B Prekursor	6,81	85,47	21,3
2	Alpha-1-B-Glykoprotein	5,51	54,23	5,3
3	Ig-alpha-1 Kette C Region	5,64	52,92	4,2
4	Beta-2-Glykoprotein 1 Prekursor	6,82	38,27	2,8
5	Ig-gamma-1 Kette C Region	7,04	11,60	3,3
6	Apolipoprotein A-I Prekursor (Apo-AI)	5,05	30,75	3,2
7	Hämoglobin Untereinheit Beta	6,6	15,24	3,2
8	Ig-kappa Kette C Region	6,86	11,60	39
9	Ig-kappa Kette C Region	7,17	11,60	2
10	Ig-kappa Kette C Region	7,68	11,60	2,8
11	Ig-lambda Kette C Region	7,03	11,60	4,7
12	Prostaglandin-H2 D-Isomerase Prekursor	7,63	21,01	3,5
13	Apolipoprotein A-I Prekursor	4,99	30,75	4,2
14	Cystatin C Prekursor	7,04	15,78	15,9
15	Ig-gamma-1 Kette C Region	7,77	11,60	3

Tabelle 2 Massenspektrometrische Analyse der bei MS verstärkt auftretenden Proteinspots. Aufgelistet sind Spotnummer, Name (laut Expasy) und pH-Wert und MW-Wert laut des genutzten Fusionsgels

3.4.2. Proteine mit verminderter Konzentration im MS-Liquor

Abbildung 11 zeigt diejenigen Proteinspots, die laut Delta-2D-Analyse der Einzelgele vermindert in den MS-Liquors unter den vorgegebenen Parametern nachgewiesen wurden. Diese detektierten Spots liegen vorrangig in den pH-Bereichen von pH 4 – 5, pH 8 – 10 und den Molekulargewichtsbereichen von 15 – 20 kDa und 30 – 60 kDa.

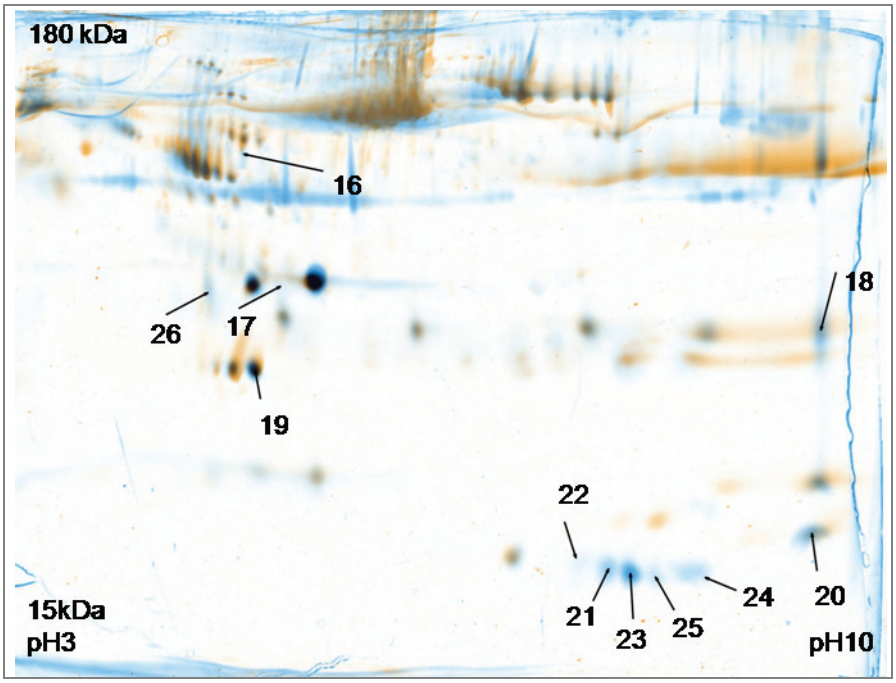

Abbildung 11 2D-Fusionsgel aus elf Einzelgellen von Kontroll- (blau) und neun Einzelgelen von MS-Liquors (rot). Hervorgehoben und nummeriert wurden die vermindert bei der MS auftretenden Proteinspots

In Abbildung 12 werden die Unterschiede zwischen den in Abbildung 11 abgebildeten Spots dargestellt. Alle sogenannten MS-Spots treten mindestens um die Hälfte erniedrigt im Vergleich zur Kontrolle auf und zeigen signifikante Unterschiede zur Kontrolle. Die Verminderung der „MS-Spots“ schwankt zwischen dem Faktor 0,01 – 0,48.

Obwohl bei Spot 19 eine recht große Streuung der Werte aus den Einzel-MS-Gelen auftritt, ist immer noch klar erkennbar, dass er in der Kontrolle deutlich überwiegt. Ebenfalls bei den Spots 21 – 25 ist ersichtlich, dass sie in den MS-Liquors deutlich geringer auftraten.

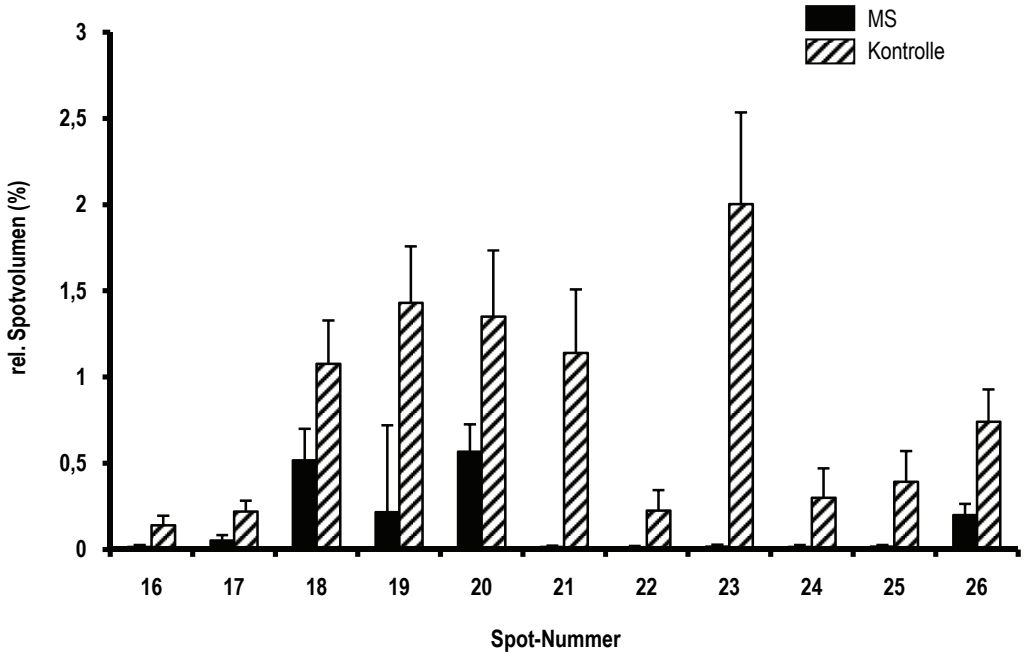

Abbildung 12 Quantitative Analyse der bei MS vermindert auftretenden Proteinspots. Angegeben wird der Mittelwert des relativen Spotvolumens mit der dazugehörigen Standardabweichung aus den elf unabhängigen Einzelgelen der Kontrolle und den neun unabhängigen Einzelgelen der MS. Die ausgefüllten Balken zeigen den Mittelwert des relativen Spotvolumens mit der Standardabweichung der Spots von MS-CSF. Die schraffierten Balken stellen das relative Spotvolumen mit der Standardabweichung der Kontrollen dar.

In Tabelle 4 sind die theoretischen Daten der relevanten Proteinspots dargestellt, die mithilfe der Delta-2D-Software gefunden wurden. Die dazu passenden Proteinnamen wurden in der Literatur recherchiert. Folgende Proteine konnten mit dieser theoretischen Zuordnung identifiziert werden: Spot 16 (Alpha-1B-Glykoprotein), Spot 17 und 26 (Transthyretin), Spot 20 (CystatinC) sowie Spot 21 – 25 (Hämoglobin). Die mehrfache Zuordnung bei einigen Spots ergab sich durch den sehr eng beieinander liegenden pH-Wert und das sehr ähnliche Molekulargewicht.

Spotnr.	Theoretischer Name	pH-Wert	Molekulargewicht kDa	Erhöhungs-faktor
16	Alpha-1B-Glykoprotein	5,48	59,58	0,1
17	Transthyretin	5,33	33,91	0,2
18		7,87	24,05	0,48
19		5,01	24,30	0,16
20	Cystatin C	7,35	10,42	0,42
21	Hämoglobin	6,24	9,59	0,01
22		6,11	10,13	0,06
23		6,36	9,39	0,01
24		6,68	9,27	0,05
25		6,46	9,23	0,04
26	Transthyretin	4,98	33,91	0,3

Tabelle 3 Theoretische Auswertung der bei MS vermindert auftretenden Proteinspots. Aufgelistet sind Spotnummer, theoretischer Name, pH-Wert und MW. Des Weiteren ist der Expressionsunterschied zur Kontrolle gezeigt.

Die relevanten Spots laut Delta-2D-Software wurden anschließend massenspektrometrisch analysiert, um ihre genaue Identität zu bestimmen. Eine Übersicht hierzu gibt Tabelle 5.

Einige theoretische Zuordnungen konnten mithilfe der MALDI-TOF Analyse wieder bestätigt werden. Es wurde hier sehr zahlreich Hämoglobin (Spot 20 – 25) identifiziert. Des Weiteren konnte die Prostaglandin-H2 D-Isomerase (Spot 17 und 18) nachgewiesen werden, ein im Zentralnervensystem und Gehirn vorkommendes Protein. Weiterhin konnte Spot 26 mit Transthyretin bestätigt werden. Außerdem wurde Spot 16 als Antithrombin-III identifiziert, diese entsprach nicht der theoretischen Zuordnung (Alpha-1B-Glykoprotein).

Spotnr.	Proteinname	pH-Wert	Molekulargewicht kDa	Erhöhungs-faktor
16	Antithrombin-III Prekur-sor (ATIII)	5,48	52,56	0,1
17	Prostaglandin-H2 D-Isomerase Prekursor	5,33	15,87	0,2
18	Prostaglandin-H2 D-Isomerase Prekursor	7,87	21,01	0,48
19	Apolipoprotein A-I Prekursor (Apo-AI)	5,01	30,75	0,16
20	Hämoglobin Untereinheit Alpha	7,35	15,24	0,42
21	Hämoglobin Untereinheit Alpha	6,24	15,24	0,01
22	Hämoglobin Untereinheit Alpha	6,11	15,98	0,06
23	Hämoglobin Untereinheit Alpha	6,36	15,98	0,01
24	Hämoglobin Untereinheit Alpha	6,68	15,98	0,05
25	Hämoglobin Untereinheit Alpha	6,46	15,98	0,04
26	Transthyretin Prekursor	4,98	15,87	0,3

Tabelle 4 Massenspektrometische Analyse der bei MS vermindert auftretenden Proteinspots. Aufgelistet sind Spotnummer, Name (laut Expasy) und pH-Wert und MW-Wert laut des genutzten Fusionsgels.

3.5. Das Proteinmuster im Liquor cerebrospinalis von GBS-Patienten

3.5.1. Verstärkt auftretende Proteine im GBS-CSF

Auch beim GBS wurden Unterschiede im Proteinmuster zwischen Kontrollen und Patienten des Liquors beobachtet.

Für diese Analyse wurden zunächst zehn GBS-Patienten und zehn Kontrollen in vier Gruppen eingeteilt und verblindet. Jeweils fünf Proben aus Gruppe 1 und Gruppe 2 wurden aufgearbeitet und anschließend nochmals jeweils fünf Proben aus Gruppe 3 und Gruppe 4. So erhielt man pro Gruppe sechs Gele. Mithilfe der Gelmuster und der späteren Entblindung der Daten wurde aufgeklärt, dass sich hinter den Gruppen 1 und 4 die GBS-Patienten und hinter den Gruppen 2 und 3 die Kontrollen verbargen.

Von den Kontrollen wurden nur neun Gele in die Auswertung einbezogen. Auf den anderen drei Gelen war eine zu ungenaue Fokussierung vorhanden, so konnte keine eindeutige Zuordnung der Spots erfolgen. Bei Einbeziehung aller zwölf Gele wäre es zu einer zu großen Verfälschung des Gesamtergebnisses gekommen.

So gingen insgesamt neun Kontroll-Gele (Abb.13a) und zwölf GBS-Gele (Abb.13b) in die Wertung ein. Auf dem Fusionsgel konnten insgesamt 362 Spots detektiert wurden.

