Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Neurologie
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. A. C. Ludolph

Primäre Lateralsklerose-

phänotypische Charakterisierung und Liquorproteomanalyse

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Verena Wais
geb. in Stuttgart

2013

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Thomas Wirth
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Albert Christian Ludolph
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Christian Kubisch
Tag der Promotion:	14.02.2014

All jenen, die mich unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	II
1. Einleitung	1
1.1. Motoneuronerkrankungen	1
1.2. Primäre Lateralsklerose	4
1.3. Die Liquorproteomanalyse	7
1.4. Ziele der Arbeit	13
2. Material und Methoden	15
2.1. Material und Methoden der statistischen Arbeit	15
2.2. Material und Methoden der Liquorproteomanalyse	34
3. Ergebnisse	61
3.1. Ergebnisse der statistischen Auswertung	61
3.2. Ergebnisse der Liquorproteomanalyse	76
4. Diskussion	80
4.1. Die statistische Auswertung	80
4.2. Diskussion der Liquorproteomanalyse	109
5. Zusammenfassung	117
6. Literaturverzeichnis	119
7. Danksagung	136

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
x g	Zentrifugalkraft
®	Registered Trade Mark
2D-DIGE	Zweidimensionale Difference In-Gel Electrophoresis
1.MN	1. Motoneuron
2.MN	2. Motoneuron
Abeta	Amyloid beta-Protein
AD	autosomal-dominant
aHT	arterielle Hypertonie
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ALS-FRS	ALS functional rating scale
Apo CII	Apolipoprotein CII
Apo E	Apolipoprotein E
APS	Ammoniumperoxidsulfat
CSF	Liquor cerebrospinalis
Cu/Zn	Kupfer/Zink
Cu/Zn-SOD	Kupfer/Zink-SOD-Dismutase
DB	Datenbank
ddH_2O	double distilled water
D.m.2	Diabetes mellitus Typ 2
EMG	Elektromyographie
et al.	und Mitarbeiter/Koautoren
FALS	familiäre Amyotrophe Lateralsklerose
H2O2	Wasserstoffperoxid
HDL	High Density Lipoprotein
HTLV-1/2	Humanes T-lymphotropes Virus 1/2
HR	Hazard Ratio
IS	Interner Standard
kD	Kilo Dalton

KHK	Koronare Herzkrankheit
KI95%	95%-Konfidenzintervall (95%-Vertrauensbereich)
LDL	Lower Density Lipoprotein
L-Dopa	Levodopa
LMND	Low Motoneuron Disease
m	männlich
mean	Mittelwert
min	Minute
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MHH	Medizinischen Hochschule Hannover
MND	Motoneuronerkrankung
MN	Motoneuron
MRC	Medical Research Council
MRT	Magnetresonanztomographie
MSAP	Muskelsummenaktionspotenziale
µ	mikro
n	absolute Häufigkeit (Anzahl)
O2	Sauerstoff
OE	Obere Extremitäten
PLS	Primäre Lateralsklerose
RKU	Rehabilitationsklinikum der Universität Ulm
SALS	sporadische Amyotrophe Lateralsklerose
SD	Schilddrüse
SOD1	SOD1-Gen
SVE	Subkortikale vaskuläre Enzephalopathie
TDP-43	TDP-43-Gen
TM	Unregistered Trade Mark
TRH	Thyreotropin Releasing Hormon
UE	Untere Extremitäten

UMN	upper motoneuron (oberes Motoneuron)
w	weiblich
Z.n.	Zustand nach

1. Einleitung

1.1. Motoneuronerkrankungen

1.1.1. Allgemeines über MN Erkrankungen

Motoneuronerkrankungen (MND) sind neurodegenerative Erkrankungen, die charakterisiert sind durch Degeneration des 1. und/ oder des 2. Motoneurons [MA. Gitcho et al. 2008]. Das 2. Motoneuron entspricht der motorischen Vorderhornzelle. MND können hereditär bedingt oder sporadisch auftreten [S. Winter et al. 2004]. In den meisten Fällen treten MND sporadisch auf [MA. Gitcho et al. 2008]. Nur 10 Prozent der Fälle sind familiär bedingt [MA. Gitcho et al. 2008][M. Kuźma-Kozakiewicz et al. 2011]. Die verschiedenen MN Erkrankungen werden hauptsächlich anhand der klinisch erkennbaren prominenten Affektion des oberen beziehungsweise des unteren MN, des Erkrankungsverlaufs, der Ätiologie (sporadisch oder familiär), molekulargenetischer, neuropathologischer und elektrophysiologischer Befunde ihrem Subtyp zugeteilt [A. Unrath et al. 2010][S.Winter et al. 2004].

Je nach Subtyp, aber auch individuell je nach Patient können die Progression, die Klinik und die Lebenserwartung unterschiedlich sein [RJ. Davenport et al. 1996]. Die Lebenserwartung eines ALS Patienten beträgt beispielsweise durchschnittlich 3 Jahre [JL. Gastaut et al. 1988]. Die Datenlage hinsichtlich der Lebenserwartung von PLS Patienten ist jedoch noch völlig unvollständig [MA. Singer et al. 2007].

Wegen dieser stark unterschiedlichen Prognose ist die korrekte Zuordnung zu den Subtypen von großer Bedeutung für den Patienten.

Das Symptomspektrum der MND ist sehr breit. Neben den typischen Symptomen des 1. und 2. MN, dargestellt in Tabelle 1, können auch weitere Symptome wie zum Beispiel frontotemporale Demenzen (FTD) auftreten [EA. Coon et al. 2012].

1.1.1.1. Tabellarische Darstellung der Symptome des 1. und 2. MN

Tabelle 1: Tabellarische Darstellung der Symptome bei betroffenem 1. oder 2. Motoneuron [MA. Singer et al. 2007].

[Abkürzungen: MN= Motoneuron]

Betroffenes MN	*Symptome*
1. MN	gesteigerte Reflexe Spastik Pyramidenbahnzeichen
2. MN	Muskelschwäche Muskelatrophie Muskelkrämpfe Faszikulationen

1.1.2. Die Subtypen der MN Erkrankungen

Die häufigste und geläufigste Form der Motoneuronerkrankung ist die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS). Charcot definierte die ALS als erster [CO. Hanemann et al. 2002]. Er zeigte dabei die Korrelation zwischen klinischen und neuropathologischen Befunden der Motoneuronerkrankungen [V. Meininger, 2011].

Der erste Typ der MN Erkrankung, der entdeckt wurde, war jedoch der Neurolathyrismus [AC. Ludolph, 2012]. Dieser wurde als erstes von Hippokrates beschrieben und war auch schon den Hindus bekannt [AC. Ludolph, 2012][J. Hugon et al. 1993]. Der Neurolathyrismus wird durch exzessiven Genuss des Gemüses Lathyrus sativus (chickling pea) ausgelöst und äußert sich durch charakteristische Symptome einer MN Erkrankung in Form einer spastischen Parese [PS. Spencer et al. 1986][J. Hugon et al. 1993]. Lathyrus sativus wird in Eurasien, Nord Amerika und gemäßigten Teilen von Süd und Ost Afrika als Nahrungsmittel für Tiere und Menschen angebaut [J. Hugon et al. 1993].

Die Differenzierung der verschiedenen Subtypen kann sehr anspruchsvoll sein, da sich die Übergänge teilweise überlappend darstellen [CO. Hanemann et al. 2002]. So können zum Beispiel Gene, die für einige ALS Fälle verantwortlich sind, genauso gut eine PLS hervorrufen [CO. Hanemann et al. 2002].

1.1.2.1. Die Amyotrophe Lateralsklerose

Die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist eine Störung des zentralen Nervensystems, welche im mittleren und hohem Alter auftritt und zu progressivem Verlust von Motoneuronen führt [R. Kuner et al. 2005]. Es kommt zu einer raschen Rückbildung der Axone der Betz Riesenzellen im Motokortex und der Pyramidenbahn (daher Lateralsklerose), bulbärer Hirnnerven sowie motorischer Vorderhornzellen [V. Meininger, 2011]. Daraus folgt die Atrophie der innervierten Muskelgruppen (Amyotrophic) [V. Meininger, 2011].

1.1.2.2. Die Spinale Muskelatrophie

Dabei kommt es zur selektiven Degeneration von motorischen Vorderhornzellen im Rückenmark und des Hirnstamms [K. Talbot et al. 2001]. Dies äußert sich durch schlaffe, atrophe Paresen mit Hypo- oder Areflexie ohne Spastik [K. Talbot et al. 2001]. Die spinale Muskelatrophie kann dabei autosomal rezessiv, dominant oder X- chromosomal vererbt werden [K. Talbot et al. 2001].

1.1.2.3. Hereditäre spastische Paraparese

Die Klinik dieser Motoneuronerkrankung beruht auf der Degeneration der Motoneuronen, der Pyramidenbahn und der Hinterstränge [BJ. Henson et al. 2012]. Das Erkrankungsbild ist symmetrisch und betrifft vor allem die Beine [C. McDermott et al. 2000]. Es kommt zur Spastik, Hyperreflexie und Schwäche der unteren Extremitäten und in diesem Zusammenhang zur progressiven Verschlechterung der Gehfähigkeit des Patienten [JK. Fink, 2003]. Die HSP kann autosomal dominant, rezessiv oder X-chromosomal rezessiv vererbt werden. Unterschieden wird die reine HSP von der komplizierten HSP anhand weiterer neurologischer Symptome [P. Walter et al. 2002].

1.1.3. Molekularer Hintergrund

In diesem Bereich wird sehr viel Forschung betrieben und es wurden viele verschiedene Theorien zu Auslösern, Genen oder anderen Cofaktoren entwickelt. Kurz zusammengefasst lässt sich sagen, dass zahlreiche Gene gefunden wurden, die bei der

HSP oder der ALS eine Rolle spielen [P. Walter et al. 2002]. Weiter werden CAG-Repeat-Expansionen als Entstehungsursache der ad (autosomal dominant) HSP diskutiert, da in einigen betroffenen Familien eine Antizipation, das heißt ein immer früherer Symptombeginn und eine zunehmende Schwere des Krankheitsbildes in nachfolgenden Generationen, beobachtet wurde [P. Walter et al. 2002]. Bei Morbus Kennedy und dem Fragilen X- Syndrom wurden Triplet Expansionen in den Genen gefunden, die die Erkrankungen verursachen [E. Plassart et al. 1994].

Strangartige und kugelförmige Einschlüsse in somatodendritischen Kompartimenten von anfälligen Neuronen des menschlichen Nervensystems sind inzwischen anerkannte pathologische Merkmale einer ALS [H. Braak et al. 2010]. Diese Einschlüsse bestehen hauptsächlich aus aggregierten, phosphorylierten und ubiquitinylierten TAR DNA-binding Proteinen 43 (TDP-43) [H. Braak et al. 2010][MA. Gitcho et al. 2008]. Diese Einschlüsse wurden in vielen Fällen von sporadisch aufgetretenen MND, familiärer ALS, frontotemporaler Lobärdegeneration - MND und ubiquitin positiver FTLD entdeckt [MA. Gitcho et al. 2008]. Es könnte daher sein, dass die Phosphorylierung von TDP 43 die Aggregation desselben auslöst und dadurch eine sporadische ALS hervorruft [H. Braak et al. 2010]. Diese Entdeckung macht TDP-43 zu einem wichtigen biologischen Marker [MA. Gitcho et al. 2008].

Dieses Protein wurde aber nicht in familiär aufgetretenen Fällen entdeckt, bei denen eine SOD 1 Mutation gefunden wurde (CU/Zn superoxide dismutase- 1) [MA. Gitcho et al. 2008]. 20 Prozent aller familiär bedingten MND haben Mutationen in den SOD 1 Genen [MA. Gitcho et al. 2008][M. Kuźma-Kozakiewicz et al. 2011]. Man geht davon aus, dass SOD 1 durch Mutation einen Funktionszuwachs erhält, welcher die MND auslöst [MA. Gitcho et al. 2008].

1.2. Primäre Lateralsklerose

1.2.1. Epidemiologie

Die Primäre Lateralsklerose (PLS) wurde zum erstem Mal fast gleichzeitig von Wilhelm Erb 1875 und Jean-Martin Charcot 1865 beschrieben [LP. Rowland, 1999][JL. Gastaut et al. 1988]. Sie ist eine Variante der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) mit meist günstigerer

Prognose. Ungefähr 5 % aller Patienten mit Motoneuronerkrankung sind PLS Patienten [LP. Rowland, 2005]. Typisches Erstmanifestationsalter ist das 32.-76. Lebensjahr [LP. Rowland, 2005]. Kürzlich wurde jedoch eine Mutation im Alsin-Gen festgestellt, die eine jugendliche Form der PLS hervorrufen kann [MA. Singer et al. 2007].