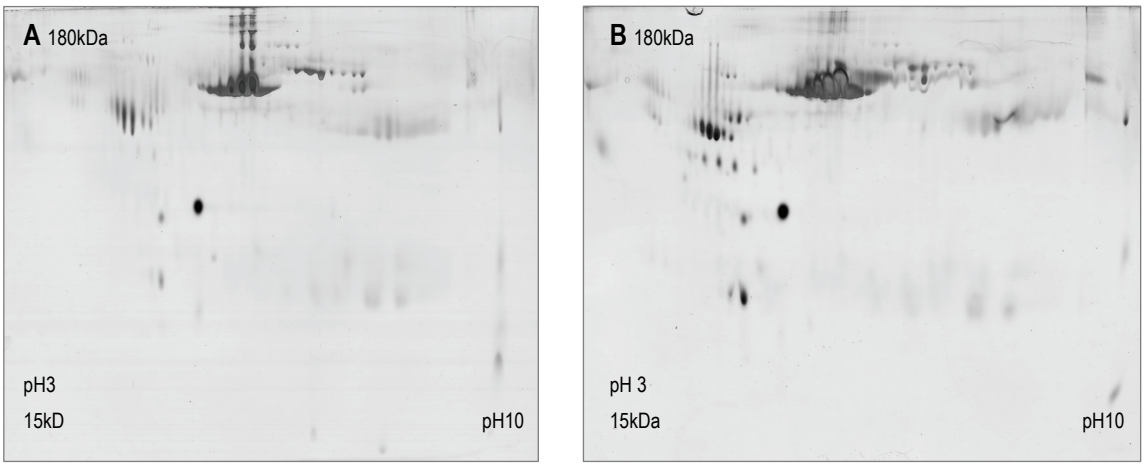

Abbildung 13 2D-Elektrophrese von Liquorproteinen;
(A) Kontrollliquor, (B) GBS-Liquor; pH-Bereich 3 – 10 nl und Molekulargewicht 15 – 180 kDa

Nach der Delta-2D-Auswertung ergaben sich vier Spots, die verstärkt im GBS-Liquor auftraten. Diese verstärkten Spots lagen im pH-Bereich von 4 bis 6 und besitzen Molekulargewichte zwischen 50 – 120 kDa (Abb. 14).

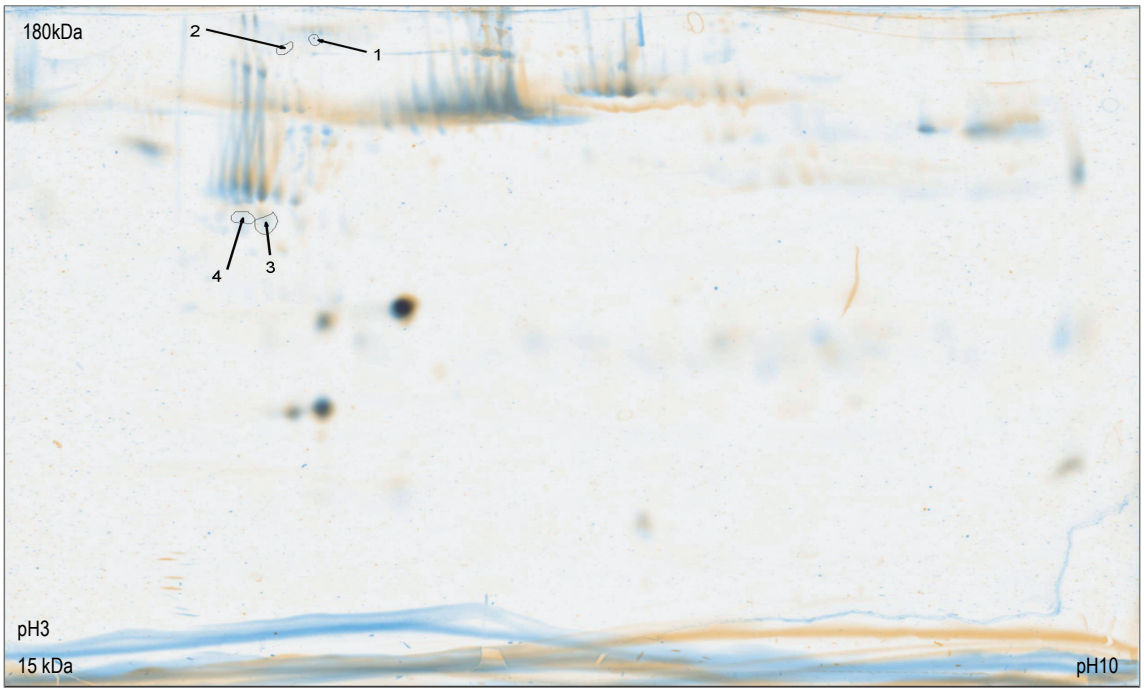

Abbildung 14 2D-Fusionsgel aus 9 Einzelgelen von Kontroll- (rot) und 12 Einzelgelen von GBS-Liquores (blau). Hervorgehoben und nummeriert wurden die verstärkt bei GBS auftretenden Proteinspots.

In der nächsten Abbildung werden die laut Analyse als verstärkt auftretende GBS-Proteine grafisch dargestellt. Die Unterschiede errechnen sich aus den neun bzw. zwölf verwendeten Einzelgelen. Die Erhöhung der Proteinspots bei den GBS-Patienten schwankt zwischen dem Faktor 2,6 – 7,5. Bei Spot 3 ist die deutlichste Erhöhung zu erkennen. Die relativen Spotvolumina von Spot 1 und 2 sind annähernd gleich und zeigen eine ähnliche Erhöhung bei GBS-Patienten im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 15).

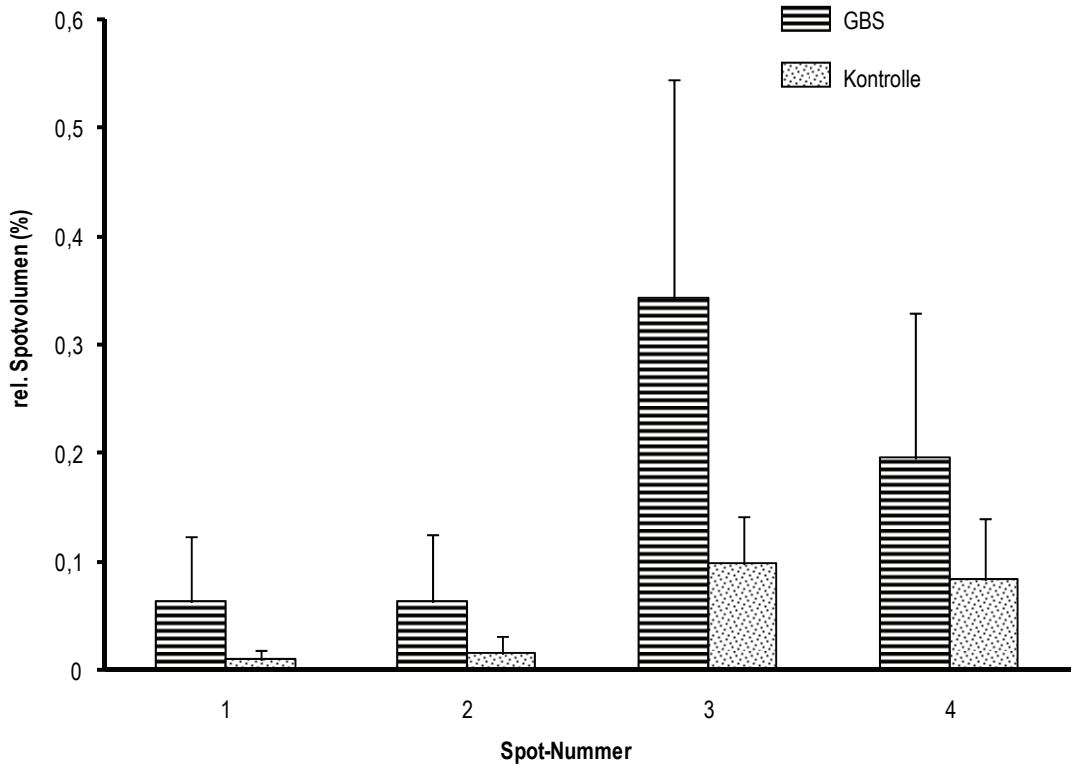

Abbildung 15 Quantitative Analyse der beim GBS verstärkt auftretenden Spots; Angegeben wird der Mittelwert des relativen Spotvolumens mit der dazugehörigen Standardabweichung aus den unabhängigen Einzelgelen.

Wie man in Tabelle 6 sieht, scheint es sich vermutlich um die gleichen Proteine bei Spot 1 und 2 (Ceruloplasmin), aber auch 3 und 4 (Haptoglobin) zu handeln. Die theoretische ermittelte Größe und der pH-Wert sowie der durchschnittliche Erhöhungsfaktor wurden mithilfe der Delta-2D-Software ermittelt.

Spotnr.	Theoretische Namen	pH-Wert	Molekulargewicht kDa	Erhöhungs-faktor
1	Ceruloplasmin	5,51	110,1	7,46
2	Ceruloplasmin	4,81	10,98	4,46
3	Haptoglobin	5,38	48,23	3,5
4	Haptoglobin	5,28	48,24	2,6

Tabelle 5 Theoretische Auswertung der bei GBS verstärkt auftretenden Proteinspots. Aufgelistet sind Spotnummer, theoretischer Name, pH-Wert und MW. Des Weiteren ist der Unterschied zur Kontrolle gezeigt.

Die laut Delta2D relevanten Spots wurden anschließend massenspektrometrisch analysiert, um ihre genaue Identität zu bestimmen. Dabei ergaben sich die in Tabelle 7 aufgezählten Proteine. Alle Spots erhielten eine zweimalige Identifizierung und Bestätigung. Mittels MALDI-TOF Analyse konnten die theoretischen Daten bestätigt werden.

Spotnr.	Name	pH-Wert	Molekulargewicht kDa	Erhöhungs-faktor
1	Ceruloplasmin	5,5	122,3	7,46
2	Ceruloplasmin	5,5	122,3	4,46
3	Haptoglobin	6,5	45,01	3,5
4	Haptoglobin	6,5	45,01	2,6

Tabelle 6 Massenspektrometrische Analyse der bei GBS verstärkt auftretenden Proteinspots. Aufgelistet sind Spotnummer, Name (laut Expasy) und pH-Wert und MW-Wert laut den verwendeten Fusionsgelen.

3.5.2. Vermindert auftretende Proteine im GBS-CSF

Vermindert konnten beim GBS 5 Spots detektiert werden. Diese Proteinspots sind auf dem 2D-Gelbild breit gestreut und liegen im pH-Bereich von 5 bis 10 und bei einem Molekulargewicht von 15 bis 70 kDa (Abb.16).

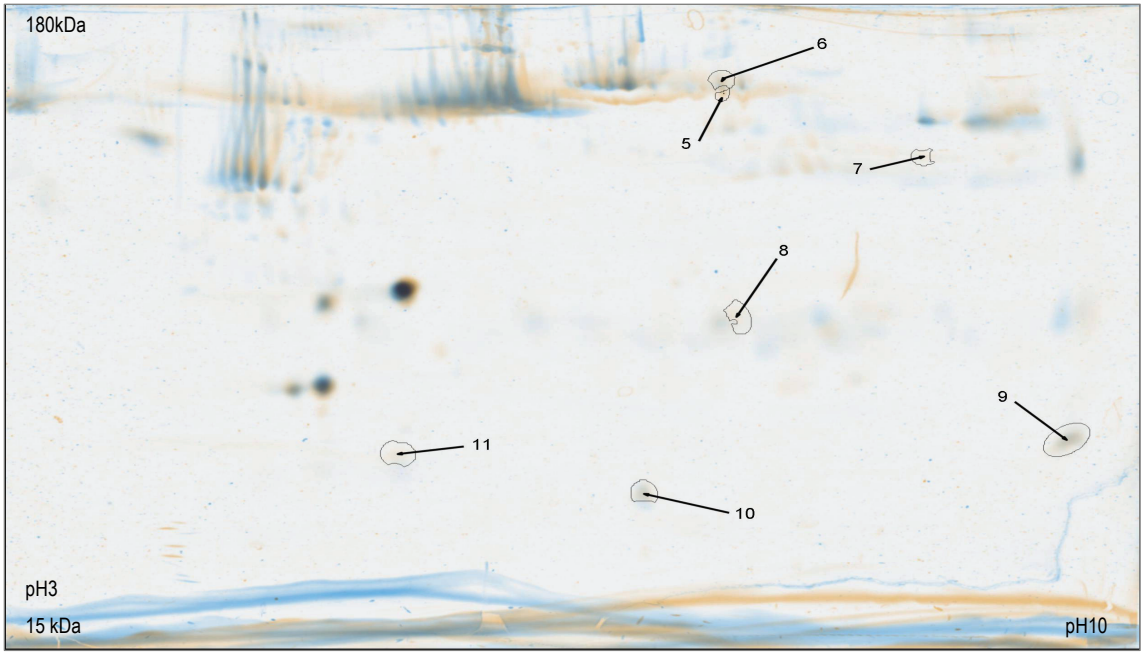

Abbildung 16 2D-Fusionsgel aus neun Einzelgelen von Kontroll- (rot) und zwölf Einzelgelen von GBS-Liquors (blau). Hervorgehoben und nummeriert wurden die vermindert bei GBS auftretenden Proteinspots.

Die in Abbildung 17 gezeigten Daten stellen den Mittelwert (errechnet aus der Anzahl der genutzten Gele) des Spots und die dazugehörige Standardabweichung dar. Es handelt sich hier um GBS-Spots, welche laut Analyse um den Faktor 0,31 – 0,5 im Vergleich zur Kontrolle erniedrigt sind. Weiterhin ist zu erkennen, dass Spot 9 am deutlichsten vermindert ist.