1.2.2. Klinik

Bei der PLS ist das 1. MN betroffen. Aus diesem Grund zeigen sich Symptome wie gesteigerte Reflexe, spastische Para- bzw. Tetraplegie, positive Pyramidenbahnzeichen und pseudobulbäre Symptomatik wie spastische Dysarthrie [N. Le Forestier et al. 2001][JL. Gastaut et al. 1988]. Die Symptome treten meist zuerst an den Beinen auf, können aber auch an den Händen und Armen zu finden sein oder sich durch eine Pseudobulbärparalyse äußern [LP. Rowland, 2005]. Manche Patienten weisen neben den typischen Symptomen des 1. MN auch andere Symptome auf wie zum Beispiel kognitive Verluste bei formalen Tests, Blasenbeteiligung und pathologische Augenbewegungen [LP. Rowland, 2005][N. Le Forestier et al. 2001]. Vor allem die Blasenstörungen und pathologischen Augenbewegungen werden bisher eher als außergewöhnlich angesehen und sind derzeit noch nicht hinreichend untersucht [LP. Rowland, 2005][N. Le Forestier et al. 2001].
Die Prognose der PLS Patienten ist vor allem im Vergleich zu den ALS Patienten sehr gut. Die Patienten haben ein Überleben zwischen 1 und 22 Jahren [CE. Pringle et al. 1992][MA. Singer et al. 2007].

1.2.3. Ätiologie

Die Symptome entstehen aufgrund von isolierter Degeneration mit variierend ausgeprägter Beteiligung der Pyramidenbahn [N. Le Forestier et al. 2001][JL. Gastaut et al 1988]. Da die Symptome sehr vielfältig sind, besteht die Vermutung, dass neben dem Motokortex auch noch andere neurologische Systeme beteiligt sind [N. Le Forestier et al. 2001]. Bei einer PLS kann es im Verlauf zu einer Beteiligung des 2. MN kommen, daher wird häufig diskutiert, ob eine PLS früher oder später in eine ALS übergehen kann [LP. Rowland, 2005].

1.2.4. Diagnostik

Die Diagnose der Erkrankung ist eine Ausschlussdiagnose. Die Grundlagen für diese sind die Klinik, die Elektrophysiologie und das MRT um Erkrankungen auszuschließen, die die Symptome der PLS nachahmen [J. Kassubek et al. 2012]. Pringle und seine Kollegen entwickelten 1992 aufgrund der Beobachtung von 8 PLS Patienten diagnostische Kriterien, die bis heute in leicht modifizierten Form angewendet werden [CE. Pringle et al. 1992]. Die sichere PLS Diagnose kann bisher aber ausschließlich nach dem Ableben der betroffenen Patienten durch die Befunde der Autopsie gestellt werden [JL. Gastaut et al 1988].

1.2.5. Makroskopie und Histopathologie

Brownwell und Kollegen reevaluierten 1970 die Autopsien von PLS Patienten. Dabei fanden sie Patienten mit Vorderhornbeteiligung, die klinisch ausschließlich eine Affektion des 1. Motoneurons gezeigt hatten [LP. Rowland et al. 2005]. Auch in anderen Untersuchungen zeigten sich Degenerationen des lateralen medullären Trakts und ebenfalls ein Verlust von Vorderhornzellen [N. Le Forestier et al. 2001]. Bei PLS Patienten, die klinisch eine Demenz aufwiesen, wurden diffus verteilte Lewy Körperchen gefunden [N. Le Forestier et al. 2001].

1.2.6. Differentialdiagnosen

Differentialdiagnostisch müssen multiple Erkrankungen berücksichtigt werden, bevor die Diagnose PLS gestellt werden kann. Einige dieser Erkrankungen lassen sich heutzutage leicht ausschließen. Dazu gehören zum Beispiel Cobalamin (Vitamin B12) Mangel, Syphilis und diverse virale Infektionen wie zum Beispiel HIV [MA. Singer et al. 2007]. CT und MRT stehen erst seit 1973 zur Verfügung und bilden seitdem ein wichtiges Standbein der Diagnostik [LP. Rowland et al. 2005].

Anders verhält es sich mit der Abgrenzung gegenüber anderen Motoneuronerkrankungen, vor allem der ALS. Die ALS zeigt ebenfalls ein breites Symptomspektrum und sehr unterschiedliche Progressionsformen [J. Brettschneider et al. 2010]. ALS Patienten, die beispielsweise eine ALSIN (rasGTPase) Mutation tragen, haben eine sehr milde

Verlaufsform, die bereits im frühen Erwachsenenalter auftritt [S. Winter et al. 2004]. Das Symptomspektrum reicht dann von einer der primären Lateralsklerose sehr ähnlichen Form bis hin zur typischen Klinik einer ALS [S. Winter et al. 2004].

Des Weiteren konnte bei der juvenilen PLS (JPLS) eine Mutation im ALS2 Gen gefunden werden [C. Panzeri et al. 2006]. Diese Mutation wurde neben der rezessiven Form der ALS auch bei infantile onset ascending HSP (IAHSP) und der komplizierten Form der HSP (cHSP) gefunden [C. Panzeri et al. 2006].
Das mittlere Alter beim Auftreten von Erstsymptomen ist bei der PLS und der ALS fast identisch [A. Piquard et al. 2006]. Auch autoptisch lassen sich die beiden MND nicht sicher voneinander abgrenzen, da in beiden Fällen eine Degeneration des lateralen medullären Trakts und eine makroskopische Atrophie der prämotorischen Areale des zentralen Gyrus sowie ein neuronaler Verlust im Bereich der Vorderhörner gefunden werden konnten [A. Piquard, 2006].
Dies zeigt, wie schwierig die klinische Unterscheidung zwischen diesen verschiedenen Subtypen der MND ist. Der Mangel an biochemischen Markern erschwert diese Situation weiter. Daher ist bei der Differenzierung neben jahrelanger Erfahrung im Umgang mit Motoneuronerkrankungen auch ein gewisses Gefühl für die Phänotypen der Neurologie erforderlich.

1.3. Die Liquorproteomanalyse

1.3.1. Der Liquor cerebrospinalis:

Der Liquor cerebrospinalis (CSF) kann als ein Ultrafiltrat des Blutplasmas angesehen werden [EJ. Thompson, 1995]. Für den Übertritt von Molekülen wie zum Beispiel Proteinen aus dem Blutplasma in den CSF spielt deren molekulare Größe eine besondere Rolle [EJ. Thompson, 1995]. Aber auch die Lipophilie der Stoffe ist entscheidend. Dies gilt vor allem für Proteine, die kleiner als 500 Da sind [EJ. Thompson, 1995]. Bei der Untersuchung des CSF sollte immer der Vergleich des CSF mit einer Serumprobe des Patienten durchgeführt werden [EJ. Thompson,1995]. Dadurch kann eine lokale Synthese von Antikörpern und anderen Analyten beziehungsweise das Vorkommen von Antigenen

aufgedeckt werden [EJ. Thompson, 1995].

Zwei Drittel des CSF werden durch den Plexus choroideus im lateralen dritten und vierten Ventrikel produziert [EJ. Thompson, 1995]. Die Liquorproduktion durch den Plexus choroideus wird kaum durch Pathologien beeinflusst [EJ. Thompson, 1995][KS. Johnson et al. 1977]. Das letzte Drittel des Volumens wird durch die Hirngefäße produziert. Diese Produktion kann durch Pathologien beeinflusst werden. Am häufigsten geschieht dies bei Hirntumoren [EJ. Thompson, 1995].

Beim gesunden Erwachsenen beträgt das gesamte Volumen des CSF zwischen 125 und 150 ml [KS. Johnson et al. 1977]. Pro Stunde werden circa 20 ml CSF produziert [KS. Johnson et al. 1977]. Der CSF zirkuliert von den lateralen über den dritten in den vierten Ventrikel [KS. Johnson et al. 1977]. Von dort aus gelangt er in den Subarachnoidalraum [KS. Johnson et al. 1977]. Im Subarachnoidalraum wird der CSF über arachnoidale Granulationen resorbiert [ML. Upton et al. 1985]. Circa 20% des CSF befinden sich in den Ventrikeln, der Rest umgibt im Subarachnoidalraum das Neurocranium und das Rückenmark [KS. Johnson et al. 1977]. Der Fluss des CSF kommt einerseits durch Schwerkraft in Richtung cranio-caudal und andererseits durch die pulsatile Welle, welche durch den zerebralen Blutfluss und der damit verbundenen kurzfristigen Expansion der Gefäße entsteht, zustande [KS. Johnson et al. 1977].

1.3.1.1. Tabellarische Darstellung der Größen des Liquors eines gesunden Erwachsenen

Tabelle 2: Tabellarische Darstellung der Zusammensetzung des Liquors eines gesunden Erwachsenen [HK. Walker et al. 1990].

Variable	*Größen*
Farbe	farblos
Trübung	kristallklar
Mononukleäre Zellen	<5 per mm^3
Granulozyten	0
Gesamtprotein	22–38 mg/dl
Glukose	60–80% der Blutglukose

1.3.2. Die Liquorpunktion

Die Liquorpunktion wird als Routineeingriff durchgeführt, um CSF für die Diagnostik zu gewinnen. ZNS Infektionen mit Bakterien, Pilzen, Mykobakterien oder Viren können so

nachgewiesen werden [K.S. Johnson et al. 1977]. Erkrankungen wie Subarachnoidalblutungen, Malignome des ZNS und Demyelinisierungsprozesse können dadurch ausgeschlossen oder bestätigt werden [K.S. Johnson et al. 1977].
Für eine erfolgreiche Liquorpunktion müssen einige Punkte beachtet werden: Die untere Lumbalwirbelsäule sollte gebeugt und möglichst im rechten Winkel zu der Untersuchungsliege sein [K.S. Johnson et al. 1977]. Die Desinfektion der Punktionsstelle sollte mit Alkohol und einem weiteren Desinfektionsmittel durchgeführt werden [K.S. Johnson et al. 1977]. Bei der Punktion wird eine spezielle Spinalnadel mit 20 oder 22 Gauge verwendet, in der sich eine herausnehmbare Mandrin befindet [K.S. Johnson et al. 1977]. Die geschliffene Seite der Spinalnadel sollte in Richtung der Flanken des Patienten zeigen. Dies erlaubt der Spinalnadel den Durasack eher zu spreizen als zu schneiden, da die Fasern des Durasackes parallel zu der spinalen Achse verlaufen [K.S. Johnson et al. 1977]. Die Punktion erfolgt zwischen dem vierten und fünften Lumbalwirbelkörper [K.S. Johnson et al. 1977]. Liegt die Spinalnadel im Subarachnoidalraum, wird der Mandrin entnommen und der Liquor tropft passiv durch die Spinalnadel in sterile Plastikröhrchen [K.S. Johnson et al. 1977]. Pro Untersuchung werden meist zwischen 8 und 15 ml CSF entnommen [K.S. Johnson et al. 1977]. Eine Entnahme bis 40 ml für spezielle Untersuchungen, zum Beispiel zum Nachweis von Pilzen, ist ohne Risiko möglich [K.S. Johnson et al. 1977]. Nach der Entnahme wir der Mandrin eingelegt und die Spinalnadel entfernt [K.S. Johnson et al. 1977].

1.3.3. Die Proteine im Liquor cerebrospinalis

Circa 20% der Proteine im Liquor cerebrospinalis werden im Gehirn synthetisiert [EJ. Thompson, 1995]. Diese Proteine sind aber trotzdem nur in Ausnahmefällen hirnspezifisch [EJ. Thompson, 1995][H. Reiber, 2003]. Eine neuronenspezifische Enolase wird beispielsweise ebenfalls in Erythrozyten und Thrombozyten hergestellt [EJ. Thompson, 1995][H. Reiber, 2003]. Die restlichen 80% der Proteine entspringen dem Transsudat des Blutplasmas [EJ. Thompson, 1995].
Albumin hat mit 30-80% den größten Anteil an den Proteinen des CSF [H. Reiber et al. 2001]. Im Bereich der Ventrikel ist die Proteinkonzentration am geringsten [E. Frick et al.

1958]. Durch die Proteinproduktion der Meningen und den Übertritt von weiteren Proteinen aus dem Blutplasma nimmt die Proteinkonzentration im Verlauf ihrer Zirkulation durch den Subarachnoidalraum zu [E. Frick et al. 1958]. Die Proteinkonzentration im Lumbalbereich ist so im Vergleich zu den Ventrikeln um das Dreifache erhöht [ML. Upton et al. 1985].
Bei vielen neurologischen Erkrankungen zeigt sich ein begleitender Anstieg der Plasmaproteinkonzentration im CSF [H. Davson et al. 1967]. Bei bestimmten Erkrankungen kann es außerdem zu auffälligen Veränderungen der Proteinzusammensetzung des CSF kommen [EJ. Thompson, 1995]. Dieser Umstand wird bei der Diagnose vieler neurologischer Erkrankungen genutzt.

1.3.4. Proteomics

1996 wurde der Begriff "Proteom" von Marc L. Wilkins geprägt [MR. Wilkins et al. 1996]. Gemeint ist damit der gesamte Satz der Proteine, welcher in allen Zellen eines Organismus exprimiert wird [TR. Burkard et al. 2011]. Die Proteine sind im Gleichgewicht zwischen ständigem Auf- und Abbau [J. Groth, 2012]. Das Proteom einer jeden Zelle ändert sich also im Gegensatz zum Genom ständig [J. Groth, 2012].
Die Entwicklung der Proteomik-Technologie ermöglicht es neue Biosignaturen zu identifizieren, so wie es zuvor die vor einem Jahrzehnt entwickelten Genexpressionsmodelle taten [W. Hueber, 2006]. Diese damals entdeckten Genexpressionsmodelle könnten jetzt durch die Proteomik-Technologie abgelöst werden [W. Hueber, 2006]. Durch die Proteomik-Technologie konnte eine bemerkenswerte Datenbank mit Proteinprofilen von Gewebe und Serum erstellt werden [W. Hueber, 2006]. Dies ist vor allem deshalb interessant, weil davon ausgegangen wird, dass einige Proteine verantwortlich für die Entwicklung von Krankheiten sind [W. Hueber, 2006]. Daher hat die Proteomik-Technologie das Potential, die klinische Versorgung zu revolutionieren. Sie macht die Entdeckung von Biomarkern für die Diagnostik bestimmter Erkrankungen und die Einschätzung deren Prognose möglich [W. Hueber, 2006]. Somit kann sie auch zur Unterstützung der therapeutischen Entscheidungen und bei der Beobachtung der gewählten Therapiewirkung von großem Nutzen sein[W. Hueber, 2006].

1.3.5. Die Proteomenforschung

Die Proteomenforschung wird auch „Wissenschaft der Proteomik“ genannt [M. Mann et al. 2003]. Dabei werden die verschiedensten Strategien angewandt, um individuelle Proteine systematisch zu charakterisieren und identifizieren [M. Mann et al. 2003].
Im 1. Schritt müssen die Proteine dafür von den vielen anderen Molekülen, die sich in den untersuchten Zellen, Flüssigkeiten oder Geweben befinden, getrennt und isoliert werden.

Nach einiger Vorbereitung wird die zweidimensionale Gelelektrophorese durchgeführt [M. Mann et al. 2003]. Diese zweidimensionale Gelelektrophorese trennt die Proteinpopulationen sowohl auf der Basis von Ladung als auch nach dem molekularen Gewicht auf [M. Mann et al. 2003]. Dies geschieht einerseits durch die isoelektrische Fokussierung und andererseits durch SDS-PAGE [W. Hueber, 2006].
Früher wurden für die Proteinidentifizierung große Proteinmengen benötigt, da viele verschiedene Modifikationen eines Proteins die Identifizierung erschwerten. Heute werden bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese die Modifikationen der Proteine bei der horizontalen Wanderung sogar genutzt [M. Mann et al. 2003]. Die Ladung der phosphorylierten Proteine ist eine andere als die des gleichen nichtphosphorylierten Proteins, dadurch kommt der phosphorylierte Proteinspot an einer anderen Stelle im Gel zur Darstellung als der des nichtphosphorylierten Proteins [M. Mann et al. 2003].
Die modifizierten Proteine werden auch als "Subproteom" bezeichnet [M. Mann et al. 2003].

Durch das Labeln der Proteine können die getrennten Proteine als Spots eingescannt und von einer Spot Detektion Software analysiert werden[W. Hueber, 2006].

Die angefärbten und zur weiteren Diagnostik ausgewählten Proteinspots werden aus dem Gel gepickt und der Verdauung mit Trypsin zugeführt [W. Hueber, 2006]. Die mit Coomassie anfärbbare Menge liegt bereits bei einigen Picomol oder im Mikrogramm Bereich [M. Mann et al. 2003].
Nach der Trypsinverdauung werden sie entweder durch Seldi-TOF oder MALDI-TOF

(Matrix-assisted laser-desorption ionization time of flight) Massenspektrometrieverfahren analysiert [W. Hueber, 2006]. Die Massenspektrometrie hat ein beträchtliches Potential, da mit ihrer Hilfe zum Beispiel auch durch Phosphorylierung modifizierte Proteine mit sehr hoher Sensitivität erkannt werden können [M. Mann et al. 2003].
Als TOF-Analysator verwendet man einen Ionendetektor, der die ankommenden Ionen in elektrische Energie umwandelt [W. Hueber, 2006]. Durch die Kombination dieser Verfahren erhält man letztendlich den individuellen Fingerabdruck des untersuchten Proteins in Form eines unverwechselbaren Peptidspektrums [W. Hueber, 2006].

Diese neue Methode toleriert Verunreinigungen der Proteine deutlich besser als die bisherigen, sodass die Menge der Proteine eine größere Rolle spielt als ihre Reinheit [M. Mann et al. 2003]. Durch die Proteomenforschungen sind wir heute in der Lage, mit einem einzigen Experiment hunderte Proteine, wie hier im CSF, zu detektieren und durch Gegenüberstellung mit vorhandenen experimentellen Datenbanken zu identifizierten [M. Mann et al. 2003].
Daher könnte die Proteomenforschung einen größeren Nutzen bei der Überwachung bestimmter Krankheiten bieten als das Genexpressionsmodel [W. Hueber, 2006].

1.3.6. Die Liquoruntersuchung bei PLS Patienten

Die Liquoruntersuchung bei PLS Patienten diente bisher nur dazu, die Diagnose PLS als Ausschlussdiagnose stellen zu können.
Wie oben beschrieben, lassen sich nicht nur Proteine aus dem Blut, sondern auch Proteine, die direkt dem Gehirn entstammen, im CSF finden [K. Buerger et al. 2006].
Diese Proteine können immer häufiger mit Erkrankungen des Nervensystems und des Gehirns in Verbindung gebracht werden, wie zum Beispiel das Tau Protein bei der Alzheimer Demenz [K. Buerger et al. 2006]. Aus diesem Grund ist in den letzten Jahren die Untersuchung des Liquors nach Proteinen immer wichtiger geworden [K. Buerger et al. 2006]. Wenn dies für andere Erkrankungen des ZNS gilt, liegt die Vermutung nahe, dass auch Proteine im CSF gefunden werden können, die in irgendeiner Weise mit einer PLS Erkrankung in Verbindung stehen.

1.4. Ziele der Arbeit

Die Zielsetzung dieser Arbeit war der Aufbau einer PLS Datenbank mit möglichst vielen PLS Patienten aus verschiedenen neurologischen Zentren in ganz Deutschland.
Von 76 PLS Patienten konnten auf diese Weise retrospektive Daten erhoben werden. Bei einigen PLS Patienten konnte anhand von mehreren zeitlich aufeinander folgenden Befunden der Verlauf der Erkrankung dokumentiert werden. Diese bisher nie erreichte Datenmenge sollte für die Erörterung dreier großer Themenkomplexe der PLS herangezogen werden:

1. Die klinischen Phänotypisierung von atypischen Symptomen der PLS
2. Die klare klinische Differenzierung zwischen ALS und PLS
3. Die Erörterung der Pringle Kriterien

Mit Hilfe von bereits im Rahmen der Diagnostik gewonnenen Liquorproben der PLS Patienten konnten wir zusätzlich eine Liquorproteomanalyse durchführen.
Es wurde dabei Material einer kleinen Kohorte von 9 PLS Patienten und 9 gesunden alters- und geschlechtsgematchten Kontrollen verwendet.
Das Ziel dieses experimentellen Teils der Arbeit war die Identifikation eines Biomarkers. Anhand dieses Biomarkers könnte die Diagnose PLS gesichert, die Abgrenzung zur ALS geschärft, der Pathomechanismus der Erkrankung besser verstanden und zu guter Letzt ein Angriffspunkt für die Therapie detektiert werden.
Dieses Vorhaben stützt sich auf den Erfolg von bisher durchgeführten Liquorproteomanalysen zu neurodegenerativen Erkrankungen wie beispielsweise der ALS [J. Brettschneider et al. 2008].

Die Ergebnisse aus den beiden Teilen der Arbeit werden mit der bereits vorhandenen Literatur verglichen und eingeordnet.

Die PLS ist bis heute eine umstrittene und viel diskutierte Erkrankung. Diese Arbeit soll helfen, die Diagnostik sowohl klinisch, als auch eventuell laborchemisch zu vereinfachen, den Subtyp PLS schärfer gegen die ALS abzugrenzen, atypische Symptome der PLS zu

beleuchten und die Sinnhaftigkeit der Pringle Kriterien nach 20 Jahren der Forschung zu überdenken.

2. Material und Methoden

2.1. Material und Methoden der statistischen Arbeit

2.1.1. Die PLS Patienten

Bei der Datensammlung konnten von insgesamt 76 PLS Patienten Befunde erhoben werden. Die Erhebung fand in Zusammenarbeit mit 3 verschiedenen neurologischen Zentren in ganz Deutschland statt. Dabei stammten 10 Patienten aus der „Neurologischen Klinik mit klinischer Neuropsychologie der Medizinischen Hochschule Hannover“ (MHH) und wurden von Dr. K. Kollewe und Prof. Dr. S. Petri betreut. Weitere sieben Patienten kamen aus der „Klinik und Poliklinik für Neurologie des Universitätsklinikums Carl Gustav Dresden“ unter der Betreuung von Dr. A. Hermann und der Hauptanteil entstammt der „neurologischen Universitäts- und Rehabilitationsklinikum (RKU) Ulm“ unter der Leitung von Prof. Dr. A.-C. Ludolph.

Das Alter der PLS Patienten lag zwischen 32 und 89 Jahren. Das durchschnittliche Alter rangierte bei 65,8 +/- 11,55 Jahren. Insgesamt waren es 41 (55%) weibliche und 34 (45%) männliche Patienten.

2.1.2. Diagnosestellung, Ein- und Ausschlusskriterien

Die in der Datenbank registrierten Patienten hatten zuvor durch erfahrene Ärzte der beteiligten neurologischen Zentren die Diagnose PLS erhalten.

2.1.2.1. Die Einschlusskriterien

Als Grundlage für unsere Einschlusskriterien verwendeten wir die allgemeingültige Formulierung der Pringle Kriterien. Pringle und seine Kollegen untersuchten 1992 acht Patienten mit übereinstimmenden Symptomen einer progressiven symmetrischen Spinobulbären Spastik [CE. Pringle et al. 1992].

2.1.2.2. Die Pringle Kriterien

1. Beginn der Erkrankung im Erwachsenenalter.
2. Progression der Erkrankung über mindestens drei Jahre.

3. Negative Familienanamnese für Motoneuronerkrankungen (MND).
4. Nahezu symmetrische, beidseitige Beteiligung der Pyramidenbahn mit Gesichtsbeteiligung.
5. Unauffälliges Serumlabor hinsichtlich Vitamin B12 und Folsäure Mangel.
6. Negative Testung für oligoklonale Banden,Syphilis, Lyme-Borreliose und HTLV1-2 im Liquor.
7. Keine Kompressionen der Medulla spinalis im MRT der Halswirbelsäule.
8. Keine Hyperintesitäten im MRT des Schädels.
9. Keine Denervationspotentiale in der Elektromyographie.

[CE. Pringle et al. 1992]

2.1.2.2.1. Zu Punkt 2 der Pringle Kriterien: Progression der Erkrankung über mindestens 3 Jahre

2 PLS Patienten aus Ulm wiesen zum Zeitpunkt der Erhebung eine bisherige Erkrankungsdauer von 2 Jahren auf. Wir nahmen diese beiden Patienten bei eindeutigen PLS Symptomen ohne jegliche klinische und elektrophysiologische Beteiligung des 2. Motoneurons nicht aus der Datenbank.

2.1.2.2.2. Zu Punkt 4 der Pringle Kriterien: Nahezu symmetrische, beidseitige Beteiligung der Pyramidenbahn mit Gesichtsbeteiligung

In einer Studie von Forestier et al. entwickelten von 9 PLS Patienten nur 2 Symptome einer fazialen Hypokinesie oder Amimie [N. Le Forestier et al. 2001]. Derselbe Umstand zeigte sich in einer Studie von Norlinah et al.; in dieser entwickelte nach 2 Jahren von 5 Patienten nur einer eine Gesichtsbeteiligung [I.M. Norlinah et al. 2007]. Der Gesichtsbeteiligung wurde deshalb bei unserer Datenerhebung eine untergeordnete Rolle zugewiesen. Weiter offenbarte sich in verschiedenen Publikationen, dass einige PLS Patienten, vor allem in den Anfangsstadien, eine asymmetrische Klinik an den Tag legten [JL. Gastaut et al. 1988] [ML. Grunnet et al. 1989]. Sogar in den Pringle Kriterien selbst wird nur von einer „nahezu“ symmetrische Beteiligung der Pyramidenbahn gesprochen. Aus diesem Grund nahmen wir Patienten mit Asymmetrie von Spastik oder Paresen ebenfalls nicht aus der

Datenbank.

2.1.2.2.3. Zu Punkt 9 der Pringle Kriterien: Denervationspotentiale in der Elektromyographie

Mit Hilfe der Elektrophysiologie können Zeichen des 2. Motoneurons nachgewiesen werden. Dazu gehören pathologische Spontanaktivitäten wie Fibrillationspotentiale und positive steile Wellen [N. Le Forestier et al. 2001]. Faszikulationen, die klinisch nicht wahrgenommen wurden, können teilweise durch die Elektromyographie dargestellt werden. Bei diskreter Muskelanspannung können Zeichen von chronischer Denervierung im Sinne von großen Muskelsummenaktionspotenzialen (MSAP) mit erhöhtem Anteil an polyphasischen Potenzialen nachgewiesen werden [S. Körner et al. 2011]. Ein gelichtetes Interferenzmuster kann sich bei maximaler Muskelanspannung offenbaren und deutet ebenfalls auf eine Denervierung hin [S. Winter et al. 2004].