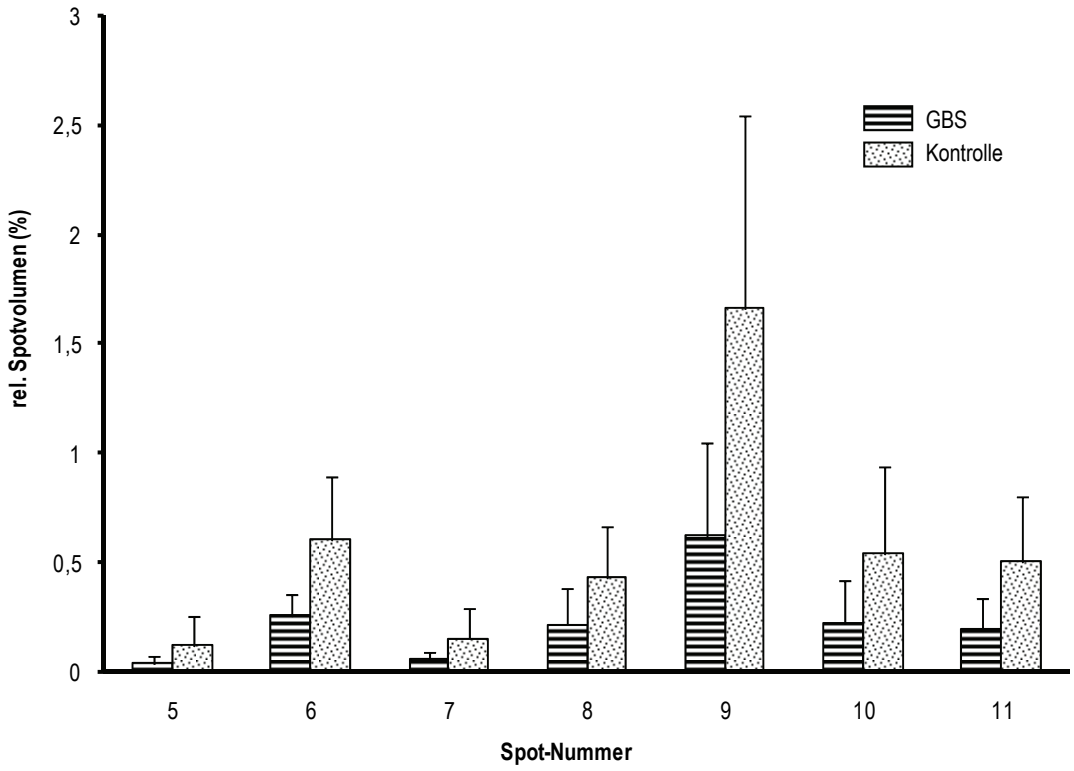

Abbildung 17 Quantitative Analyse der im GBS-CSF vermindert auftretenden Spots. Angegeben wird der Mittelwert des relativen Spotvolumens mit der dazugehörigen Standardabweichung aus den unabhängigen Einzelgelen.

Eine theoretische Zuordnung der verminderten Spots erfolgte nur in wenigen Fällen. Bei einigen der verminderten Proteinspots war es mit Expasy nicht möglich, eine Lageübereinstimmung abzugleichen. Daher wurde in einigen Fällen nur die Größe und der pH-Wert sowie der „Erhöhungsfaktor“ mithilfe der Delta-2D-Software zugeordnet (Tab. 8).

Spotnr.	Theoretischer Name	pH-Wert	Molekulargewicht kDa	Erhöhungs-faktor
5	Serotransferrin	7,03	77,61	0,31
6	Serotransferrin	7,03	77,64	0,42
7		7,77	48,67	0,33
8		7,15	22,63	0,5
9	Cystatin C	7,35	10,98	0,37
10		6,81	10,13	0,41
11	Haptoglobin	5,33	10,11	0,37

Tabelle 7 Theoretische Auswertung der bei GBS vermindert auftretenden Proteinspots. Aufgelistet sind Spotnummer, theoretischer Name, pH-Wert und MW. Des Weiteren ist der Unterschied zur Kontrolle gezeigt

In Tabelle 9 sind die massenspektrometrischen Daten der verminderten GBS-Spots aufgeführt. In der MALDI-TOF Analyse wurde die theoretische Zuordnung von Spot 5 und 6 (Serotransferrin), aber auch von Spot 9 (Cystatin C) bestätigt. Bei Spot 11 handelt es sich nicht um Haptoglobin, sondern um Beta-2-Mikroglobulin. Des Weiteren wurden folgende Proteine nachgewiesen: IgG-1 (konstante Region), Prostaglandin-H_2D-Isomerase und Transthyretin.

Spotnr.	Proteinname	pH-Wert	Molekulargewicht kDa	Erhöhungs-faktor
5	Serotransferrin	7,1266	77,5	0,31
6	Serotransferrin	7,1266	77,5	0,42
7	Ig Gamma-1-Ketten-C-Region	8,3079	36,66	0,33
8	Prostaglandin H_2D-Isomerase	7,9408	21,7	0,5
9	Cystatin C	8,9508	15,14	0,37
10	Transthyretin	5,5753	15,91	0,41
11	Beta-2-Mikrog*l*obulin	6,51	13,47	0,37

Tabelle 8 Massenspektrometrische Auswertung der bei GBS vermindert auftretenden Proteinspots. Aufgelistet sind Spotnummer, theoretischer Name, pH-Wert und MW laut Espasy-Datenbank.

3.5.3. Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten bei den Änderungen im Proteinmuster des CSF zwischen MS und GBS

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war die Suche nach Markerproteinen für eine schnellere und genauere Diagnose von neurologischen Erkrankungen wie GBS und MS. Daher wurden die MS- und GBS-Ergebnisse der 2D-Elektrophorese miteinander verglichen, um krankheitsrelvante Proteine bestimmen zu können.

Als MS spezifische Änderungen ergaben sich:

1. Complement Faktor B
2. Alpha-1B-Glykoprotein, Hämoglobin und Apolipoprotein-AI nur bei den Analysen der MS-Liquors verstärkt als auch vermindert nachgewiesen werden.
3. Antithrombin III nur bei den erniedrigten MS-Proteinen
4. ß2-Glykoprotein nur bei den erniedrigten MS-Proteinen

Als GBS spezifische Änderungen im Proteinmuster ergaben sich:

1. Erniedrigte Proteinmengen für ß2-Mikroglobulin und Serotransferrin
2. Erhöhte Proteinmengen für Ceruloplamsin und Haproglobin

In den Analysen zeigte sich, dass die Prostaglandin H_2D-Isomerase (PH_2D) sowohl beim MS als auch beim GBS vermindert vorkommt. Beim GBS war sie um die Hälfte vermindert und bei MS auf den Faktor 0,2 jeweils im Vergleich zur Kontrolle. Es schwankt bei den Analysen zwischen dem pH-Wert 5 – 10, eine genaue Zuordnung ist aufgrund der nicht-linearen IPG-Streifen nicht möglich. Beim GBS wurde der verminderte PH_2D-Proteinspot bei einem pH-Wert von ungefähr 6.5 detektiert, wohingegen bei der MS der verminderte Spot bei pH-Werten von ungefähr 4 und 10 detektiert wurde. Alle anderen, der PH_2D zugeordneten Proteinspots waren sowohl bei GBS als auch MS unverändert.

Ig-Gamma-1-Kette-C-Region wurde beim GBS-CSF und MS-CSF detektiert, bei der MS lag das Protein erhöht vor und zwar um das 3,3-fache wie bei der Kontrolle, beim GBS dagegen war das Protein vermindert auf das 0,33-fache der Kontrolle. Somit unterschieden sie sich um den Faktor 10. Im Gel traten beide Spots im selben Molekulargewichts und pH-Bereich auf.

Transthyretin wird sowohl bei MS als auch bei GBS vermindert detektiert. Es treten aber Unterschiede beim pI-Wert (MS = 4; GBS = 6) und der Größe (MS = 35 kDa; GBS = 15 kDa) auf.

Cystatin C wurde in der MS erhöht (Spot 14) und im GBS vermindert (Spot 9) detektiert. Es treten hierbei Unterschiede im pI-Wert (MS = 9; GBS = 10), aber nicht im Molekulargewicht auf.

3.6. Western Blot von CSF-Proteinen

Für die routinemäßige Diagnostik ist die 2D-Gelelektrophorese von Liquorproteinen nicht geeignet. Aus diesem Grunde sollte mittels 1D-Elektrophorese und Western Blot geprüft werden, ob die quantitativen Änderungen im Proteinmuster reproduzierbar sind. Es konnten keine GBS-Proben für den Western Blot genutzt werden, da keine weiteren Liquorproben zur Verfügung standen. Auch konnten die 1D-Western Blot-Analysen aufgrund von Probenmangel nur einmal durchgeführt werden.

Als erstes wurde Cystatin C untersucht, welches 15,9-fach verstärkt bei MS-Patienten und 0,37-fach vermindert beim GBS im Vergleich zur Kontrolle vorkommt. Mittels 1D-Gelelektrophorese, Blotten auf eine Membran und anschließender Antikörperinkubation wurde der Vergleich zwischen MS- und Kontrollliquorproben und zwei weiteren neurologischen Erkrankungen durchgeführt. Für den Western Blot wurden jeweils drei Proben der MS, Kontrolle, Virusmeningitis und Neuroborreliose gepoolt, nach Größe aufgetrennt und anschließend je 30 µg Protein aufgetragen. Bei den Western Blot Analysen konnte eine immunoreaktive Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 13 kDa detektiert werden (Abb. 18). Als Beladungsprobe wurde die gleiche Membran im Anschluss mit einem Antikörper gegen Aktin (Clone C4, interagiert mit allen sechs bekannten Isoformen des Aktins) inkubiert. Dabei konnte eine positive Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 45 kDa nachgewiesen werden.

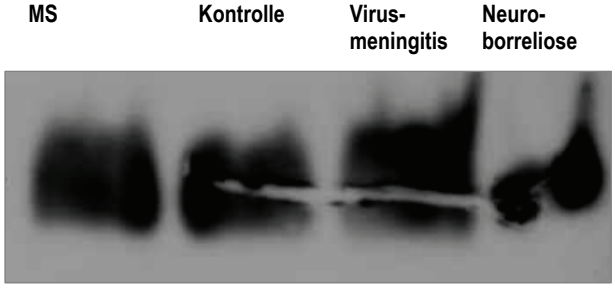

Abbildung 18: Western Blot zur Detektion von Cystatin C nach 1D-Gelelektrophorese von CSF-Proteinen der folgenden neurologischen Erkrankungen: MS, KO, Virusmeningitis und Neuroborreliose. A 1D-Gel mit der Bande des polyklonalen Antikörpers Cystatin C; B: 1D-Gel mit Actin als Kontrolle.

Für eine anschließende quantitative Auswertung dieser immunoreaktiven Banden wurde das Programm Gelscan 5.2 (Serva) verwendet und die relative Proteinmenge zur Proteinmenge von Aktin korreliert. Hierbei wurde der jeweilige Hintergrund der Membran abgezogen, sodass gewährleistet werden konnte, dass nur die Bandenstärke ausgewertet wurde.

Die quantitative Auswertung (Abb. 19) ergab das geringste Vorkommen von Cystatin C in der MS-Probe. Bei den anderen neurologischen Erkrankungen zeigte sich keine nennenswerte Änderung der Cystatin-Proteinmenge im Vergleich zu Liquor von gesunden Probanden.

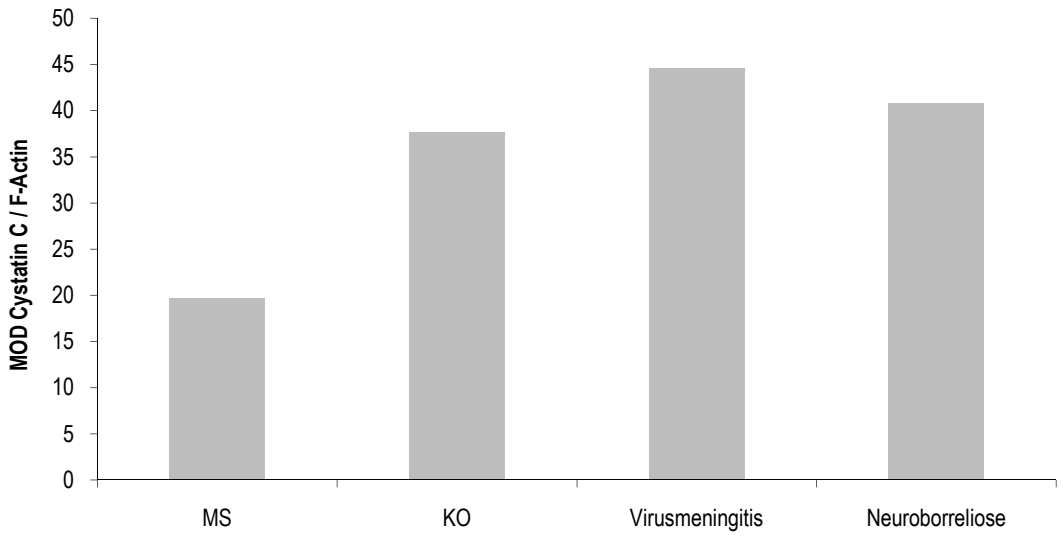

Abbildung 19 Quantitative Auswertung der Cystatin C 1D-Western Blots von jeweils 3 vereinigten Liquorproben unterschiedlicher neurologischer Erkrankungen. (MOD = mittlere optische Dichte)

Ein weiteres untersuchtes Protein war Antithrombin III, welches nur bei der MS um den Faktor 0,1 im 2D-Gel vermindert war. Die Durchführung des Blotes wurde wie unter Cystatin C beschrieben durchgeführt. Es konnte eine einzige immunoreaktive Proteinbande bei einem Molekulargewicht von ca. 53 kDa detektiert werden (Abb. 20). Für eine anschließende quantitative Auswertung dieser immunoreaktiven Bande wurde auch hier gegen Aktin korreliert.