All diese Erscheinungen sprechen für eine Beteiligung des 2. Motoneurons.

Pringle und seine Kollegen waren 1992 mit dem diskreten Vorkommen dieser Phänomene in der Elektrophysiologie ihrer Patienten konfrontiert. Sie nahmen daher an, dass dezente Zeichen einer Denervation in der Elektrophysiologie auch bei der PLS vorliegen können [A. Piquard et al. 2006]. Sie drückten dies in ihren Einschlusskriterien wie folgt aus: "absence of denervation potentials or, at most, occasional fibrillation and increased insertional activity in a few muscles (late and minor)" [CE Pringle et al. 1992]. In weiteren Untersuchungen war ebenfalls aufgefallen, dass die beobachteten PLS Patienten im Erkrankungsverlauf Merkmale des 2. Motoneuron entwickelten. Diese zeigten sich sowohl klinisch als auch in der Elektrophysiologie [RP. Bruyn et al. 1995][N. Le Forestier et al. 2001][MC. Tartaglia et al. 2007].

Wir gehen davon aus, dass bei den meisten PLS Patienten im Verlauf eine Affektion des 2. Motoneurons auftritt.

Um diesem Phänomen weiter auf den Grund zu gehen, handhabten wir diskrete Zeichen des 2. Motoneurons bei klinisch eindeutigen PLS Patienten nicht als Ausschlusskriterium.

2.1.2.3. Die Ausschlusskriterien

Unsere erarbeiteten Ausschlusskriterien bilden das Gegenstück zu den Einschlusskriterien: Ein Patient wurde dann ausgeschlossen, wenn er zu Beginn oder im Verlauf der Untersuchung von einem erfahrenen Arzt der beteiligten Zentren eine andere Diagnose als PLS erhielt:

1. Dies geschah zum Beispiel dann, wenn sich klinisch oder elektrophysiologisch eine deutliche Beteiligung des 2. Motoneurons zeigte, also die Prominenz des 1. Motoneurons nicht mehr gegeben war.
2. Wenn sich Hinweise in der Bildgebung, im Serumlabor, der Liquoranalyse, der elektrophysiologischen oder klinischen Untersuchung ergaben, die auf besser zu den Befunden passende Differentialdiagnosen hindeuteten.

Patienten, bei denen im Erkrankungsverlauf eines dieser Ausschlusskriterien zutraf, wurden aus der Datenbank entfernt und nicht in der Statistik berücksichtigt.

Für die Diagnosestellung war stets die Zusammenschau aller Befunde ausschlaggebend. Im Vordergrund stand dabei immer die Klinik und die Gesamterscheinung der Erkrankung.

2.1.3. Datenerhebung

Die Datenerhebung fand retrospektiv anhand eines standardisierten Datenerhebungsbogens statt. Dieser 8-seitige Erhebungsbogen wurde in Anlehnung an einen in der Neurologie der Universitäts- und Rehabilitationsklinik Ulm bereits existierenden Erhebungsbogen für ALS-Patienten weiterentwickelt.

Der Erhebungsbogen bestand aus insgesamt 4 Abschnitten: einem Abschnitt über die allgemeinen Daten der Patienten, einem Abschnitt zur Anamnese der Patienten, einem klinischen und, zu guter Letzt, einem Abschnitt über Befunde technischer Untersuchungen der Patienten. Besonderer Wert wurde auf die ausführliche Erörterung der klinischen Symptome der Patienten gelegt. Die klinischen Symptome machten damit den größten Bestandteil des Erhebungsbogens aus.

2.1.3.1. Allgemeiner Abschnitt des Datenerhebungsbogens

Anhand diese Abschnitts wurden persönliche Angaben der Patienten wie beispielsweise Name, Vorname, Geburtsdatum, Adresse und Hausarzt der Patienten erhoben. Weiter wurde zusammengetragen, in welchem neurologischen Zentrum der Patient betreut wurde und wann der erste Besuch des Patienten in diesem war. Auch das Körpergewicht und die Körpergröße wurden vermerkt. Der soziale Status des Patienten, wie etwa „Ist der Patient verheiratet und hat er Kinder?“, wurde in diesem Abschnitt festgehalten.
Ein weiterer Bestandteil des allgemeinen Teils waren die die PLS Erkrankung betreffenden Informationen. Also seit wann bestanden die Symptome, wie alt war der Patient zu diesem Zeitpunkt, begann die Erkrankung im Erwachsenenalter und war der Verlauf bis zum Erhebungszeitpunkt länger als 3 Jahre.

2.1.3.2. Anamnese der PLS Patienten

Im Anamnese Abschnitt dokumentierten wir positive Familienanamnesen hinsichtlich neuromuskulärer, psychiatrischer oder dementieller Erkrankungen. Ein weiterer Bestandteil war die Genussmittelanamnese bezüglich des Alkohol- oder Nikotin-Konsums. Zusätzliche Aspekte waren Begleiterkrankungen der Patienten, ob bereits eine genetische Untersuchung der Patienten durchgeführt worden war oder ob die Patienten schon an einer klinischen Studie teilnahmen.
Ferner wurde in diesem Teil die bisherige Krankengeschichte der Patienten genau erörtert. Beispielsweise, wo setzte die initiale Symptomatik ein: bulbär, im Rumpfbereich, an den oberen Extremitäten oder an den unteren Extremitäten, distal oder proximal.
Was war das initiale Symptom: Dysarthrie, Schmerzen, Paresen und so weiter. Ferner wurde eruiert, ob und seit wann der Patient vermehrt gestürzt war und ob er beim Gehen Hilfsmittel oder sogar einen Rollstuhl benötigte.
Patienten mit chronischen neurologischen Erkrankungen, darunter auch Patienten mit Motoneuronerkrankungen wie etwa die PLS, werden in Ulm halbjährlich zu Kontrolluntersuchungen eingeladen. Bei Motoneuronerkrankungen ist dies besonders wichtig, um den betroffenen Patienten die beste unterstützende Therapie zukommen zu lassen und die Lebensqualität der Patienten deutlich zu verbessern. Neben der

Verbesserung der Lebensqualität können so auch durch respiratorische Insuffizienz oder Mangelernährung hervorgerufene vorzeitige Todesfälle verhindert werden. Durch diese regelmäßigen ambulanten Besuche der Patienten war es möglich, den klinischen Verlauf einiger PLS Patienten zu beobachten. Unter dem Stichpunkt „Ausbreitung der Parese/Spastik im Verlauf“ wurden diese Beobachtungen festgehalten.

Ein weiterer Punkt, der durch die regelmäßigen Untersuchungen erfasst werden konnte, war die Diagnose selbst. Die genaue Diagnose der Patienten mit Motoneuronerkrankungen wurde bei jedem Besuch im Erhebungsbogen angegeben. Als Auswahlmöglichkeiten gab es PLS, ALS, SMA, andere MND oder Differentialdiagnosen. So konnte bei der Erfassung der Erhebungsbögen in der Datenbank sofort festgestellt werden, ob einer der PLS Patienten im Verlauf eine andere Diagnose erhalten hatte. Diese Fälle wurden in der Statistik nicht berücksichtigt, um die phänotypische Charakterisierung der PLS nicht zu verfälschen.

2.1.3.3. Klinischer Abschnitt

Der aktuellste neurologische Untersuchungsbefund wurde im klinischen Abschnitt festgehalten. Es wurde dokumentiert, wann der Patient untersucht worden war, von welchem Arzt und wie alt der Patient zu diesem Zeitpunkt war.
Der klinische Abschnitt war in zehn Komplexe unterteilt.

1. Komplex:
Der erste Komplex betraf die Motorik des Patienten:
Ließen sich zum Beispiel Atrophien an den oberen (OE) oder unteren Extremitäten (UE) erkennen, wurden Faszikulationen an den OE, UE oder generalisiert erfasst, zeigte sich eine muskuläre Hypotonie.

2. Komplex:
In diesem Teil wurden Paresen der oberen und unteren Extremitäten, proximal und distal, links und rechts ermittelt. Außerdem wurde erfasst, wie stark diese Paresen ausgeprägt

waren und ob eine Asymmetrie erkannt werden konnte.

3. Komplex:
Im dritten Komplex wurde der Muskeltonus der Patienten beschrieben, beispielsweise: „Wiesen die Patienten eine Spastik und/oder einen Rigor auf?“. Die Unterteilung der Spastik und des Rigors fand nach dem gleichen System wie die Erhebung der Paresen in obere und untere Extremitäten, distal und proximal sowie Auftreten von Asymmetrien statt.

4. Komplex:
In diesem ging es um die Einteilung der Reflexe.
Geprüft wurden der Bicepssehnenreflex, der Patellarsehnenreflex, der Achillessehnenreflex und der Palmomentalreflex. Unterschieden wurde dabei zwischen links und rechts. Die Reflexe wurden eingeteilt in normale, gesteigerte, kloniforme, abgeschwächte oder fehlende Reflexe.
Weiter wurde nach positiven Pyramidenbahnzeichen gesucht.

5. Komplex:
Der fünfte Bestandteil der klinischen Erhebung behandelte die Sensibilität:
War die Oberflächensensibilität, die Pallästhesie und Tiefensensibilität intakt. Gab der Patient andere sensible Symptome wie Kribbeln oder Taubheitsgefühle an.

6. Komplex:
Dieser Komplex war Auffälligkeiten hinsichtlich der Koordination gewidmet.

7. Komplex:
Hier betrachteten wir die bulbäre Symptomatik:
Gab es Zungenfibrillationen, Atrophien oder Paresen im Bereich der Zunge. Litt der Patient unter Sialorrhö, zähem Schleim oder Laryngospasmen. Konnte eine Anarthrie oder Dysarthrie erörtert werden und in welche Kategorie konnte diese eingeordnet werden:

bulbär oder pseudobulbär. Benötigten diese Patienten aufgrund der Dys- bzw. Anarthrie ein Kommunikationsgerät.

8. Komplex:

Unter Komplex 8 wurde die Ernährungssituation der Patienten erfasst:
War das Gewicht der Patienten konstant oder hatten sie ab- beziehungsweise zugenommen. Wie viel Gewicht war ab- oder zugenommen worden. Wie war die Gewichtsentwicklung in den letzten 3 Monaten und wie war das Gewicht des Patienten vor Beginn der Erkrankung.
Beklagten die Patienten Schluckbeschwerden im Rahmen einer Dysphagie. War die Nahrungskonsistenz fest oder bereits püriert. Wurde zusätzlich oder gar ausschließlich hochkalorische Kost zugeführt. Und wurden die Patienten bereits mit einer perkutanen endoskopischen Gastrotomie (PEG) versorgt.

Dieser Teil des Erhebungsbogen diente dazu, den Patienten bei deutlichem Gewichtsverlust die Versorgung mit hochkalorischer Kost oder gar PEG-Anlage anbieten zu können. Dies ist vor allem deshalb wichtig, da Untersuchungen gezeigt haben, dass eine frühe PEG Anlage die Prognose von ALS Patienten vor allem in jüngerem Alter und bei bulbärem Beginn deutlich verbessert [M.J. Pena,2012]. Wir gehen davon aus, dass diese Erkenntnis für PLS Patienten ebenso angewendet werden kann.

9. Komplex:

Der neunte Komplex befasste sich mit der respiratorischen Situation der Patienten:
Erlebten die Patienten Ruhe- oder Belastungsdyspnoe. Litten sie unter morgendlichen Kopfschmerzen, Schlafstörungen, Tagesmüdigkeit oder Konzentrationsstörungen. Und erhielten die Patienten bereits eine nicht-invasive oder invasive Heimbeatmung.

10. Komplex:

Im 10. und letzten klinischen Abschnitt registrierten wir weitere Symptome wie Muskelkrämpfe, pathologisches Lachen oder Weinen, Depression, Demenz, Angststörung,

Hypomimie, pathologische Augenbewegungen, imperativer Harndrang, Myalgien, Tremor und andere auffällige Symptome.

2.1.3.4. Medikation und Untersuchungsbefunde

Im letzten Teil des Erhebungsbogens ging es um die aktuelle Medikation der Patienten und vor allem darum, ob Riluzol, Vitamin E oder L-Dopa verabreicht wurde.
Weiter wurden Befunde der durchgeführten Untersuchungen dokumentiert wie zum Beispiel das Serumlabor, die Elektrophysiologie, die Aussage der MRTs der Halswirbelsäule und des Schädels sowie die Ergebnisse der Liquorpunktion. Diesen Abschnitt des Erhebungsbogens entwickelten wir zum einen, um die diagnostische Sicherheit zu gewährleisten, und zum anderen, um die Datenbank so vollständig wie möglich zu gestalten. Durch eine ausführliche Datenbank besteht die Möglichkeit, bei weiteren Projektideen sofort Zugriff auf wichtige Informationen zu haben.

Bei der Charakterisierung der Elektrophysiologie wurde auf Zeichen des 2. Motoneurons wie Fibrillationen, Faszikulationen, positive steile Wellen und chronischen neurogenen Umbau geachtet.

Hinsichtlich der MRTs wurde erfasst, ob relevante Auffälligkeiten wie in etwa Intensitätserhöhungen im MRT Schädel oder Kompressionen des Myelons im HWS MRT detektiert werden konnten.

Hinsichtlich der Liquoruntersuchungen wurde auf oligoklonale Banden (okB), positive Syphilis -, HTLV 1 und 2- Testung und auf Hinweise einer Lymekrankheit oder einer Schrankenstörung geachtet.

Abschließend wurde aufgelistet, ob eine Muskelbiopsie oder ein Fett- MRT durchgeführt worden war, ob eine neuropsychologische Untersuchung stattgefunden hatte und ob Lymphoblastenkulturen vorhanden waren.

2.1.4. Darstellung des Datenerhebungsbogens

Stammdatenblatt

Für Patienten mit Primärer Lateralsklerose (PLS)

Zentrum, Ansprechpartner:

Allgemeine Patientenangaben:

Name:

Vorname:

Geburtsdatum:

Adresse:

Telefonnummer:

Hausarzt:

Geschlecht: m o w o

Größe:

Körpergewicht:

BMI:

Verheiratet: ja o nein o

Datum des ersten Besuchs:

Diagnose:	ALS	o	Klinisch definitiv
		o	Klinisch wahrscheinlich
		o	Laborgestützt wahrscheinlich
		o	Klinisch möglich
	PLS	o	
	DD:		_____
	SMA	o	

Beginn der Erkrankung (Monat/Jahr):

Beginn im Erwachsenenalter: ja o nein o

Verlauf länger als 3 Jahre: ja o nein o

Alter bei Symptombeginn:

Alter bei Diagnosestellung:

Anamnestische Patientendaten:

Familienanamnese für neuromuskuläre Erkrankungen :

positiv (wenn ja, wer ist wie betroffen): _____

negativ o

positive Familienanamnese für Demenzen: ja o nein o

positive Familienanamnese für psychische Erkrankungen: ja o nein o

Anzahl und Geburtszeitpunkt der Kinder:

Geschlecht der Kinder:

Initiales Symptom:	Obere Extremität distal	o
	Obere Extremität proximal	o
	Untere Extremität distal	o
	Untere Extremität proximal	o
	Rumpf	o
	Bulbär	o

Wiederholte Stürze: nein o ja o seit wann_____ wie oft___

Gehhilfe: o Krücke o Rollator o Rollstuhl seit wann_____

Lokalisation der Paresen/ Spastik bei Erkrankungsbeginn:

Ausbreitung der Paresen/Spastik im Verlauf:

Erkrankungsstillstand/ Verbesserung der Symptome (wann/ wie lange):

Begleiterkrankungen:

Nikotin:

Alkohol:

Studienteilnahme:

Genetik abgenommen? ja _____ nein o

Verlaufsdaten

Datum des Besuchs:

Alter bei Untersuchung:

Untersucher:

Aktuelle Symptome:

1.) Motorik

Atrophien:	OE:	distal	o	proximal	o	
	UE:	distal	o	proximal	o	
		nein	o			
Faszikulationen:	OE	o	UE	o		
	generalisiert	o	nein	o		
Muskuläre Hypotonie:	OE	o	UE	o		
	nein	o				

2.) Paresen:

Obere Extremität	rechts	distal	ja	o	nein	o
		proximal	ja	o	nein	o
	links	distal	ja	o	nein	o
		proximal	ja	o	nein	o
Untere Extremität	rechts	distal	ja	o	nein	o
		proximal	ja	o	nein	o
	links	distal	ja	o	nein	o
		proximal	ja	o	nein	o
Asymmetrie der Parese			ja	o	nein	o

3.) Tonus:

Spastik:

Obere Extremität	rechts	distal	ja	o	nein	o
		proximal	ja	o	nein	o
	links	distal	ja	o	nein	o
		proximal	ja	o	nein	o

Untere Extremität	rechts	distal	ja	o	nein	o
		proximal	ja	o	nein	o
	links	distal	ja	o	nein	o
		proximal	ja	o	nein	o
Asymmetrie der Spastik			ja	o	nein	o

Rigor:

Obere Extremität	rechts	distal	ja	o	nein	o
		proximal	ja	o	nein	o
	links	distal	ja	o	nein	o
		proximal	ja	o	nein	o
Untere Extremität	rechts	distal	ja	o	nein	o
		proximal	ja	o	nein	o
	links	distal	ja	o	nein	o
		proximal	ja	o	nein	o
Asymmetrie des Rigors			ja	o	nein	o

4.) Reflexe:

BSR	rechts	gesteigert o	normal o	abgeschw. o	fehlend o	kloniform o
	links	gesteigert o	normal o	abgeschw. o	fehlend o	kloniform o
PSR	rechts	gesteigert o	normal o	abgeschw. o	fehlend o	kloniform o
	links	gesteigert o	normal o	abgeschw. o	fehlend o	kloniform o
ASR	rechts	gesteigert o	normal o	abgeschw. o	fehlend o	kloniform o
	links	gesteigert o	normal o	abgeschw. o	fehlend o	kloniform o
Palmomental		gesteigert o	normal o	abgeschw. o	fehlend o	kloniform o
Pyramidenbahnzeichen bds.			ja o	nein o		

5.) Sensibilität:

Störungen der Tiefensensibilität:	ja	o	nein	o
Auffälligkeiten der Oberflächensensibilität:	ja	o	nein	o
Auffälligkeiten der Pallästhesie:	ja	o	nein	o
Sensible Defizite i.e. Kribbeln, Taubheitsgefühl etc.:	ja	o	nein	o

6.) Koordination:

Auffälligkeiten des koordinativen Systems: ja o nein o

7.) Bulbäre Symptomatik:

Zungenfibrillation	ja	o	nein	o				
Zungenatrophie	ja	o	nein	o				
Zungenparese	ja	o	nein	o				
Sialorrhoe	ja	o	nein	o				
Zäher Schleim	ja	o	nein	o				
Laryngospasmen	ja	o	nein	o				
Dysarthrie	bulbär	o	pseudobulbär	o	Anarthrie	o	nein	o
Kommunikator	ja	o	nein	o				

8.) Ernährungssituation:

Aktuelles Gewicht:	___ kg	gewogen o	anamnestisch o
Gewicht vor Krankheitsbeginn:	___ kg		
Gewichtsentwicklung letzte 3 Monate:	___ kg		
Gewichtsabnahme:	ja o	wie viel_____	nein o
Gewichtszunahmen:	ja o	wie viel_____	nein o
Dysphagie:	ja o	seit: _____	nein o
Nahrungskonsistenz	fest o	püriert o	
Hochkalorische Nahrung:	ja o	seit: _____	nein o
PEG:	ja o	seit: _____	nein o

9.) Respiratorische Situation:

Ruhedyspnoe	ja o	seit: _____	nein o
Belastungsdyspnoe	ja o	seit: _____	nein o
Morgendliche Kopfschmerzen	ja o	seit: _____	nein o
Schlafstörungen	ja o	seit: _____	nein o
Tagesmüdigkeit	ja o	seit: _____	nein o
Konzentrationsstörungen	ja o	seit: _____	nein o
Nicht-invasive Heimbeatmung	ja o	seit: _____	nein o

Invasive Beatmung ja o seit: _____ nein o

10.) Weitere Symptome:

Muskelkrämpfe	OE o	UE o	nein o
Pathologisches Lachen/Weinen	ja o		nein o
Depression	ja o		nein o
Angststörung	ja o		nein o
Demenz	ja o		nein o
Myalgien:	ja o		nein o
Tremor	ja o		nein o
Imperativer Harndrang	ja o	seit wann_____	nein o
Hypomimie:	ja o		nein o
Auffälligkeiten der Augenbewegung:	ja o		nein o

Atypische Symptome (sensibel, zerebellär, Okulomotorik, autonom, etc.)

Aktuelle Medikation:

- Riluzol o ja o nein
- Vitamin E o ja o nein
- L-Dopa o ja o nein
- Sonstiges:

Elektrophysiologische Untersuchung:

Elektromyographie vorhanden ja o nein o

Elektromyographische Hinweise auf (subklinische) Beteiligung des 2. Motoneurons

(i.e. Fibrillation, positive scharfe Welle)	ja o	nein o
Motorische Neurographie vorhanden	ja o	nein o
Sensible Neurographie vorhanden	ja o	nein o
MEP der OE vorhanden	ja o	nein o
MEP der UE vorhanden	ja o	nein o
SSEP vorhanden	ja o	nein o

Laboruntersuchung (jeweils aktuellste Analyse):

Kreatinkinase (U/L) _____ (µmol/s*l)_____

Vitamin B12:

Folsäure:

Ghrelin bestimmt ja o nein o Wert:_____

Leptin bestimmt ja o nein o Wert_____

HDL _____

LDL _____

VLDL _____

Cholesterin _____

Methylmalonsäure:

Normales Serumlabor: ja o nein o

Paraklinische Untersuchung:

MRT Schädel vorhanden ja o nein o

Veränderungen im MRT Schädel ja o_____ nein o

Intensitätserhöhungen im MRT Schädel ja o nein o

MRT HWS vorhanden ja o nein o

Komprimierende Läsionen im Halsmark ja o _____ nein o

MRT Körperfettanalyse durchgeführt ja o nein o

Im Liquor vorhanden: nichts o OKB o Syphilis o HTLV1/2 o
Lyme Krankheit o Schrankenstörung o

Muskelbiopsie durchgeführt ja o nein o

Lymphoblastenkultur vorhanden ja o nein o

Neuropsychologische Untersuchung durchgeführt ja o nein o

Anhalt für dementielle Entwicklung ja o nein o

Terapieversuch mit L-Dopa

Durchgeführt: ja o nein o

Dosis:

Dauer:

Verbesserung: ja o nein o

ALS-FRS

1.) Speech

normal speech processes	o 4
detectable speech disturbances	o 3
intelligible with repeating	o 2
speech combined with nonvocal communication	o 1
loss of useful speech	o 0

2.) Salivation

normal	o 4
slight but definite excess of saliva in mouth	o 3
moderately excessive saliva, minimal drooling	o 2
marked excess of saliva with some drooling	o 1
marked drooling, constant tissue/handkerchief	o 0

3.) Swallowing

normal eating habits	o 4
early eating problems – occasional choking	o 3
dietary consistency changes	o 2
needs supplemental tube feeding	o 1
NPO (exclusive parenteral or enteral feeding)	o 0

4.) Handwriting

normal	o 4
slow or sloppy, all words are legible	o 3

not all words are legible o 2

able to grip pen, but unable to write o 1

unable to grip pen o 0

5.) a) Cutting food and handling utensils (patients WITHOUTH gastrostomy)

normal o 4

somewhat slow and clumsy, but no help needed o 3

can cut most foods, also clumsy and slow o 2

food must be cut by someone, can still feed slowly o 1

needs to be fed o 0

5.) b) Cutting food and handling utensils (patients WITH gastrostomy)

normal o 4

clumsy but able to perform all manipulations o 3

some help needed with closures and fasteners o 2

provides minimal assistance to caregiver o 1

unable to perform any aspect of task o 0

6.) Dressing and hygiene

normal function o 4

independent self-care with decreased efficiency o 3

intermittent assistance or substitute methods o 2

needs attendant for self-care o 1

total dependence o 0

7.) Turning in bed and adjusting bed clothes

normal o 4

somewhat slow and clumsy, but no help needed o 3

can turn alone or adjust sheets, great difficulty o 2

can initiate, but not turn or adjust sheets alone o 1

helpless o 0

8.) Walking

normal	o 4
early ambulation difficulties	o 3
walks with assistance	o 2
nonambulatory functional movement	o 1
no purposeful leg movement	o 0

9.) Climbing stairs

normal	o 4
slow	o 3
mild unsteadiness or fatigue	o 2
needs assistance	o 1
not possible	o 0

10.) Dyspnea

none	o 4
occurs when walking	o 3
occurs with one more: eating, bathing, dressing	o 2
occurs at rest, either sitting or lying	o 1
difficulty, considering mechanical support	o 0

11.) Orthopnea

none	o 4
some difficulty, does not routinely use >2 pillows	o 3
needs extra pillows to sleep (>2)	o 2
can only sleep sitting up	o 1
unable to sleep	o 0

12.) Respiratory insufficiency

none	o 4
intermittent use of BiPAP	o 3

continuous use of BiPAP at night	o 2
continuous use of BiPAP day and night	o 1
invasive mechanical ventilation by tracheostoma	o 0

2.1.5. Die statistische Auswertung

Die Patientendaten, die anhand des oben beschriebenen Datenerhebungsbogens erhoben wurden, wurden in eine Excel Datenbank übertragen.

Es erfolgte eine deskriptive Auswertung mit Hilfe von Excel.

Die Daten wurden jeweils anhand von absoluten (n) und relativen (%) Häufigkeiten beschrieben. Es wurden der Mittelwert, die Standardabweichung, Minimum und Maximum angegeben.