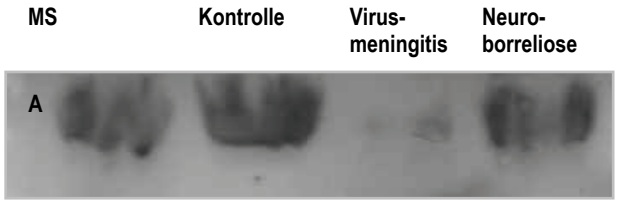

Abbildung 20 Western Blot zur Detektion von Antithrombin III nach 1D-Gelelektrophorese von CSF-Proteinen der folgenden neurologischen Erkrankungen: MS, KO, Virusmeningitis und Neuroborreliose. A 1D-Gel mit der Bande des Antikörpers Antithrombin III bei den 4 neurologischen Erkrankungen; B 1D-Gel mit Actin als Kontrolle

In der quantitativen Auswertung des Antithrombin III Western Blots (Abb. 21) ist deutlich zu erkennen, dass Antithrombin III am geringsten in der MS detektiert werden konnte. In der Virusmeningitis ist fast kein Nachweis möglich, wohingegen eine deutliche Antithrombin III-Bande im Liquor der Neuroborrelioseprobe erkennbar ist (Abb. 21). Somit konnte das Ergebnis der 2D-Elektrophorese der CSF-Proteine bestätigt werden (Abb. 11, Tab. 4).

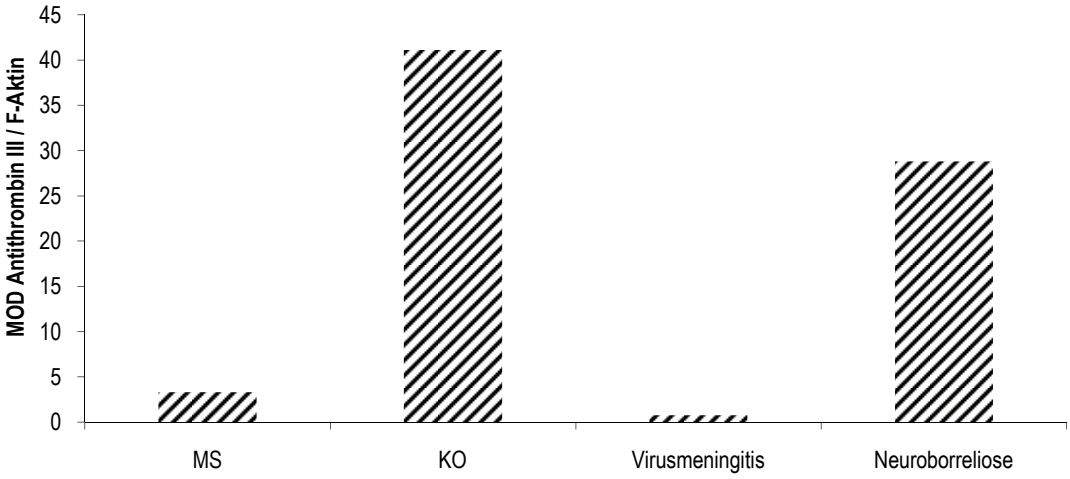

Abbildung 21 Quantitative Auswertung der Antithrombin III 1D-Western Blots von jeweils 3 vereinigten Liquorproben unterschiedlicher neurologischer Erkrankungen. (MOD = mittlere optische Dichte)

Transthyretin wurde bei den 2D-MS- und GBS-Analysen jeweils in der Kontrolle erhöht detektiert. Auch hier wurde der Western Blot nach der oben beschriebenen Prozedur durchgeführt und eine Doppelbande bei 14 bzw.19 kDa detektiert, wobei es sich bei der 19 kDa Bande um die spezifische Bande handelte (Abb. nicht gezeigt). Es zeigte sich bei der quantitativen Analyse im 1D-Gele mit MS, KO, Virusmeningitis und Neuroborreliose, dass Transthyretin in der Kontrolle am meisten detektiert werden konnte (Abb. 22).

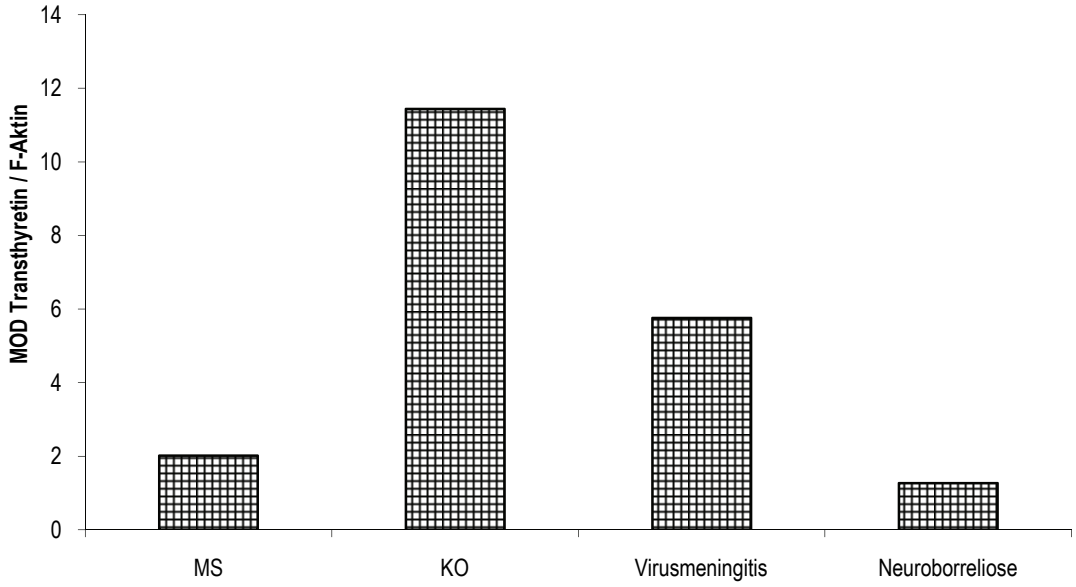

Abbildung 22 Quantitative Auswertung der Transthyretin 1D-Western Blots von jeweils 3 vereinigten Liquorproben unterschiedlicher neurologischer Erkrankungen. (MOD = mittlere optische Dichte)

3.7. Fluorimetrischer Nachweis des Enzyms Glutaminylcyklase

Um zu überprüfen, ob das Enzym Glutaminylcyklase wirklich eine Rolle im Liquor spielt, wurde der folgende fluorimetrische Assay durchgeführt. Mit Hilfe des von Schilling et al. (2002) entwickelten Assays konnte die Reaktivität der Glutaminylzyklase (QC) durch Freisetzung von Aminocumarin (AMC) im Liquor gemessen werden. Dazu wird den Liquorproben das Substrat H-Glutamat-AMC zugesetzt. Durch die QC im Liquor kommt es zur Umwandlung des Substrates in pyro-Glutamin-AMC. Dieses wiederum wird durch die Zugabe der Pyroglutamat-Aminopeptidase (AP) in AMC gespalten, hierbei erfolgt eine Quantifizierung der AMC-Freisetzung mittels Fluoreszenzmessung, wobei eine Anregung bei 380 erfolgt und eine Messung der Wellenlänge bei 465 nm.

Für die Versuche wurden insgesamt 41 Liquorproben von Patienten mit je 1 ml Liquor in drei unabhängigen Versuchen verwendet. Dazu wurden ca. 12 – 15 Liquorproben pro Versuch der Größe nach aufgetrennt, anschließend gepoolt und die Einzelansätze in Doppelbestimmungen getestet. In Abbildung 23 ist die Freisetzung des AMC über die Zeit dargestellt. In der Liquorfraktion > 3 kDa konnte eine starke Fluoreszenz von AMC gemessen werden. In der reinen physiologischen Lösung fand fast keine Reaktion statt, ein leichter Anstieg über die Zeit ist aber erkennbar, da Eigenfluoreszenz nicht verhindert werden konnte. Als zusätzliche Kontrolle wurde eine identische Analyse mit der Liquorfraktion < 3 kDa durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass genau so eine starke Fluoreszenz wie bei der physiologischen Lösung detektiert werden konnte. Auch die Liquorfraktion > 3 kDa ohne Zugabe von AP zeigte eine ähnliche Zunahme der Fluoreszenz wie die physiologische Lösung. Aufgrund der Überlagerung der Grafen von physiologischer Lösung, Liquorfraktion < 3 kDa und > 3 kDa ohne AP wurde nur bei der physiologischen Lösung die Standardabweichung mit angegeben. Wenn Benzylimidazol (BNI), ein Hemmstoff der QC, der Liquorfraktion > 3 kDa zugemischt wird, findet eine geringere Freisetzung des AMC statt, was zu einer verringerten Detektion der Fluoreszenz führt (Abb. 23).

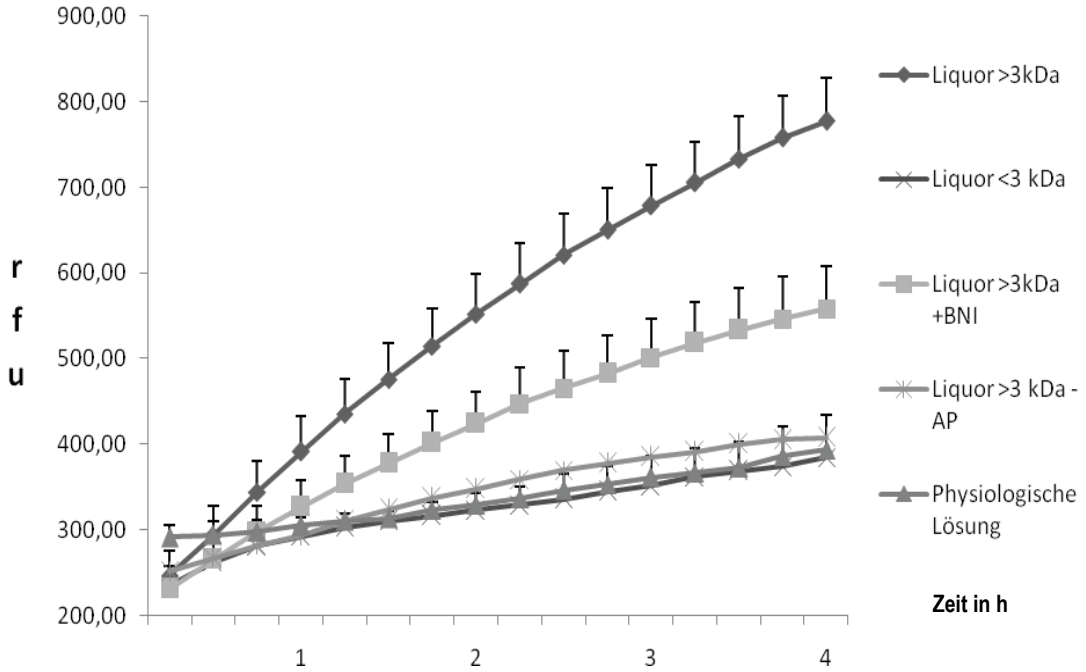

Abbildung 23 Fluorimetrische Messung der Aktivität der Glutaminylcyclase im Liquor. Aufgetragen ist die Zunahme der Fluoreszenz durch Freisetzung des AMC mit dem dazugehörigen Standardfehler über die Zeit. Die Messung erfolgte bei 30°C über einen Zeitraum von 4h. (rfu = relative fluorescence unit; AP = Pyroglutamat-Aminopeptidase; BNI = Benzylimidazol)

In Abbildung 24 ist der Anstieg der Fluoreszenz als Differenz aus Anfangs- und Endfluoreszenz (wie in Abb. 23 dargestellt) mit dem dazugehörigen Standardfehler angegeben. Es ist erkennbar, dass genauso viel AMC in der physiologischen Lösung detektiert werden konnte wie in der Liquorfraktion < 3 kDa sowie in der Liquorfraktion > 3 kDa ohne Zugabe der AP. In der Liquorfraktion > 3 kDa konnte ein Zuwachs der Fluoreszenz um ca. 214% nachgewiesen werden. Im Vergleich zwischen fraktioniertem Liquor und fraktioniertem Liquor mit QC-Hemmstoff konnte gezeigt werden, dass durch den Hemmstoff BNI die Fluoreszenz um ca. 75% verringert wurde. In der Liquorfraktion < 3 kDa mit dem Hemmstoff BNI konnte ebenfalls weniger AMC detektiert werden.