2.2. Material und Methoden der Liquorproteomanalyse

2.2.1. Darstellung der verwendeten Materialien

2.2.1.1. Chemikalien und Marker

1-Butanol	Merck
2-Iodacetamid	Merck-Schuchardt
Acrylamid-Bis, Fertiglösung 30%	Merck
Agarose (Ultrapure)	GIBCO BRL
APS (Ammoniumperoxidsulfat)	Merck
Baktolin	Bode
Bromphenolblau	Merck
BSA (Bovines Serum Albumin)	Sigma
CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propane sulfonate)	Amersham
DMF (Dimethylformamid, <0,005% H_2O)	Aldrich
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich
Ethanol, vergällt	Apotheke des Universitätsklinikums Ulm

Essigsäure, 100% wasserfrei	Merck
Formaldehyd	Merck
Glycin	AppliChem
Glycerin	Roth
Harnstoff	Merck
HCl, 25 %ige (Salzsäure)	Merck
IPG Puffer, pH 3-10	Amersham
L-Lysin	Sigma
Methanol reinst	Merck
Na-Acetat	AppliChem
Na-Carbonat	Merck
N, N –Dimethylformamid	Sigma-Aldrich
Na-EDTA (Natrium-Ethylendiamintetraessigsäure)	AppliChem
Na-Thiosulfat	Sigma
Roti® -Quant	Carl Roth GmbH
Roti®-Blue	Carl Roth GmbH
RPN 800	Amersham
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)	Serva
Silbernitrat	Fluka BioChemika
Temed (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Fluka BioChemika
Thioharnstoff	Merck
Tris (Trishydroxymethylaminomethane)	USB Corporation
Vaseline	Riedel-de Haën
Wasser, bidestilliert (dd H20)	Braun

2.2.1.2. Kits und IPG-Streifen

2-D Clean-Up Kit	Amersham
Aurum™ Serum Protein Mini Kit	Bio-Rad
Immobiline™ DryStrip, pH 3-10,	Amersham

18cm	
Ultrafree-0.5® Centrifugal Filter Devices	Millipore
Ultrafree-MC Konzentrator Biomax 5000	Millipore

2.2.1.3. Verwendete Farbstoffe

CyDye DIGE Fluor minimal dyes (Amersham):

- Cy 2 (5 nmol)
- Cy 3 (5 nmol)
- Cy 5 (5 nmol)

2.2.1.4. Herstellung der Dye Stock Solution (1 nmol/µl):

Die 3 verschiedenen oben beschrieben Fluoreszenzfarbstoffe „CyDye DIGE Fluor minimal dyes“ (jeweils 5 nmol) wurden bis zum Gebrauch in Eppendorfgefäßen tiefgefroren bei -30°C aufbewahrt. Vor Gebrauch wurden sie 5 Minuten auf Eis aufgetaut. In die 3 Eppendorfgefäße mit Cy2, Cy3 und Cy5 wurden dann jeweils 5 µl DMF (<0,005% H_2O) hinzu pipettiert. In jedem Eppendorfgefäß befand sich dann eine Mischung aus 5 nmol CyDye DIGE Flour minimal dyes und 5 µl DMF. Diese Mischung wurde für 30 s gevortext und anschließend für 30 s bei 12 000 x g zentrifugiert, um eine homogene Mischung zu erhalten.

2.2.1.5. Herstellung der Dye Working solution (400 pmol/µl):

Zu 5 µl, der im vorherigen Schritt hergestellten Dye Stock Solution (1 nmol/µl), wurden jeweils 7,5 µl DMF pipettiert. Diese Mischung wurde erneut 30 s gevortext und anschließend 30 s bei 1200 x g zentrifugiert.

2.2.1.6. Puffer

2.2.1.6.1. 10x SDS Elektrophoresepuffer:

Es wurden 721 g Glycin, 50 g SDS und 151 g Tris (Trishydroxymethylaminomethane) abgewogen und mit destilliertem Wasser auf 5 Liter aufgefüllt.

2.2.1.6.2. 10% SDS-Lösung:

Für die Herstellung der 10%igen SDS Lösung wurden 20 g SDS abgewogen und mit destilliertem Wasser auf 200 ml aufgefüllt.

2.2.1.6.3. 1,5 M Tris-HCl Puffer, pH 8,8:

182 g Tris wurde in 850 ml ddH_2O vollständig gelöst. Anschließend wurde mit einer pH Messelektrode der pH-Wert bestimmt und durch vorsichtiges Titrieren der 25%igen konzentrierten Salzsäure der pH auf 8,8 eingestellt. Dann konnte der Puffer mit ddH_2O auf 1 Liter aufgefüllt werden.

2.2.1.6.4. SDS Equilibrierungspuffer:

10 ml des hergestellten 1,5 M Tris-HCl Puffer, pH 8,8 wurden mit 72 g Harnstoff, 4 g SDS, 69 ml Glycerin und Bromphenolblau 0,01% (w/v) vermischt. Diese Mischung wurde mit ddH_2O auf 200 ml aufgefüllt und portioniert bei - 30°C gelagert.

2.2.1.6.5. IPG-/Fokussierpuffer (pH 3-10):

4,2 g Harnstoff, 1,5 g Thioharnstoff, 0,2 g CHAPS, 80 µl Ampholyt (pH 3-10) und Bromphenolblau 0,01% (w/v) wurden vermengt. Dieses Gemisch wurde mit ddH_2O auf 10 ml aufgefüllt und ebenfalls portioniert bei –30°C gelagert.

2.2.1.6.6. Labellingpuffer:

2,4 g Harnstoff, 18,2 g Tris und 0,2 g CHAPS wurden abgewogen und mit ddH_2O auf 5 ml aufgefüllt. Um den gewünschten pH Wert von 8,5 zu erhalten, wurde vorsichtig 1N HCL hinzutitriert. Anhand des Indikatorstäbchens konnte sofort abgelesen werden, ob der geforderte pH Wert erreicht wurde.

2.2.1.7. Darstellung der verwendeten Geräte

Electrophorese Power Supply	Amersham
Elektrophoresekammer (Ettan DALT*six*)	Amersham

ELISA	Tecan
Ettan DIGE Imager	Amersham
Feinwaage/ Analysewaage	Sartorius
Gelgießkammer	Amersham
Kühlanlage für Elektrophorese	Pharmacia Biotech
Kühlzentrifuge	Heraeus
Magnetrührer	Janke & Kunkel
MALDI TOF 4800 Analyzer	Applied Biosystems
Mikrowelle	Philips
pH-Indikatorstäbchen, pH 6,5-10	Merck
pH-Meter	WTW
Protean IEF Cell	Bio-Rad
Thermomixer comfort	Eppendorf
Vortex MS2	IKA

2.2.1.8. EDV

DeCyder™ Differential Analysis Software (Version 5.0)	Amersham
Image Quant (TL)	GE Healthcare

2.2.1.9. Verbrauchsmaterialien

96-well Platte	Sarstedt
Filterpapiere	Bio-Rad
Pipetten	Eppendorf
Pipettenspitzen	Eppendorf
Safe Lock Tubes (Eppendorfgefäß)	Eppendorf

2.2.2. Patientenproben

2.2.2.1. PLS Patientenproben

Für die Liquorproteomanalyse verwendeten wir Liquorproben von 9 PLS Patienten im Alter von 48 bis 75 Jahren. Der Altersdurchschnitt lag bei 63 Jahren. 4 dieser 9 Patienten waren

weiblich und 5 männlich. Die Liquorproben waren bereits im Rahmen der PLS Diagnostik entnommen worden. Aufgrund der Zustimmung der PLS Patienten konnten die für die Diagnostik nicht benötigten Liquorreste für die weitere Forschung in einem -80°C Gefrierschrank asserviert werden. Die Patienten waren folglich durch unsere Untersuchung keinen weiteren Risiken ausgesetzt. Die PLS Diagnose der Patienten war anhand der Ein- und Ausschlusskriterien, die bereits unter dem Punkt „Datenerhebung“ erläutert wurden, gestellt worden.

2.2.2.2. Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe bestand aus 9 gesunden Patienten. Diese 9 Patientenproben wurden passend zu den jeweiligen PLS Patienten alters- und geschlechtsgematcht ausgewählt. Die Liquorproben der Kontrollgruppe waren, wie bereits die Liquorproben der PLS Patienten, im Rahmen eines früheren klinischen Aufenthalts für diagnostische Zwecke entnommen und aufgrund der Zustimmung der jeweiligen Patienten bei -80°C für weitere Forschung eingefroren worden.

Die Liquorproben der Kontrollpatienten mussten ohne pathologische Auffälligkeiten sein und der Albuminquotient musste zu dem des jeweiligen alters- und geschlechtsgematchten PLS Patienten passen.

3 PLS Patient offenbarten eine isolierte Schrankenstörung. Wir suchten für diese 3 Patienten passende geschlechts- und altersgematchte Kontrollen, die ebenfalls eine isolierte Schrankenstörung in ähnlicher Ausprägung bei ansonsten unauffälligem Liquorbefund aufzeigten.

Bei allen Kontrollen handelte es sich um neurologisch gesunde Patienten, die aufgrund von Migräne, Schwindel, Spannungskopfschmerzen und zum Ausschluss einer Subarachnoidalblutung im RKU betreut worden waren.

Das Alter der Kontrollpatienten lag zwischen 41 und 74 Jahren, der Altersdurchschnitt lag bei 53 Jahren.

2.2.2.3. Tabellarische Darstellung einiger Daten der PLS Patienten und Kontrollen

Tabelle 3: Tabellarische Darstellung einiger deskriptiver Daten der PLS Patienten und Kontrollen. Proben der Liquor-Biobank des Universitätsklinikums Ulm ab 2011 bis zum Jahr 2012.

[Abkürzungen: MRC= Medical Research Council Scale; PLS= Primäre Lateralsklerose]

Variable	*PLS Patienten*	*Kontrollen*
Anzahl der Patienten (weiblich/ männlich)	9 (4/5)	9 (4/5)
Altersdurchschnitt (Altersspanne) in Jahren	63 (48-75)	53 (41-74)
Mittlere Erkrankungsdauer (Spannbreite) in Monaten	42 (2-96)	------
Mittelwert der Kraftgrade (Spannbreite) nach MRC	3/5 (1/5-5/5)	------
Albuminquotient (Spannbreite) x 10^{-3}	7,2 (2,3 -17,4)	7,1 (2,4- 12)

2.2.3. Die Aufkonzentration der Liquorproben

2.2.3.1. Vorbereitungen

Die Liquorproben mussten während der kompletten Durchführung der Liquorproteomanalyse immer kühl gelagert werden. Aus diesem Grund wurden die Proben direkt nach der Entnahme aus dem -80°C Gefrierschrank zur weiteren Verarbeitung auf Eis in einer Kühlbox ohne Deckel schonend aufgetaut. So sollte die

Zerstörung der Proteine durch Autolyse, selbst nachdem die Proben aufgetaut waren, verhindert werden. Wir verwendeten daher für die Zentrifugationen der Proben eine Kühlzentrifuge (Biofuge fresco). Diese wurde vor jeder Zentrifugation auf 4°C vorgekühlt. Während die Kühlzentrifuge vorkühlte und die Proben auf Eis auftauten, wurden die aus einem 5000 Da Filter-Cup und einem passenden 1,5 ml Zentrifugengefäß bestehenden „Ultrafree-0.5® Centrifugal Filter Devices“ Filtereinheiten aus einem handelsüblichen Kühlschrank entnommen. Diese Filtereinheiten mit einem Fassungsvermögen des Filters von 0,05-0,5 ml waren für den einmaligen Gebrauch gedacht. In das 1,5 ml Zentrifugengefäß, in dem der Filter platziert war, wurde destilliertes Wasser (ddH_2O) pipettiert, um das Austrocknen des Filters während des Zentrifugations-Vorgangs zu verhindern.

2.2.3.2. Aufkonzentration und Entsalzung der Liquorproben

In das Zentrifugengefäß wurden 300 µl ddH2O pipettiert. Dann wurde der Filter (Filter Cup) eingesetzt und mit maximal 500 µl Liquor befüllt. Da von manchen Liquorproben nur weniger als 500 µl vorhanden waren, wurden die betroffenen Proben bereits zu diesem Zeitpunkt wie in der folgenden Tabelle dargestellt gepoolt, um die Aufkonzentration der Proben um den Faktor 16-27 möglich machen zu können. Der Deckel der Filtereinheit wurde fest verschlossen und die gesamte Filter-Zentrifugationsgefäßeinheit für 15 min bei 12,000 x g in der zu diesem Zeitpunkt auf 4°C gekühlten Zentrifuge zentrifugiert. Nach erfolgter Zentrifugation wurde die Flüssigkeit, welche sich im Zentrifugengefäß gesammelt hatte, verworfen. Diese bestand aus ddH_2O und Bestandteilen des Liquors, welche während der Zentrifugation durch den Filter gepresst worden waren. Dieser Arbeitsschritt wurde so oft wiederholt, bis eine Aufkonzentration um den Faktor 16 bis 27 erreicht war. Nach der erfolgten Aufkonzentration wurde der Filter durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren der konzentrierten Probe ausgewaschen und dann die gesamte Probe aus dem Filter vorsichtig in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert. Das Auswaschen des Filters erfolgte, um bei der Zentrifugation angepresste Proteine in die Probe zurück zu bringen und nicht zu verlieren.