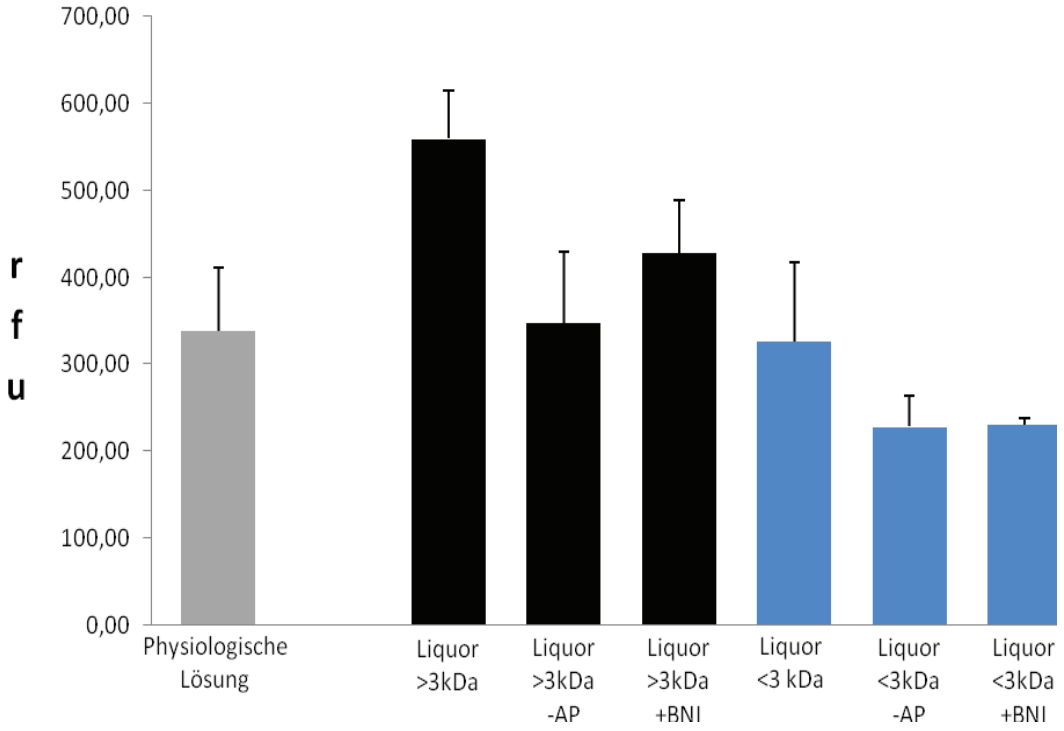

Abbildung 24 Fluorimetrische Messung der Aktivität der Glutaminylcyclase im Liquor cerebrospinalis. Aufgetragen wurde die Differenz aus End- und Anfangsfluoreszenz (siehe Abb. 23) mit dem dazugehörigen Standardfehler. (rfu = real fluorescence unit; AP = Pyroglutamat- Aminopeptidase; BNI = Benzylimidazol)

3.8. Nachweis der Glutaminylcyklase mittels Western Blot

Nach Bestimmung der Aktivität der Glutaminylcyklase sollte im Liquor und Serum mithilfe eines Antikörpers das Protein detektiert werden. Hierzu wurde ein Antikörper bei der Firma Unicus generiert. Dazu wurden Kaninchen mit einem Konjugatgemisch aus vier verschiedenen Peptiden, die der humanen QC entsprachen (siehe Material und Methoden S. 2.1.4), immunisiert. Diese vier verschiedenen QC-Peptide wurden verwendet, da nicht bekannt war, welches von ihnen die stärkste immunogene Reaktion hervorrufen würde. Zur Prüfung der Spezifität wurde die Reaktion des Kaninchenserums an den Peptiden 1 bis 4 getestet sowie die Inhibition der Bindung durch diese Peptide. Dabei wurde festgestellt, dass der Antikörper gegen die Peptide 1 und 4 gerichtet ist, wohingegen die Peptide 2 und 3 keine immunisierende Wirkung aufwiesen. Aus diesem Grunde wurde als Kontrolle für die Western Blots der generierte Antikörper mit den Peptiden 1 und 4 geblockt.

In Abbildung 25 ist der Western Blot mit dem oben beschriebenen Antikörper gezeigt. Mithilfe dieses Antikörpers konnte eine immunoreaktive Bande von ca. 37 kDa sowohl im Liquor wie auch im Serum detektiert werden. Diese immunoreaktive Bande ist nicht mehr nachweisbar, wenn der Antikörper mit Peptid 4 bzw. mit Peptid 1 und 4 vorbehandelt wurde. Das Peptid 1 allein ist nicht in der Lage, die Antikörperbindung zu unterdrücken (Abb. 25). Zur Verifizierung dieser Ergebnisse wurde der Western Blot mit einem etablierten Anti-QC-Antikörper der Firma Probiodrug (Halle) wiederholt. Ebenfalls in Abbildung 25 dargestellt, ist der Western Blot mit dem Antikörper der Firma Probiodrug, welcher ebenfalls bei ca. 37 kDa im Liquor und Serum eine Bande detektierte.

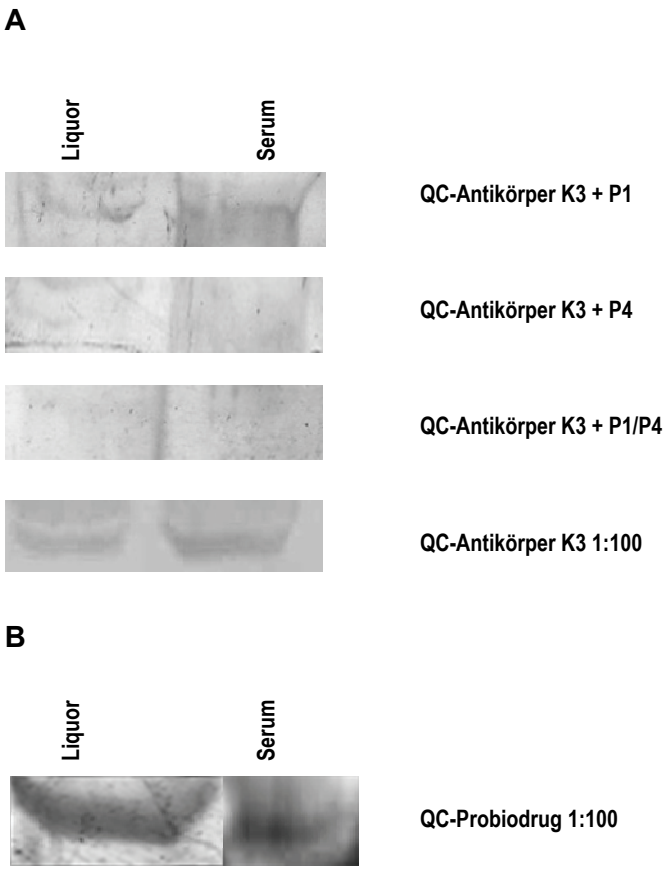

Abbildung 25 Nachweis der Glutaminylcylase in CSF- und Serumproben mittels Western Blot. A: Western Blot mit dem QC-Antikörper der Firma UNICUS sowie mit dem durch Peptide geblocktem QC-Antikörper, B: Western Blot mit dem QC-Antikörper der Firma Probiodrug. Aufgetragen wurden jeweils 30 µg Protein pro Spur.

Nachdem es möglich war, die Glutaminylzyklase im Liquor zu detektierten, sollte als nächstes ein Vergleich der Proteinkonzentration dieses Enzyms im Liquor zwischen verschiedenen neurologischen Erkrankungen getätigt werden. Diese Versuche wurden durchgeführt, um zu überprüfen, ob bei neurologischen Erkrankungen ein erhöhter QC-Spiegel detektiert werden kann. Für diese Nachweise wurde der selbst generierte Antikörper der Firma UNICUS genutzt. In Abbildung 26 ist gezeigt, dass die QC in allen verwendeten Liquors nachgewiesen werden konnte. Eine quantitative Auswertung der Banden mittels der GelScan 5.2 Software (Serva) ergab, dass in der Virusmeningitis die größte Menge QC detektiert werden konnte, gefolgt vom Kontrollliquor. Die geringtse QC-Konzentration wurde in der CSF-Probe von Patienten mit Neuroborreliose nachgewiesen (Abb. 26).

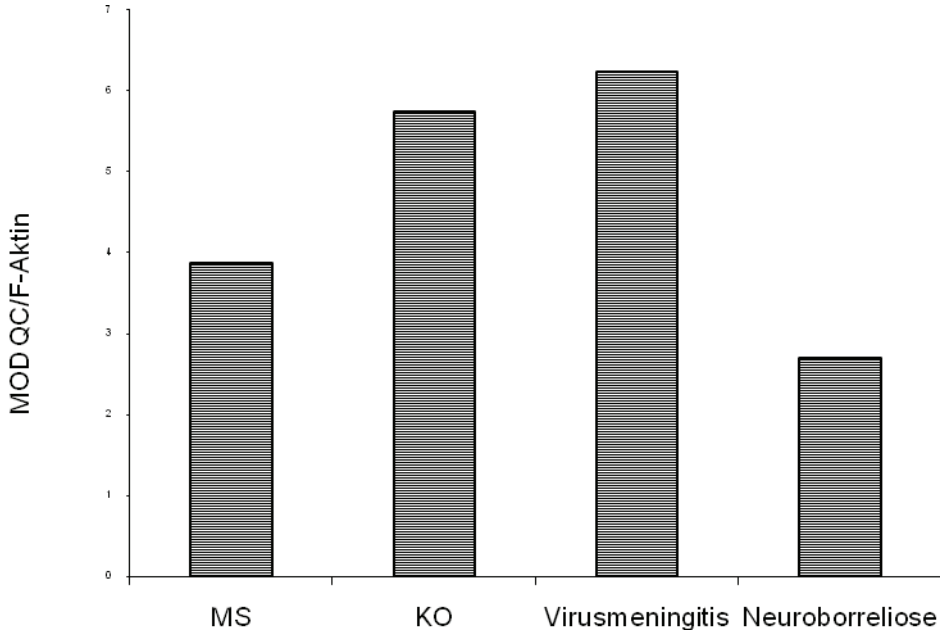

Abbildung 26 Quantitative Auswertung des QC-Western Blot mit Liquor von verschiedenen neurologischen Erkrankungen. Auswertung von jeweils 3 gepoolten Liquors (MOD = Mittlere optische Dichte)

4. Diskussion

Diese vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Suche nach Markerproteinen und pathogenen Faktoren der beiden entzündlichen, demyelinisierenden, neurologischen Erkrankungen MS und GBS. Für keine der Krankheiten gibt es bisher spezifische biologische Markermoleküle, mit deren Hilfe eine schnelle, frühzeitige Diagnose der Erkrankungen möglich wäre. Die Entdeckung von Markerproteinen in Liquor cerebrospinalis oder Serum könnte die Diagnostik der MS und des GBS verbessern und könnte für die Verlaufs- und Therapiekontrolle der beiden Krankheiten nützlich sein. Darüber hinaus ist es möglich, dass MS- bzw. GBS-spezifische Proteine eine Rolle im Pathomechanismus der jeweiligen Krankheit spielen könnten.

Die Blut-Hirn-Schranke spielt eine wichtige Rolle bei der Versorgung des Gehirns mit Nährstoffen. Sie ist eine physiologische Barriere zwischen dem Zentralnervensystem und dem Blutkreislauf und dient dazu, die Milieubedingungen im Gehirn aufrecht zu erhalten und diese von denen des Blutes abzugrenzen (Tumani, Kluge; 2005). Es gibt eine Reihe neurologischer Erkrankungen, bei denen die Balance zwischen Liquor und Plasma gestört ist. Im Liquor cerebrospinalis (Cerebrospinalflüssigkeit, CSF) lassen sich mit großer Wahrscheinlichkeit sogenannte Biomarker für neurologische Erkrankungen nachweisen, da der Liquor im engen Kontakt mit der interstitiellen Flüssigkeit des Gehirns steht, in der biochemische Änderungen aufgrund einer Erkrankung auftreten können. Dies könnte auch bei den beiden in dieser Arbeit untersuchten Krankheiten Multiple Sklerose (MS) und Guillain-Barré Syndrom (GBS), der Fall sein. Bei der MS zeigt sich eine typische Konstellation einer chronisch-entzündliche Erkrankung des ZNS. Beim GBS, einer entzündlichen Erkrankung des peripheren Nervensystems, kommt es innerhalb der ersten Tage zu einer starken Erhöhung der Proteinkonzentration im Liquor bei normaler bis minimal erhöhter Zellzahl (Zettl und Tumani, 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurden MS und GBS hinsichtlich einer Änderung im Proteinmuster des CSF untersucht. Ein Problem bei den Liquoranalysen stellte die hohe Albumin- und IgG-Konzentration im Vergleich zu den geringen Konzentrationen der ZNS-spezifischen Proteine dar. Eine erhöhte Präsenz von Plasmaproteinen spricht grundsätzlich für ein Leck in der Blut-CSF-Schranke (Jin et al., 2007). Ob das in den Liquoranalysen gefundene IgG intrathekal synthetisiert wird, konnte nicht genau klärt werden. Hierzu hätte vergleichend eine Analyse der IgG-Konzentration im Serum mit anschließendem Vergleich der Konzentrationen zwischen Liquor und Serum stattfinden müssen. Falls sich der Level im Plasma nicht erhöht hätte, wäre eine intrathekale Synthese anzunehmen. Das Problem des Albumins besteht darin, dass es in einem 2D-Gel bis zu 20 verschiedene Proteinspots liefert. Somit ist es möglich, dass nicht alle Liquorproteine in den Gelen detektierbar sind und eventuelle Kandidaten für Markerprote-

ine durch Albumin überlagert werden. Eine wichtige methodische Verbesserung bestünde darin das Albumin vor der 2D-Elektrophorese abzutrennen und dadurch die relative Konzentration der Liquor-spezifischen Proteine zu erhöhen. Die Abtrennung von Albumin wurde in der vorliegenden Arbeit mittels einer HPLC-Methode versucht. Dieses war aber leider nicht erfolgreich. Nach der Abtrennung war es nicht möglich, noch irgendwelche Proteine aufzutrennen. Weder das Umpuffern der Lösung noch die Fällung der Proteine brachte das gewünschte Ergebnis. Aus diesem Grunde wurden die Liquorproteine vor einer 2D-Elektrophorese nur hinsichtlich ihres Molekulargewichts aufgetrennt und die > 3kDa-Fraktion anschließend mit dem vierfachen Volumen Alkohol über Nacht gefällt. Anschließend wurde gewaschen und das Proteinpellet in Rehydratisierungslösung gelöst und auf die IPG-Streifen aufgetragen.

Für all diese Vorbereitungsschritte ist es wichtig, die Liquorproben verschiedener Patienten zu vereinigen („poolen“). Dadurch lässt sich zum einem die CSF-Menge erhöhen und zum anderen werden inter-individuelle Unterschiede zwischen einzelnen Patientenliquores jeder Gruppe minimiert. Ein Nachteil des „Poolens“ ist es, dass Patienten-spezifische Änderungen des Proteinmusters im Liquor nicht mehr nachweisbar sind und keine Rückschlüsse auf die verschiedenen Krankheitsstadien gezogen werden können.

Mithilfe der 2D-Elektrophorese mit anschließender Silberfärbung und MALDI-TOF-Analyse konnten in den MS-Liquorproben verschiedene Proteine als mögliche krankheitsspezifische Marker identifiziert werden. Potentielle Markerproteine waren Complement Faktor B, Beta-2-Glykoprotein und Antithrombin III. Complement Faktor B wurde in der Arbeit von Hammack (Hammack et al., 2004) als MS-spezifisch beschrieben. Dieses Protein wies eine 21-fach erhöhte Spotintensität in den MS-Gelen der vorliegenden Arbeit auf. In der vorliegenden Arbeit, sowie in der von Hammack et al. stimmt die Position des als Complement Faktor B identifizierten Proteinspot überein. Bei diesem Protein handelt es sich um eine hoch spezifische Serinprotease, welche in ihrer aktivierten Form die Komplementaktivierung und B-Zell-Stimulierung (Milder et al., 2007) auslöst. Das Auftreten von Complementproteinen in den Plaques ist ein Aspekt der Myelindegeneration. In pathologischen Studien von MS-Läsionen ist das Auftreten von Complement verbunden mit Ig-Ablagerungen an den Plaquestellen (Storch et al., 1998). Des Weiteren ist bekannt, dass die B-Zell-Stimulierung für die primäre Demyelinisierung wichtig ist. Zettl und Tumani (2005) beschreiben in ihrer Arbeit, dass bei der Inflammation und Immundysfunktion Complement-Faktoren als Marker dienen können, da das Complementsystem an der Auslösung der Immunantwort beteiligt ist. Beim klassischen Weg findet eine Complement-Aktivierung über eine Antikörper-Antigen-Bindung statt, beim alternativen Weg

reicht schon die Präsentation des Antigens im Plasma, um das Complementsystem in Gang zu setzen.

Ein weiterer krankheitsspezifischer Marker könnte das Beta-2-Glykoprotein sein, welches um den Faktor 2,8 erhöht im MS-Gel auftritt. Auch hier kam es zu einer Bestätigung der Daten von Hammack et al. (2004) bei der Position des detektierten Spots. Das Plasmaprotein Beta-2-Glykoprotein bindet Vesikel und apoptotische Zellen und sorgt dafür, dass diese zur Phagozytose geleitet werden (Maiti et al., 2007).

Ein weiteres Markerprotein könnte das Antithrombin III sein. Es wurde um den Faktor 10 vermindert im MS-Liquor im Vergleich zum Kontrollliquor detektiert. Ein verminderter Serinproteaseinhibitorspiegel konnte ebenfalls von Lehmensiek et al. (2007b) bei der Multiplen Sklerose nachgewiesen werden. Es handelt sich hierbei um ein Protein, welches ein wichtiger Serinproteaseninhibitor ist, der vorrangig im Plasma vorkommt. Es reguliert die Blutkoagulationskaskade, inhibiert Thrombin und wird ins Plasma sekretiert (Mochizuki, 2001). Genau wie bei den Liquoranalysen von Yuan et al. (2002) konnte der Spot an der gleichen Position im 2D-Gel detektiert werden. Im Gegensatz dazu detektierten Hammack et al. (2004) Antithrombin III bei MS-Patienten erhöht, was in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden konnte. Hammack et al. (2004) geht aber nicht weiter auf seine verwendeten Proben der Patientenliquores ein, wodurch sich eventuell die Unterschiede erklären ließen. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Liquorproben von Patienten eingesetzt, die zum Zeitpunkt der Liquorentnahme nicht medikamentös behandelt wurden und verschiedene MS-Formen aufwiesen. Als Kontrollproben wurde nur Liquorproben von Patienten verwendet, bei denen Kopfschmerz ohne weitere neurologische Erkrankung diagnostiziert wurde. Eine Idee, warum der Spot erhöht bei Hammack auftrat, könnten posttranslationale Modifikationen des Proteins sein. Das ist für die Pathogenese von Erkrankungen sehr relevant. Kim und Mitarbeiter (2003) konnten zeigen, dass z.B. diese Modifikationen an Myelinproteinen bei MS und Kontrollen in sehr großen Variationen auftreten können (Kim et al., 2003). Was für die Verminderung des Antithrombin spricht, ist seine Funktion als Serinproteaseinhibitor.

Die zweite untersuchte neurologische Erkrankung war das Guillain-Barré Syndrom (GBS). Auch für diese Erkrankung ist es wichtig, Markerproteine zu detektieren, da eine frühe Diagnose oftmals schwierig ist. Durch eine frühe Diagnose könnte der teilweise schwere und tödliche Verlauf des GBS verhindert werden. Bei den Untersuchungen konnten nur vier Proteinspots erhöht im Liquor von GBS-Patienten detektiert werden. Es handelte sich dabei um zwei Doppelspots, zum einen um Coeruloplasmin, welches in einem Spot um den Faktor 7 und in

einem weiteren Spot um den Faktor 4 erhöht in den Liquorproben der GBS-Patienten im Vergleich zu den Kontrollproben auftrat. Coeruloplasmin ist ein kupferbindendes Glykoprotein mit Ferro-Oxidaseaktivität. Konzentration und Oxidaseaktivität von Coeruloplasmin sind unter anderem abhängig vom Grad einer schwachen Ischämie und korrelieren mit den Hauptmarkern der Entzündung (Majewski et al., 2007). Dies könnte ein Grund des erhöhten Coeruloplasminspiegels sein, da es sich beim GBS um eine entzündliche Erkrankung handelt. Boll et al. (1999) schreiben, das die Ferrooxidaseaktivität von Coeruloplamsin bei Patienten, die an der Parkinsonschen Krankheit leiden, geringer ist. Es gibt Vermutungen, dass Coeruloplasmin in den Eisenmetabolismus im Gehirn involviert ist (Qian und Wang 1998). Die verminderte Expression könnte zu einer Eisenakkumulation im Gehirn führen, vielleicht auch in neurodegenerativen Erkrankungen, in denen Unterschiede im Eisenmetabolismus beschrieben werden (Connor et al., 1993).

Auch Haptoglobin konnte in der vorliegenden Arbeit bei den GBS-CSF-Analysen mit einer erhöhten Intensität nachgewiesen werden. Es wurde in einem Spot um den Faktor 3,6 und im zweiten Spot um den Faktor 2,5 erhöht in den GBS-Liquorproben detektiert. Die hier gemachten Analysen stimmen mit denen von Jin et al. (2007) und Lehmensiek et al. (2007a) überein. Dort wurde Haptoglobin an gleicher Position im 2D-Gel wie in dieser Arbeit beschrieben. Nachgewiesen wurde das Protein als Doppelspot an zwei nebeneinander liegenden Positionen. Dieses könnte auf Grund einer Modifikation im GBS-CSF entstanden sein. Haptoglobin ist ein im Blutplasma vertretenes Transport- und Akut-Phase-Protein, das zur Gruppe der α_2-Globuline gehört. Seine Aufgabe ist die Bindung und der Transport von Hämoglobin, um es dem Abbau im Retikuloendothelialen System zuzuführen. Es wird vermutet, dass Haptoglobin zusammen mit Lymphozyten, Neutrophilen und Monozyten am inflammatorischen Prozess beteiligt ist (Wagner et al., 1996; Berkova et al., 1999). Beim GBS handelt sich um eine akute inflammatorische Erkrankung des peripheren Nervensystems. Gutowski et al. (1998) konnten bereits zeigen, dass beim GBS erhöhte Haptoglobin-Spiegel nachweisbar sind und es deshalb als Marker für die Diagnose des GBS einsetzbar ist. Lehmensiek et al. (2007a) beschrieben aber auch, das Haptoglobin in anderen neurologischen Erkrankungen wie z.B. virale Meningitis und MS detektierbar ist.

Neben einer Reihe von Unterschieden gab es auch Gemeinsamkeiten bei den Änderungen des Proteinmusters im Liquor von GBS- und MS-Patineten. Transthyretin ist ein Protein, welches bei der MS und beim GBS in der Proteinspotintensität verändert auftrat. Es wurde bei beiden Krankheiten mit einer verminderten Intensität detektiert. Und zwar im MS-Liquor um

den Faktor 3,33 und im GBS-Liquor um den Faktor von 2,5 im Vergleich zum jeweiligen Kontrollliquor. Transthyretin ist ein hormonbindendes Protein. Vermutlich transportiert es Thyroxin über das Blut zum Gehirn. Es wird im Plexusepithel synthetisiert (Hammarström et al., 2003) und kann zur Anzeige der ventrikulären Liquorproduktion genutzt werden (Kleine et al., 1993). Es ist bekannt, dass die Konzentration von Transthyretin trotz erhöhtem Albuminquotienten gleich bleibt (Tumani & Kluge 2005). Hammack et al. (2004), beschrieben dieses Protein als erhöht bei der MS, was in der vorliegenden Arbeit aber nicht bestätigt werden konnte. Der entsprechende Spot im GBS-Gel befand sich an der gleichen Position wie bei Hammack et al. (2004) und Yuan et al. (2002) beschrieben. Im MS-Gel lag der, in der vorliegenden Arbeit als Transthyretin identifizierte Spot, im MW höher und auch in einem niedrigeren pH-Bereich, stimmte aber mit der Position aus der Expasy-Datenbank überein. Jin et al. (2007) und Lehmensiek et al. (2007) beschrieben Transthyretin als GBS-spezifisch vermindert, was mit den hier vorliegenden Daten übereinstimmt. Des Weiteren sagen Jin et al. (2007), dass es sich hier um ein bekanntes negatives Akut-Phase-Protein handelt. Noben et al. (2005) konnte Transthyretin auch im MS- und Kontrollliquor nachweisen. Verminderte Transthyretin-Spiegel sind ebenfalls im CSF von Alzheimer Patienten im Spätstadium und bei amyotropher Lateralsklerose zu finden (Serot et al., 1997; Ranganathan et al., 2005).

Das nachgewiesene Cystatin C wurde schon mehrfach mit der MS in Zusammenhang gebracht. In den hier vorliegenden Daten wurde es zusätzlich beim GBS verändert gefunden. Es spielt eine wichtige physiologische Rolle bei der Regulation von verschiedenen Enzymaktivitäten. Es handelt sich um ein Protein, welches ein Inhibitor von Cysteinproteasen inklusive Cathepsin B, H, K, L und S ist (Grzonka el al., 2001). Es wird in hohen Konzentrationen in der CSF im Vergleich zum Plasma (Lofberg et al., 1979) gefunden und tritt im Verhältnis 5 zu 1 im Liquor im Vergleich zum Serum auf (Reiber, 2001). Im Liquor kommt es bei Anstieg des Albumins zu einer linearen Erhöhung des Proteins (Reiber, 2005). Dieses beobachtete Phänomen ist quantitativ durch die Diffusions/Liquorfluß-Theorie erklärbar (Reiber, 1997). Bei den für diese Arbeit genutzten MS-Liquorproben wurde Cystatin C um den Faktor 15,9 erhöht identifiziert und in den Liquorproben der GBS-Patienten um den Faktor 2,7 vermindert. Cystatin C wurde in der Arbeit von Irani et al. (2006) in Liquorproben von MS-Patienten mit Hilfe der Protein-Chip-Assay Technik identifiziert. Hammack et al. (2004) konnten Cystatin C lediglich bei MS-Patienten identifizieren. Obwohl Boccio et al. (2006) in ihrer Arbeit beschrieben, dass Cystatin C nur verändert detektiert wurde, wenn die Lagerung der Liquorproben über drei Monate hinweg bei – 20 °C erfolgte und somit nicht als MS-spezifisch gewertet werden kann, sprechen die hier gezeigten Daten dagegen. Die verwendeten Proben wurden zwischen 18 – 87 Ta-

gen bei – 20 °C gelagert und anschließend konstant bei – 80 °C. Trotzdem ist eine deutliche Erhöhung des Cystatin C in den MS-Liquorproben im Vergleich zu den Kontrollliquorproben erkennbar. Man kann davon ausgehen, dass Cystatin C ein Kandidat für ein eventuelles Markerprotein bei der MS ist. Des Weiteren wird Cystatin C auch als eventueller Marker für die Creutzfeldt-Jakob angesehen (Sanchez et al., 2004) und spielt eine Schlüsselrolle im Gehirn bei Patienten mit amyloider Angiopathie (Abrahamson et al., 1990; Crawford et al., 2000). Yuan et al. (2002), der Liquorproben ohne neurologischen Hintergrund untersucht hat, konnte Cystatin C auch dort identifizieren. Diese eine Arbeit schließt aber nicht aus, dass dieses Protein nicht krankheitsspezifisch verändert sein kann. Zettl und Tumani (2005) beschreiben auch, dass das Cystatin C im Liquor zu über 99% in den Meningen gebildet wird. Gegen eine spezifische Markerfunktion des Cystatin C bei der Multiplen Sklerose sprechen die Ergebnisse von Kaeser et al. (2007), der bei einer Überexpression von Cystatin C in Gehirnen von Mäusen nachweisen konnte, dass es dort zu einer Inhibierung der Fibrillenformation kam. Cystatin C hat in der Arbeit von Kaeser et al. (2007) einen Einfluss auf die Alzheimersche Erkrankung durch seine Interaktion mit Amyloid-ß.