Die Proben waren nun aufkonzentriert und der Salzgehalt um 99% reduziert.

2.2.3.3. Tabellarische Darstellung der aufkonzentrierten PLS Liquorproben

Tabelle 4: Tabellarische Darstellung der aufkonzentrierten PLS Liquorproben. Proben der Liquor-Biobank des Universitätsklinikums Ulm ab 2011 bis zum Jahr 2012.

[Abkürzungen: µl = Mikroliter; PLS = Primäre Lateralsklerose]

PLS Proben	*Liquormenge (in µl)*	*Liquormenge nach Auf-konzentration (in µl)*	*Faktor der Auf-konzentration*
1	720	40	18
2	1020	40	25
3	640	40	16
4	825	30	27
5	180	gepoolt	gepoolt
6	1080	45	24
7	565	gepoolt	gepoolt
8	910	45	20
9	340	gepoolt	gepoolt
5 + 7+9 gepoolt	180+565+340 = 1085	40	27

2.2.3.4. Tabellarische Darstellung der aufkonzentrierten Kontroll Liquorproben

Tabelle 5: Tabellarische Darstellung der aufkonzentrierten Kontrollproben. Proben der Liquor-Biobank des Universitätsklinikums Ulm ab 2011 bis zum Jahr 2012.

[Abkürzungen: µl = Mikroliter]

Kontroll Proben	*Liquormenge (in µl)*	*Liquormenge nach Auf-konzentration (in µl)*	*Faktor der Auf-konzentration*
1	905	40	23
2	713	30	24
3	1130	25	45
4	565	23	25
5	735	45	16
6	1110	30	37
7	830	35	24
8	1250	40	31
9	557	25	22

2.2.3.5. Lagerung

Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die aufkonzentrierten Liquorproben im Gefrierschrank bei -80°C erneut zwischengelagert.

2.2.4. Die Aufreinigung der aufkonzentrierten Liquorproben

Alle Schritte erfolgten jeweils getrennt für Kontroll- und Patientenproben.

Ein Bestandteil des menschlichen Liquors sind Proteine. Hauptsächlich vertreten sind dabei Albumin und Immunglobulin G (IgG). Dies sind sehr große Proteine im Vergleich zu den restlichen Proteinen des Liquors. Diese großen Proteine erschweren den Durchlauf der 2D-Dige, indem sie den Lauf der Proteine durch das Gel behindern und durch ihre Größe kleinere Proteine mit gleichem isoelektrischen Punkt und gleichem Molekulargewicht verdecken. Diese kleinen, unbekannten Proteine erscheinen aber besonders interessant für die weitere Erforschung der PLS. Aus diesem Grund wurden

Albumin und IgG aus den Liquorproben entfernt. Dafür verwendeten wir das „Aurum Serum Protein Mini Kit“. Dieses beinhaltet Mikro-Bio-Spin-Säulchen, die mit einer Mischung aus Affigel Blue und Affigel Protein A gefüllt sind. Die in den Säulchen enthaltene Substanzen können das störende Albumin und IgG zu 90 % binden und aus dem Liquor entfernen.

2.2.4.1. Vorbereitung der Säulchen für die IgG- und Albuminentfernung

Das „Aurum Serum Protein Mini Kit“ wurde in einem handelsüblichen Kühlschrank gelagert und vor der Verwendung gekühlt entnommen.

Die Säulchen des Kits enthalten eine Flüssigkeit mit einer Mischung aus Affigel Blue und Affigel Protein A. Das Affigel Blue bindet Albumin. Affigel Protein A, welches von Staphyloccocus aureus stammt, bindet die FC Komponenten der IgG Moleküle. Die Liquorproben durchlaufen diese Reagenzien. Albumin und IgG kann so gebunden und aus dem Liquor entfernt werden.

Damit sich das in den Säulchen enthaltene Granulat in der Spitze der Säulchen absetzen kann, werden diese zuerst für 5 Minuten senkrecht in das im Kit vorhandene Teströhrchen gestellt.

Nach diesen 5 Minuten wurden die Spitzen der Säulchen abgebrochen und die Deckel derselben geöffnet. Über das Prinzip der Schwerkraft tropfte die Flüssigkeit aus den Säulchen in die Teströhrchen. Nachdem die Säulchen auf diese Weise bis auf das Granulat in den Spitzen entleert waren, wurden sie zweimalig mit jeweils 1 ml Binding Buffer gewaschen. Dieser entleerte sich ebenfalls bedingt durch die Schwerkraft und die abgebrochenen Spitzen in die Teströhrchen.

Nach dem Waschen nahmen wir die Säulchen aus den Teströhrchen und platzierten sie in Eppendorfgefäßen mit jeweils 2,0 ml Fassungsvermögen. Die restliche Flüssigkeit in den Säulchen wurde durch Zentrifugation bei 10 000 x g für 20 s in die Eppendorfgefäße abzentrifugiert. Das Granulatbett in den Säulchen war jetzt trocken. Wir setzten die abgebrochenen Spitzen erneut auf die Säulchen und stellten sie in frische Eppendorfgefäße. Die Eppendorfgefäße mit der abzentrifugierten Restflüssigkeit wurden verworfen. Die Vorbereitung war damit abgeschlossen.

2.2.4.2. IgG- und Albuminentfernung

Die gesammelten und aufkonzentrierten Liquorproben wurden aus dem -80°C Gefrierschrank genommen und auf Eis aufgetaut. 60 µl Liquor wurden jeweils mit Binding Buffer auf ein Gesamtvolumen von 240 µl aufgefüllt. Von diesen angesetzten 240 µl wurden zuerst nur 200 µl auf die zuvor präparierten Säulchen pipettiert.
Nach der Gabe dieser Mischung aus Liquor und Binding Puffer auf die Säulchen wurden diese kurz vorsichtig gevortext, um eine gute Durchmischung zu erhalten. Dann folgte eine 5-minütige Inkubationszeit, in welcher Albumin und IgG gebunden werden konnten. Um ein möglichst gutes Ergebnis zu erzielen, wurden die Proben nach der Inkubationszeit erneut kurz vorsichtig gevortext und es erfolgte eine weitere Inkubationszeit von 5 Minuten. Zum Abschluss erfolgte ein letztmaliges vorsichtiges Vortexen der Proben und eine nachfolgende Inkubation von 1 Minute. Nach dem Beenden der Aufreinigung der Proben wurden die Spitzen der Säulchen entfernt und die Säulchen in frische Eppendorfgefäße gestellt. Dann erfolgte die Zentrifugation der Säulchen in den Eppendorfgefäßen in der Kühlzentrifuge bei 10 000 x g über 20 Sekunden. Dieses 1. Filtrat war nun bis zu ca. 80% Albumin und IgG aufgereinigt. Beides war in den Reagenzien der Säulchen gebunden. Es erfolgte derselbe Durchgang mit den restlichen 40 µl Liquor-Binding-Buffer-Gemischen, zu diesen 40 µl wurde nochmal 100 µl Binding Puffer pipettiert. Nach dem Beenden des Durchgangs entsprach dies Filtrat 2. Filtrat 1 und 2 wurden nun wieder vereinigt. Die Aufreinigung der Proben war nun abgeschlossen. Die Proben wurden in diesen Eppendorfgefäßen bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

2.2.4.3. Lagerung

Die Lagerung der aufgereinigten Liquorproben erfolgte erneut bei -80°C im Gefrierschrank.

2.2.5. Die Proteinbestimmung

2.2.5.1. Herstellung der BSA (Bovines Serum Albumin)-Eichreihe:

Für die Proteinbestimmung musste zuerst eine BSA-Eichreihe angesetzt werden. Dafür wurden 2mg/ml BSA-Fertiglösung von Biorad als Ausgangslösung für die Verdünnungsreihe verwendet.

Im 1. Schritt wurde eine 400 µg/ml Stocklösung hergestellt. Bei der Herstellung muss sehr genau pipettiert werden. 200 µl der 2 mg/ml BSA-Fertiglösung wurden mit 800 µl ddH_2O vermischt. Das ergab die gewünschte 400 µg/ml Stocklösung. Im 2. Schritt wurde eine 100 µg/ml Stammlösung hergestellt, in dem 1 ml aus der 400 µg/ml Stammlösung in 3 ml ddH_2O gelöst wurde.

Mit dieser Stammlösung konnte die Verdünnungsreihe nach einem vorgefertigten Pippetierschema hergestellt werden (siehe Tabelle unten).

2.2.5.2. Tabellarische Darstellung des Pippetierschemas zur Herstellung der Eichreihe

Tabelle 6: Tabellarische Darstellung des Pippetierschemas zur Herstellung der Eichreihe zur Bestimmung der Proteinkonzentration. Proben der Liquor-Biobank des Universitätsklinikums Ulm ab 2011 bis zum Jahr 2012. [Abkürzungen: BSA = Bovines Serum Albumin; ddH_2O = bidestilliertes Wasser; µg = Mikrogramm; ml = Milliliter]

BSA-Konzentration (µg/ml)	*µl aus BSA-Stammlösungen*	*ddH_2O (µl)*
0	-	110
20	40 µl aus 100 µg/ml	160
30	45 µl aus 100 µg/ml	105
40	80 µl aus 100 µg/ml	120
50	60 µl aus 100 µg/ml	60
60	120 µl aus 100 µg/ml	80
80	160 µl aus 100 µg/ml	40
100	200 µl aus 400 µg/ml	600

Mit Hilfe dieser Eichreihe konnten wir die Proteinkonzentration unserer Liquorproben ermitteln. Die Proteinkonzentration der einzelnen Standardverdünnungsproben war bekannt, die der Liquorproben nicht.

2.2.5.3. Herstellung der Roti®-Quant-Verdünnung:

2 ml des Roti®-Quant Reagenz wurde mit 5,5 ml ddH_2O vermischt.

2.2.5.4. Die Durchführung der Proteinbestimmung:

Die Proteinbestimmung erfolgte in Mikrotiterplatten mit Hilfe von Roti-Quant-Reagenz: Auf eine 96-well Mikrotiterplatte wurden je 2 Reihen wells mit jeweils 50 µl der vorbereiteten Standardverdünnungsreihe, wie oben in der Tabelle dargestellt, befüllt. Für jede Verdünnung musste eine neue Pipettenspitze verwendet werden, um die Proteinkonzentration der Proben nicht zu verfälschen.
Von den inzwischen gepoolten Patientenproben wurden ebenfalls 50 µl in neben der Standardverdünnungsreihe liegende wells pipettiert. Dies erfolgte nur einreihig, um zum Schluss möglichst viel Liquor für das Befahren der Gele übrig zu haben. Das Pipettieren musste luftblasenfrei erfolgen.
Abschließend wurde sowohl zu den Liquorproben als auch zu der Standardverdünnungsreihe jeweils 200 µl der Roti®-Quant-Verdünnung pro well pipettiert und vermischt. Auch hier musste für jedes well eine neue Pipettenspitze verwendet werden, um die Proben nicht zu verfälschen. Die so befahrene Mikrotiterplatte wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
Anschließen wurde die optische Dichte, also die Extinktion der Proben, mit Hilfe eines ELISA Messgerätes bestimmt. An dem Messgerät waren folgende Parameter eingestellt:
Messfilter: 590 nm
Referenzfilter: 405 nm

2.2.6. Die Protein-Präzipitation

Für die Durchführung der 2D-Gelelektrophorese mussten die Proteine zuvor in einem speziellen Fokussierpuffer gelöst werden. Die Löslichkeit der Proteine wird allerdings durch Bindungen an andere Komponenten im Liquor verschlechtert. Um diese

Beeinträchtigung der Löslichkeit auszuschalten, mussten die Proteine ausgefällt und dann, frei von störenden Komponenten, erneut im Fokussierpuffer gelöst werden. Diese Protein-Präzipitation erfolgte anhand eines „2-D Clean-Up Kits“. Dieses Kit hat den Vorteil, dass die Elektrophorese störenden Substanzen, wie unter anderem Salze, Lipide und Nukleinsäuren, entfernt werden können und dadurch die Effizienz der isoelektrischen Fokussierung (IEF) und der Farbstoffmarkierung verbessert wird. Auf diese Weise können die Proteine im Gel später besser dargestellt werden.

2.2.6.1. Die Vorbereitung der Protein-Präzipitation

Der benötigte Waschpuffer wurde, wie in der Anleitung des 2-D Clean-Up Kit verlangt, für 60 Minuten bei -20°C gekühlt. Währenddessen wurden die Liquorproben aus dem Gefrierschrank entnommen und auf Eis aufgetaut. Die Kühlzentrifuge wurde auf 4°C vorgekühlt.

2.2.6.2. Die Durchführung der Protein-Präzipitation:

Es wurden jeweils 100 µl Liquor und 300 µl Präzipitant in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert. Diese Mischung wurde kurz gevortext und anschließend für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde zusätzlich 300 µl Co-Präzipitant zugegeben, diese Mischung wurde erneut gevortext und dann in die Kühlzentrifuge gestellt. Die Deckelscharniere der Eppendorfgefäße sollten dabei nach außen zeigen. Das Protein Pellet, welches sich bei der Zentrifugation bildete, konnte sich somit immer an derselben Stelle der Eppendorfgefäße ablagern und war damit sofort auffindbar. Die Zentrifugation erfolgte bei 10 000 x g.