Als letztes Kandidatenprotein wurde die Prostaglandin-H_2-Isomerase (PH_2D) anhand mehrerer verschiedener Spots identifiziert. Die Spots unterschieden sich hierbei in ihrem pH-Wert, aber nicht in ihrer Größe. Bei der MS wurde PH_2D in einem Spot erhöht (Spot 12, Faktor 3,5, Abb. 9) und in zwei anderen vermindert (Spot 17 und 18, Faktor 5 und 2, Abb. 11) detektiert. Beim GBS wurde es in einem der Spots vermindert detektiert (Spot 8, Faktor 2, Abb. 16). PH_2D ist CSF-spezifisch und qualitative sowie quantitative Variationen konnten in verschiedenen Erkrankungen (z.B. MS, Schizophrenie) gefunden werden (Harrington et al., 1993). Da es intrathekal gebildet wird, sollte es nicht bei einer Schrankenstörung ansteigen, es erhöht sich aber dennoch im Liquor (Tumani et al., 1998). Laut Literatur hat die PH_2D eine Masse von 21 kDa. In unseren Analysen zeigt sich der Spot aber bei 30 kDa. Dieses ist mit einer besonderen Form der Glykolisierung erklärbar (Reiber, 2005). Die Proteinsequenzen, der verschiedenen als Prostaglandin-H_2-Isomerase identifizierten Spots, wurden miteinander verglichen. Dabei traten keine wesentlichen Unterschiede auf. Es wurden in den MALDI-TOF Analysen immer die gleichen Peptide für die Identifikation eines bestimmten Proteins genutzt. Allerdings wurde auch immer Ig-Gamma-Kette-C mit detektiert, was zusammen mit dem als Prostaglandin-H_2-Isomerase identifizierten Protein im Molekulargewicht in einem Bereich von circa 30-35 kDa liegen würde. Eventuell traten Modifikationen im Protein durch die Erkrankung auf, so dass es zu einer Verschiebung des pH-Wertes kommen konnte. In der Literatur gibt es bisher aber keine Hinweise, für die Theorie der Kopplung des PH_2D an IgG. Bei Hammack et al. (2004) wurde

PH_2D als erhöht bei der MS gefunden und zwar etwa beim theoretischen Molekulargewicht von 21 kDa. Aber Noben et al. (2005) konnte PH_2D sowohl in MS und Kontrollliquoren detektieren. Da in den vorliegenden Ergebnissen PH_2D in Kontrollliquor und Liquor von Patienten mit neurologischen Erkrankungen gefunden wurde und auch die bisherigen Literaturdaten keine genaue Auskunft geben, ist es nicht möglich zu sagen, ob es sich bei PH_2D um ein eventuelles Markerprotein für die MS oder das GBS handelt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die durchgeführten 2D-Proteinanalysen keine eindeutigen MS- oder GBS-Markerproteine ergaben. Allerdings konnten einige Kandidaten eingegrenzt werden, die noch weiterführender Untersuchungen bedürfen.

Mit Complement Faktor B und Beta-2-Glykoprotein wurden mögliche Kandidaten als Marker für die MS gefunden. Antithrombin III kann als Marker für Multiple Sklerose und GBS ausgeschlossen werden, da dieses Protein auch bei anderen neurologischen Erkrankungen in veränderten Konzentrationen im Liquor auftritt.

Mit Coeruloplasmin könnte ein Kandidat für die Diagnose des GBS detektiert worden sein, da seine Konzentration unter anderem mit dem Grad einer Entzündung korreliert (Majewski et al., 2007) und das GBS eine entzündliche neurologische Erkrankung darstellt. Haptoglobin zeigte bei anderen neurologischen Erkrankungen im Liquor Veränderungen, daher ist es nicht als Markerprotein für das GBS geeignet.

Transthyretin dagegen würde als ein unspezifischer Marker sowohl für MS als auch GBS in Frage kommen.

Die Bedeutung des Cystatin C konnte noch nicht abschließend geklärt werden, da bei verschiedenen Autoren unterschiedliche Ergebnisse der Proteinanalysen auftraten. Weitere Tests sind zur genauen Aufklärung notwendig. Bisher ist nur eine Vermutung über die Markereigenschaft dieses Proteins für neurologische Erkrankungen möglich. Auch die PH_2D-Isomerase kann nicht eindeutig als ein mögliches Markerprotein für neurologische Erkrankungen benannt werden. Beide Proteine werden aber auch schon im Zusammenhang mit anderen Erkrankungen diskutiert, so dass die Markerfunktion für MS und GBS fraglich ist (Harrington et al., 1993).

Da die 2D-Elektrophorese für den routinemäßigen Einsatz in der Diagnostik nicht anwendbar ist, auf Grund ihres Arbeits- und Zeitaufwandes, müssten sich an die hier durchgeführten Analysen weitere methodische Entwicklungen anschließen. Die Nachweise für bestimmte

Proteine könnten alternativ mittels Western-Blot oder ELISA erfolgen. Mit Hilfe dieser Techniken sollten eindeutige Unterschiede in den Proteinkonzentrationen zwischen Kontroll- und MS- bzw. GBS-Liquores nachweisbar sein, um Markerproteine für die entsprechende Krankheit oder Krankheitsaktivität zu definieren.

5. Literatur

Abrahamson M, Olafsson I, Palsdottir A, Ulvsbäck M, Lundwall A, Jensson O, Grubb A (1990): Structure and expression of the human cystatin C gene. *The Biochemical Journal* 268: 287-294

Ang CW, Koga M, Jacobs BC, Yuki N, van der Meché FG, van Doorn PA (2001): Differential immune response to gangliosides in Guillain-Barré syndrome patients from Japan and the Netherlands. *Journal of neuroimmunology* 121: 83-87

Asahina M, Kuwabara S, Suzuki A, Hattori T (2002): Autonomic function in demyelinating and axonal subtypes of Guillain-Barré Syndrome. *Acta Neurologica Scandinavia* 105: 44-50

Berger T, Rubner P, Schautzer F et al. (2003): Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event. *New England Journal of Medicine* 349:107-109

Berkova N, Lemay A, De Grandpré P, Goupil S and Maheux R (1997): Immunoblot Detection of Decreased Antibodies to Haptoglobin-Like Protein in the Serum of Infertile Women with or without Endometriosis. *Biology of Reproduction* 57: 178-185

Blödorn B, Brück W, Tumani H et al. (1999): Expression oft he beta-Trace protein in human pachymeninx as revealed by in situ hybridization and immunocytochemistry. *Neuroscience Research* 57: 730-734

Boccio P, Pieragostino D, Lugaresi A, Di Ioia M, Pavone B, Travaglini D, D'Aguanno S, Bernardini S, Sacchetta P, Federici G, Di Ilio C, Gambi D, Urbani A (2006): Cleavage of cystatin C is not associated with multiple sclerosis. *Annals of neurology* 62: 201-204

Boll MC, Sotelo J, Otero E, Alcaraz-Zubeldia M, Rioa C (1999): Reduced ferroxidase activity in the cerebrospinal fluid from patients with Parkinson´s disease. *Neuroscience Letters* 265: 155-158

Boron W, Boulpaep EL (2005): Medical Physiology *Elsevier Inc., Philadelphia, Pennsylvania, 2005*

Brettle RP, Gross M, Legg NJ, Lockwood M, Pallis C (1978): Treatment of acute polyneuropathy by plasma exchange. *Lancet* 2(8099): 1100

Brinkmeier H, Aulkemeyer P, Wollinsky KH, Rüdel R(2000): An endogenous pentapeptide acting as a sodium channel blocker in inflammatory autoimmune disorders of the central nervous system. *Nature Medicine* 6: 808-811

Cannella B, Raine CS (1995): The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Annals of Neurology* 37: 424-35

Compston A (1998): Genetic susceptibility to multiple sclerosis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 35: 1623–1634

Connor JR, Tucker P, Johnson M, Snyder B (1993): Ceruloplasmin levels in the human superior temporal gyrus in aging and Alzheimer´s disease. *Neuroscience Letters* 159: 88-90

Crawford F, Freeman MJ, Schinka JA, Abdullah LI, Gold M, Hartmann R, Krivian K, Morris MD, Richards D, Duara R, Anand R, Mullan MJ (2000): A polymorphism in the cystatin C gene is a novel risk factor for late-onset Alzheimer´s disease. *Neurology* 55: 763-768

Ebers GC, Sadovnick AD, Risch NJ (1995): A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. Canadian Collaborative Study Group. *Nature* 377:150-151

Felgenbauer K (1995): The filtration concept of the barrier as basis for the differentiation of the CSF proteins. *J. Greenwood, D.J. Begley, M.B. Segal (Hrsg.) New concepts of a blood-brain barrier.* S. 209-217

Firbas W, Gruber H, Mayr R (1995): Neuroanatomie 7-24 *Verlag WilhelmMaudrich Wien, München-Bern,* 1995

Gold R, Hartung HP, Lassmann H (1997): T-cell apoptosis in autoimmune diseases: terminate of inflammation in the nervous system and other sites with special immune-defense mechanisms. *Trends Neuroscience* 20: 1737-1745

Grzonka Z, Jankowska E, Kasprzykowski F et al. (2001): Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. *Acta Biochimica Poland* 48: 1-20

Gutowski NJ, Pinkham JM, Akanmu D, Chirico S, Muphy RP (1998): Free radicals in inflammatory neurological disease: increased lipid peroxidation and haptoglobin levels in Guillain-Barré syndrome. *Irish journal of medical science* 167: 43-46

Hammack BN, Fung KYC, Hunsucker SW, Duncan MW, Burgoon MP, Owens GP, Gilden DH (2004): Proteomic analysis of multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *Multiple Sclerosis* 10: 245-260

Hammarström P, Sekijima Y, White JT, Wiseman RL, Lim A, Costello CE, Altland K, Garzuly F, Budka H, Kelly JW (2003): D18G transthyretin is monomeric, aggregation prone, and not detectable in plasma and cerebrospinal fluid: a prescription for central nervous system amyloidosis? *Biochemnistry* 42: 6656-6663

Harrington MG, Aebersold R, Martin BM, Merril CR, Hood L (1993): Identification of a brain-specific human cerebrospinal fluid glycoprotein, beta-trace protein. *Applied and Theoretical Electrophoresis* 3: 229-234

Hartung HP (1999): Infections and the Guillain-Barré syndrome. *Journal of neurology, neurosurgery and psychiatry* 66: 277

Hartung HP, Willson HJ, Kieseier BC (2002): Acute immunoinflammatory neuropathy: update on Guillain-Barré syndrome. *Current Opinion in Neurology* 15:571-577

Hughes RA, Cornblath DR (2005): Guillain-Barré syndrome. *Lancet* 366: 1653-1666

Hughes RA, Hadden RD, Gregson NA, Smith KJ (1999): Pathogenesis of Guillain-Barré syndrome. *Journal of Neuroimmunology* 100: 74-97

Hughes RA, Wijdicks EF, Barohn R, Benson E, Cornblath DR, Hahn AF, Meythaler JM, Miller RG, Sladky JT, Stevens JC (2003): Practice parameter: immunotherapy for Guillain-Barré syndrome: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 61: 736-40.

Irani DN, Anderson C, Gundry R, Cotter R, Moore S, Kerr DA, McArthur JC, Sacktor N, Pardo CA, Jones M, Calabresi PA, Nath A (2006): Cleavage of Cystatin C in the cerebrospinal fluid of Patients with Multiple sclerosis. *Annals of Neurology* 59: 237-247

Jin T, Hu LN, Chang M, Wu J, Winblad B, Zhu J (2007): Proteomic identification of potential protein markers in cerebrospinal fluid of GBS patients. *European Journal of Neurology* 14: 563-568

Kaeser SA, Herzig MC, Coomaraswamy J, Kilger E, Selenica ML, Winkler DT, Staufenbiel M, Levy E, Grubb A, Jucker M. (2007): Cystatin C modulates cerebral beta-amyloidosis. *Nature genetics* 39:1437-1439

Kastenbauer S, Koedel U, Wick M, Kieseier BC, Hartung HP, Pfister HW (2003): CSF and serum levels of soluble fractalkine (CX3CL1) in inflammatory diseases of the nervous system. *Journal of Neuroimmunology* 137: 210-217

Kim JK, Mastronardi FG, Wood DD, Lubman DM, Zand R, Moscarello MA (2003): Multiple sclerosis: an important role for posttranslational modifications of myelin basic protein in pathogenesis. *Molecular Cell Proteomics* 2: 453-462

Kleine TO, Hacker R, Lütcke A (1993): Transport and production of cerebrospinal fluid change in aging humans under normal and disease conditions. *Zeitschrift für Gerontologie* 16: 251-255

Kleyweg R, van der Meche FGA, Meulstee J (1988): Treatment of guillain-barré syndrome with high dose gammaglobulin. *Neurology* 38:1639-1642

Lassmann H, Brück W, Lucchinetti C (2001): Heterigeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnostic and therapy. *Trends molecular medicine* 7: 115-21

Lehmensiek V, Süssmuth SD, Brettschneider J, Tauscher G, Felk S, Gillardon F, Tumani H (2007a): Proteome analysis of cerebrospinal fluid in Guillain-Barré syndrome (GBS). *Journal of Neuroimmunology* 185: 190-194

Lehmensiek V, Süssmuth SD, Tauscher G, Brettschneider J, Felk S, Gillardon F, Tumani H (2007b): Cerebrospinal fluid proteome profile in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* 13: 840-849

Lewczuk P, Reiber H, Tumani H (1998): Intercellular adhesion molecule-1 in cerebrospinal fluid – the evaluation of blood-derived and brain-derived fractions in neurological diseases. *Journal of Neuroimmunlogy* 87: 151-161

Link H, Huang YM (2006): Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness. *Journal of Neuroimmunology* 180: 17-28

Linker RA, Chan A, Gold R (2006): Bewährte und neue Immuntherapeutika wecken Hoffnung. *Pharmazeutische Zeitung* 151: 20-24

Lofberg H, Grubb AO (1979): Quantitation of gamma-trace in himan bilogical fluids: indications for production in the central nervous system. *Scand Journal Clinical Lab Investigation* 39: 619-626

Lucchinetti C, Brück W, Lassmann H (2004): Evidence for pathogenic heterogeneity in multiple sclerosis. *Annals of Neurology* 56: 308

Macci B, Matteuci C, Nocentini U et al. (2001): Defective fas ligand production in lymphocytes from MS patients. *Clinical Neuroscience Neuropathology* 18: 4113-4116

Maiti SN, Balasubramanian K, Ramoth JA, Schroit AJ (2007): Beta-2-glykoprotein 1-dependent makrophagen uptake of apoptotic cells: Binding to LRP-receptor family members. *The journal of biological chemnistry* 283:3761-3766

Majewski W, Iskra M, Stanisic M, Laciak M, Mackiewicz A, Staniszewski R (2007): The importance of ceruloplasmin oxidase activity in patients with chronic lower limb atherosclerotic ischemia. *International angiology: a Journal of the international union of angiology* 26:341-345

McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den Noort S, Weinshenker BY, Wolinsky JS (2001): Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the international panel of the diagnosis of multiple sclerosis. *Annals of Neurology* 50: 121-127

Milder FJ, Gomes L, Schouten A, Janssen BJC, Huizinga EG, Romijn RA, Hemrika W, Ros A, Daha MR, Gros P (2007): Factor B structure provides insights into activation of the central protease of the complement system. *Nature structural and molecular biology* 14:224-8

Mochizuki S, Hamato N, Hirose M, Miyano K, Ohtani W, Kameyama S, Kuwae S, Tokuyama T, Ohi H (2001): Expression and Characterization of Recombinant Human Antithrombin III in Pichia pastoris. *Protein Expression and Purification* 23: 55-65

Mortz E, Krogh TN, Vorum H, Görg A (2001): Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. *Proteomics* 11: 1359-1363

Noben JP, Dumont D, Kwasnikowska N, Verhaert P, Somers V, Hupperts R, Stinissen P, Robben J (2005): Lumbar cerebrospinal fluid proteome in multiple sclerosis: characterization by ultrafiltration, liquid chromatography, and mass spectrometry. *Journal of proteome research* 5: 1647-1657

Qian ZM, Wang Q (1998): Expression of iron transport proteins and excessive iron accumulation in the brain in neurodegenerative disorders. *Brain Research Reviews* 27: 257-267

Quincke HI (1895): Über Lumbalpunktion. *Berlin Klinische Wochenschrift* 32:889-891

Radziwill AJ, Kuntzer T, Fuhr P, Steck SJ (2000): Guideline: akute Polyradikulitis (Guillain-Barré Syndrom). *Schweiz Archiv für Neurologie und Psychatrie* 151:256-261

Ranganathan S, Williams E, Ganchev P, Gopalakrishnan V, Lacomis D, Urbinelli L, Newhall K, Cudkowicz ME, Brown RH Jr, Bowser R (2005): Proteomic profiling of cerebrospinal fluid identifies biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neurochemistry* 95:1461-71

Reiber H (1993): Flow rate of CSF – a concept common to normal blood-CSF barrier function and to dysfunction in neurological diseases. *Journal of Neurological Sciences* 122: 189-203

Reiber H (1994): Flow rate of cerebrospinal fluid – a concept common to normal blood-CSF barrier function and to dysfunction in neurological diseases [see comments]. *Jorunal of Neurological Science* 122: 189-203

Reiber H (1997): Proteins in cerebrospinal fluid and blood: Barriers, CSF flow rate and source-related dynamics. *Restorative Neurology and Neuroscience* 21: 79-96

Reiber H (2001): Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid. *Clinical Chimica Acta* 310: 173-186

Reiber H (2005): Blut-Liquor-Schrankenfunktion und Liquorfluß. *In: Zettl UK, Lehmitz R, Mix E: Klinische Liquordiagnostik.* S. 58-73 De Gruyter 2005

Reiber H, Ungefehr S, Jacobi C (1998): The intrathecal, polyspecific and oligoclonal immune response in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* 4:111-117

Sanchez JC, Guillaume E, Lescuyer P, Allard L, Carrette O, Scherl A, Burgess J, Corthals GL, Burkhard PR, Hochstrasser DF (2004): Cystatin C as a potential cerebrospinal fluid marker fort he diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Proteomics* 4: 2229-2233

Sayk J (1960): Cytologie der Cerebrospinalflüssigkeit. Ergebnisse vergleichender Untersuchungen. *Gustav Fischer Jena*; 1960

Sayk J (1962): Cytologie der Cerebrospinal Flüssigkeit. *Gustav Fischer Verlag, Jena*; 1960

Schilling S, Hoffmann T, Wermann M, Heiser U, Wasternack C, Demuth HU (2002): Continous spectrometric assays for glutaminyl cyclase activity. *Analytical Biochemistry* 303: 49-56

Schmidt RM (1968): Der Liquor cerebrospinalis. *Berlin: Volk und Gesundheit*; 1968

Serot JM, Christmann D, Dubost T, Couturier M (1997): Cerebrospinal fluid transthyretin: aging and late onset Alzheimer's disease. *Journal of neurology, neurosurgery and psychiatry* 63:506-8

Sharshar T, Durand MC, Lefaucheur JP et al (2002): MMp-9 correlates with electrophysiologic abnormalities in Guillain-Barré syndrome. *Neurology* 59: 1649-1652

Storch MK, Piddlesden S, Haltia M, Iivanainen M, Morgan P, Lassmann H (1998): Multiple sclerosis: in situ evidence for antibody and complement-mediated demyelination. *Annals of neurology* 43: 465-471

Thews G, Mutschler E, Vaupel P (2007): Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen Verlag: *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, Deutschland*; 2007

Thiele T, Steil L, Gebhard S, Scharf C, Hammer E, Brigulla M, Lubenow N, (2007): Profiling of alterations in platelet proteins during storage of platelet concentrates. *Transfusion* 47:1221-33

Tumani H, Kluge H (2005): Anatomie und Physiologie des Liquorsystems. *In: Zettl UK, Lehmitz R, Mix E: Klinische Liquordiagnostik*. S. 39-57 *De Gruyter*; 2005

Tumani H, Nau R, Felgenbauer K (1998): Beta-trace protein in cerebrospinal fluid: a blood –SF barrier-related evaluation in neurological diseases. *Annals of Neurology* 44: 882-889

Tumani H, Nau R, Felgenbauer K (1998): Beta-trace protein in cerebrospinal fluid: a blood-SF barrier-related evaluation in neurological diseases. *Annals of Neurology* 44: 882-889

Van der Meche FG, Van Dorrn PA, Meulstee J et al (2001): Diagnostic and classification criteria for the Guillain-Barré syndrome. *European Neurology* 2001: 133-139

Wagner L, Gessl A, Baumgartner Parzer S, Base W, Waldhäusl W, Paternack MS (1996): Haptoglobin phenotypng by newly developed monoclonal antibodies. Demonstration of haptoglobin uptake into peripheral blood neutrophils and monocytes. *Journal of Immunology* 156: 1989-1996

Waxman SG. (2006): Axonal conduction and injury in multiple sclerosis: the role of sodium channels. *Nature Reviews Neuroscience* 7: 932-941

Yuan X, Russell T, Wood G, Desideiro DM (2002): Analysis of the lumbar cerebrospinal fluid proteome. *Electrophoresis* 23: 1185-1196

Yuki N (2001a): Infectious origins of, and molecular mimicry in, Guillain-Barré and Fisher syndromes. *Lancet* 1:29-37

Yuki N, Yamada M, Koga M, Odaka M, Susuki K, Tagawa Y, Ueda S, Kasama T, Ohnishi A, Hayashi S, Takahashi H, Kamijo M, Hirata K (2001b): Animal model of axonal Guillain-Barré syndrome induced by sensitization with GM1 gangliosides. *Annals of neurology* 49: 712-720

Zettl UK, Tumani H (2005): Multiple Sclerosis and Cerebrospinal Fluid. *Blackwell Publishing Ltd* Navarra, Spain

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Greifswald, 12. August 2008

Knöfel, Ann-Kathrin

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	**Dipl.-Biologe Ann-Kathrin Knöfel**
Anschrift	Leistikowweg 13 30655 Hannover Tel.: 0511/5391184 oder 0174/2123534 E-Mail: ann-kathrin.knoefel@gmx.de
Geburtsdatum/-ort	28.09.1979 in Malchin
Familienstand	ledig

Schulische Ausbildung

1991 – 1999	Gymnasium Malchin (Note: 2,8)

Akademische Ausbildung

1999 – 2004	**Studium der Biologie** an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald Hauptfach: Mikro- und Molekularbiologie Nebenfach 1: Virologie Nebenfach 2: Zoologie [Physiologie]
2004	**Universitätsabschluss als Diplom-Biologin** (Note: 3,0) Thema der Diplomarbeit: „Proteomsignaturen und Stressfaktoren bei Bacillus licheniformis“ (Note: 2,7) Betreuer: Prof. Dr. M. Hecker

November 2004 – Dezember 2007	**Wissenschaftliche Mitarbeiterin** am Institut für Pathophysiologie an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald **Angestrebter Abschluss Promotion** Thema der Dissertation: „Proteine im Liquor cerebrospinalis von Patienten mit entzündlichen Erkrankungen des Nervensystems“ Betreuer: Prof. Dr. H. Brinkmeier
seit Januar 2008	**Wissenschaftliche Mitarbeiterin** in der experimentellen HTTG-Chirurgie der Medizinischen Hochschule Hannover

Publikationen und Poster

HUPO 2005 Poster	PROTEOMIC ANALYSIS OF CEREBROSPINAL FLUID FROM MULTIPLE SCLEROSIS PATIENTS A.-K. Knöfel[1], C. Kunert-Keil[1], A. Dressel[2], and H. Brinkmeier[1] [1]Institute of Pathophysiology and [2]Department of Neurology, Ernst Moritz Arndt University of Greifswald TIME-BASED ANALYSIS OF SILVER STAINED PROTEINS IN ACRYLAMIDE GELS Bertram Becher, Ann-Kathrin Knoefel* and Joerg Peters Institute for Physiology; *Institute for Pathophysiology Faculty for Medicine Ernst-Moritz-Arndt-University, Greifswald, Germany
NBL3 Projekt Poster 2005	MARKERMOLEKÜLE FÜR ENTZÜNDLICHE DEMYELINISIERENDE ERKRANKUNGEN IN LIQUOR CEREBROSPINALIS UND SERUM Antragsteller: Heinrich Brinkmeier, Alexander Dressel Mitarbeiter: Ann-Kathrin Knöfel, Christiane Kunert-Keil Institut für Pathophysiologie und Klinik und Poliklinik für Neurologie
Ostseephysiologentagung Poster 2005	IDENTIFIZIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON PROTEINEN AUS LIQUOR CEREBROSPINALIS MIT RELEVANZ FÜR DIE POLYRADIKULITIS Ann-Kathrin Knöfel
Deutsche Physiologentagung Poster 2006	ANALYSIS OF CEREBROSPINAL FLUID PROTEINS FROM PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS A.-K. Knöfel[1], C. Kunert-Keil[1], A. Dressel[2], and H. Brinkmeier[1]; [1]Institute of Pathophysiology and [2]Department of Neurology, Ernst Moritz Arndt University of Greifswald

	A NEW APPROACH FOR THE QUANTIFICATION OF SILVER STAINED PROTEINS Bertram Becher[1], Jörg Bernhardt[2], Ann-Kathrin Knoefel[3] and Joerg Peters[1] [1]Institute for Physiology; [2]Institute for Microbiology, [3]Institute for Pathophysiology Faculty for Medicine Ernst-Moritz-Arndt-University, Greifswald, Germany
Poster 2008	ALTERED PROTEIN PATTERN IN THE CEREBROSPINAL FLUID OF PATIENTS WITH GUILLAIN-BARRÉ SYNDROME A.-K. Knöfel[1], C. Kunert-Keil[1], A. Dressel[2], H. Tumani[3] and H. Brinkmeier[1] [1]Institute of Pathophysiology and [2]Department of Neurology, Ernst Moritz Arndt University of Greifswald, [3]Department of Neurology, University of Ulm
Electrophoresis Paper 2006	TIME-BASED ANALYSIS OF SILVER STAINED PROTEINS IN ACRYLAMIDE GELS Bertram Becher, Ann-Kathrin Knöfel* and Jörg Peters Institute of Physiology, *Institute of Pathophysiology, Department of Cardiovascular Medicine, University of Greifswald, Germany

Greifswald, 12. August 2008

Knöfel, Ann-Kathrin

Danksagung

Ich bedanke mich bei meinem Professor Dr. Heinrich Brinkmeier für die Anregung und Überlassung eines so interessanten Dissertationsthemas, für seine Unterstützung und die Diskussionsbereitschaft während der Zeit meiner praktischen und theoretischen Forschungsarbeit am Institut für Pathophysiologie an der Universität Greifswald. Mein herzlicher Dank gilt darüber hinaus vor allem Dr. Christiane Kunert-Keil, die mir mit großem persönlichen Engagement und konstruktiver Kritik immer wieder Denkansätze aufzeigte und meine Promotion damit stets beflügelte. Mit großem Dank sei hier auch das großartige Team des Institutes für Pathophysiologie genannt. Das überaus angenehme Arbeitsklima und die stetige Hilfsbereitschaft aller wissenschaftlichen Mitarbeiter und Angestellten hat die Arbeit an der Dissertation oftmals auch zu einer persönlichen Freude gemacht. Für die zahlreichen aufbauenden Worte und die liebenswerte Motivation danke ich all meinen Freunden, unter ihnen ganz besonders Peter Käning und Peggy Petzke. Der moralischen Unterstützung meiner Familie gilt an dieser Stelle mein größtes Dankeschön. Ihr verdanke ich, was ich bin und geschafft habe. Vielen Dank Euch alle, die immer an mich geglaubt und mir den Weg hierher geebnet habt.