Nach der Zentrifugation war die Flüssigkeit im Eppendorfgefäß proteinfrei und konnte vorsichtig, ohne das gebildete Pellet zu zerstören, abpipettiert werden. Um die restliche Flüssigkeit aus den Pellets zu drainieren, wurden die Eppendorfgefäße erneut, ebenfalls mit den Scharnieren nach außen, in die Zentrifuge gestellt und bei 10 000 x g kurz zentrifugiert. Die durch diese Zentrifugation gesammelte restliche Flüssigkeit wurde ebenfalls vorsichtig abpipettiert. Auf die Protein Pellets erfolgte eine letzte Gabe von 40 µl Co-Präzipitant und eine Inkubation von 5 Minuten auf Eis. Nach der erneuten

Zentrifugation bei 10 000 x g für 5 Minuten wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert. Zum Schluss erfolgte das Waschen der Protein Pellets mit jeweils 25 µl ddH_2O. Diese Mischung wurde 15 Sekunden gevortext und mit 1ml Waschpuffer und 5 µl Wash additive ergänzt. Dies wurde solange gevortext, bis sich das Protein Pellet im Eppendorfgefäß aufgelöst hatte.
Die Eppendorfgefäße mit den gelösten Protein Pellets wurden zur Vollendung der Waschung für 30 Minuten bei -20°C gelagert. Die Kühlzeit wurde alle 10 Minuten unterbrochen, um die Proben 30 Sekunden zu vortexen. Nach Abschluss der Inkubationszeit erfolgte die Zentrifugation der Proben bei 10 000 x g für 5 Minuten. Der produzierte Überstand, mit dem verbrauchten Waschpuffer, wurde vorsichtig aus den Eppendorfgefäßen pipettiert. Die Protein Pellets, die sich bei der Zentrifugation erneut gebildet hatten, wurden kurz luftgetrocknet und dann im Labellingpuffer aufgenommen.

2.2.7. Labelling und Farbstoffmarkierung

Benötigt wurden der Labellingpuffer und die Dye Working Solution. Die Herstellung dieser beiden Detergenzien wurde bereits unter den Punkten Puffer und Farbstoffe beschrieben. Die Farbstoffmarkierung erfolgte im abgedunkelten Raum auf Eis. Die Kühlzentrifuge wurde auf 4°C vorgekühlt.

2.2.7.1. Aufnahme der Proben im Labellingpuffer

Der Proteingehalt unserer Proben war bei der Proteinbestimmung bereits detektiert worden. Pro 2 µg Protein wurden die Proben mit 1 µl Labellingpuffer versetzt.

2.2.7.2. Bildung des Internen Standards (IS):

Der Interne Standard (IS) bestand jeweils zur Hälfte aus dem präparierten Material des PLS Pools und dem Material der alters- und geschlechtsgemachten Kontrollen.

2.2.7.3. Labelling und Farbstoffmarkierung des Probenpools

Über die N-Hydroxysuccinimid (NHS) reaktive Gruppe der verwendeten Farbstoffe können die Proteine markiert werden, indem sie eine Amidverbindung mit den Lysinresten der

Proteine eingehen. Das Ziel ist jedes Protein an seinem Lysinrest zu markieren. Dafür muss das Verhältnis zwischen Protein- und Farbstoffmenge stimmen. Diese Methode wird „minimal Labelling“ genannt. Um die beste mögliche Markierung zu erhalten, wurden 160 ρmol Fluoreszenzfarbstoff für 20 µg Protein verwendet.
Diese Mischung wurde gevortext, kurz zentrifugiert und für 30 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert. Um die Auswirkungen des Farbstoffs auf Wanderung der Proteine im Gel und damit auf die Ergebnisse des Versuchs möglichst gering zu halten, wurden die Proben für jedes Gel mit einem anderen Farbstoff markiert. Siehe Tabelle 7 unten.

2.2.7.3.1. Tabellarische Darstellung der Farben Zuordnung zu den jeweiligen Proben

Tabelle 7: Tabellarische Darstellung der unterschiedlichen Markierungen der PLS und Kontroll Proben. Proben der Liquor-Biobank des Universitätsklinikums Ulm ab 2011 bis zum Jahr 2012.
[Abkürzungen: Cy2, Cy3, Cy5 = verwendeten CyDye-Farbstoff; PLS= Primäre Lateralsklerose]

Probenart	*Farbstoff Zuordnung Gel 1*	*Farbstoff Zuordnung Gel 2*
PLS Proben	Cy5	Cy3
Kontrollgruppe	Cy3	Cy5
Interner Standard	Cy2	Cy2

Um die farbliche Markierung der Proteine abzuschließen, wurde letztendlich 2,8 µl Lysin (2 mM) zugegeben. Dieses ging eine Verbindung mit der NHS reaktiven Gruppe des Farbstoffs ein und beendete so die Reaktion. Die Lysin Protein Farbstoff Mischung wurde kurz gevortext, zentrifugiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert.
Zum Schluss wurden alle mit Farbstoff markierten Proben vereint. Dies ergab ein Endvolumen von 42 µl. Die Proben wurden dann bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

2.2.7.3.2.Labelling-Protokoll

Gel 1:

Tabelle 8: Labelling-Protokoll der PLS und Kontroll Proben im 1. Gel. Proben der Liquor-Biobank des Universitätsklinikums Ulm ab 2011 bis zum Jahr 2012.

[Abkürzungen: Cy2, Cy3, Cy5 = verwendete CyDye-Farbstoffe; IS = Interner Standard; µg = Mikrogramm; µl = Mikroliter; mM = Millimol/ L; pmol = pikomol; PLS = Primäre Lateralsklerose; V = Volumen]

Probe	*V. des Pools in Labelling -puffer [in µl]*	*160pmol CyDye*	*Lysin 2mM [in µl]*	*End-V. [in µl]*
Kontroll -Pool (K) [20 µg]	10	1,28 µl Cy3	2,8	14
PLS-Pool (P) [20 µg]	10	1,28 µl Cy5	2,8	14
IS-Pool [10µg P + 10µg K]	5 + 5	1,28 µl Cy2	2,8	14

Gel 2:

Tabelle 9: Labelling-Protokoll der PLS und Kontroll Proben im 2. Gel. Proben der Liquor-Biobank des Universitätsklinikums Ulm ab 2011 bis zum Jahr 2012.

[Abkürzungen: Cy2, Cy3, Cy5 = verwendete CyDye-Farbstoffe; IS = Interner Standard; µg = Mikrogramm; µl = Mikroliter; mM = Millimol/ L; pmol = pikomol; PLS = Primäre Lateralsklerose; V = Volumen]

Probe	*V. des Pools in Labelling -puffer [in µl]*	*160pmol CyDye*	*Lysin 2mM [in µl]*	*End-V. [in µl]*
Kontroll-Pool (K) [20 µg]	10	1,28 µl Cy5	2,8	14
PLS-Pool (P) [20 µg]	10	1,28 µl Cy3	2,8	14
IS-Pool [10µg P + 10µg K]	5 + 5	1,28 µl Cy2	2,8	14

2.2.8. Die Rehydratisierung

Der bei -20°C gelagerte Fokussierpuffer wurde aufgetaut und mit jeweils 2 mg DTT pro 500 µl Fokussierpuffer versetzt.

Die im vorherigen Schritt markierten Proben wurden mit dem hergestellten Puffer für jeden IPG Streifen von 18 cm auf 340 µl aufgefüllt.

Dann erfolgte die Rehydratisierung. Dafür wurden die Mischung aus Puffer und Probe in einen Tray des Protean Cell von Bio-Rad gegeben. In diese 340 µl Gesamtvolumen wurden die IPG-Streifen mit der Gel-Seite nach unten eingelegt. Durch vorsichtiges Schwenken des Streifens in der Flüssigkeit wurde die Gelschicht vollkommen benetzt.

Der so präparierte Streifen wurde mit 1,5ml Dry Strip Cover Fluid überschichtet, um ein Austrocknen der IPG-Streifen mit dem darauf fixierten Probenmaterial zu verhindern und gleichzeitig eine gleichmäßige Temperaturverteilung zu gewährleisten.
Die Rehydratisierung erfolgte dann aktiv bei 50 V für 20 Stunden, dabei konnten auch größere Proteine in das Gel eindringen.

2.2.9. Die Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Der größte Vorteil der 2D-DIGE ist die Möglichkeit, die Proteine sowohl nach ihrer Größe als auch nach ihrer Ladung auftrennen zu können. Dadurch kann die Auftrennung der Proteine sehr viel feiner erfolgen und dadurch können auch kleinere und viele verschiedene Proteine bestimmt werden. Bei der IEF erfolgt der 1. Schritt der 2D-DIGE, die Auftrennung der Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt. Zunächst wurden zwischen die präparierten und rehydratisierten IPG Streifen und den Elektrodrähten an beiden Polen im Tray mit ddH_2O befeuchtete Filterpapierstreifen gelegt. Durch dieses wurde der restliche Salzgehalt der Liquorproben nochmals reduziert. Das so vorbereitete Tray wurde in die Protean IEF Cell eingesetzt und die IEF nach einem speziellen Fokussierprotokoll durchgeführt. Während der IEF wurde eine konstante Temperatur von 20°C eingehalten.

2.2.9.1. Tabellarische Darstellung des Fokussierprotokolls

Tabelle 10: Tabellarische Darstellung des Fokussierprotokolls der PLS und Kontroll Proben. Proben der Liquor-Biobank des Universitätsklinikums Ulm ab 2011 bis zum Jahr 2012.

[Abkürzungen: h = Stunde; IEF = Isoelektrische Fokussierung; PLS = Primäre Lateralsklerose; V = Volt]

Schritt	*Spannung (in V)*	*Dauer*
Beginn IEF	500	1:30 h
Konstante IEF	1000	1:30 h
IEF Gradient	1000-8000	2:00 h
Konstante IEF	8000	4:00 h
Schonmodus	500	bis Abbruch

2.2.10. Die vertikale Gelelektrophorese

Die vertikale Gelelektrophorese ist der 2. Schritt der Auftrennung der Proteine. Bei diesem Schritt werden die Proteine, die bereits bei der isoelektrischen Fokussierung nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt wurden, nach ihrem Molekulargewicht vertikal getrennt.

2.2.10.1. Die Herstellung der Gele für die vertikale Gelelektrophorese

Die Glasplatten, welche für die Gelherstellung benötigt werden, wurden mit Baktolin gründlich gereinigt und mit ddH_2O abgespült. Danach wurden sie luftgetrocknet. Die Platten sollten so faser-, rückstands- und bakterienfrei wie möglich sein, um eine Verunreinigung zu verhindern und so die spätere Auswertung nicht zu erschweren oder gar zu verfälschen.

2.2.10.1.1. Herstellung der APS Lösung

Direkt vor dem Gebrauch wurde die APS Lösung hergestellt. Dazu wurde 1 g APS abgewogen und mit ddH_2O auf 10 ml aufgefüllt.

2.2.10.1.2. Temed-Lösung

Wie die APS Lösung wurde die Temed-Lösung direkt vor dem Gebrauch hergestellt. Dafür werden 100 µl Temed mit 900 µl ddH_2O vermengt.

2.2.10.1.3. Herstellung des Ansatzes für sechs 10%ige Acrylamidgele

Zuerst wurde die Plattengießeinheit vorbereitet. Die gründlich gereinigten Glasplatten wurden eingelegt. Dann wurden 150 ml 1,5 M Tris-HCl Puffer, pH 8,8, 237 ml ddH_2O und 6 ml 10% SDS 6 und 200 ml Bis-Acrylamid (30%ig) sehr gut vermischt. Anschließend wurden 6 ml der frisch hergestellten APS-Lösung und 1 ml der frischen Temed-Lösung zugegeben. Diese Mischung wurde mit Hilfe eines Trichter vorsichtig in die Vorrichtung gegossen. Zum Schluss wurde noch eine dünne Lage Butanol vorsichtig darauf pipettiert. Durch diese Überschichtung sollte eine glatte und gleichmäßige Oberfläche der Gele erzielt werden. Die Gele blieben zur Auspolimerisation ca. 60 Minuten unter dem Abzug bei

Raumtemperatur stehen.
Nach diesen 60 Minuten wurde das Butanol vorsichtig abgegossen. Die Gele zwischen den Glasplatten waren jetzt fest. Diese Glasplatten-Geleinheiten wurden mit ddH_2O gründlich gereinigt und dann in feuchten Papiertüchern im Kühlschrank bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Durch die feuchten Tücher wurde das Austrocknen der Gele verhindert.

2.2.10.1.4. Verdünnung des 10x SDS Elektrophoresepuffers

Für die Verdünnung des 10x SDS Elektrophoresepuffers auf 1x SDS Elektrophoresepuffer wurden 500 ml 10x SDS-Elektrophoresepuffer mit ddH_2O auf 5 l aufgefüllt.
Für die Verdünnung auf 2x SDS Elektrophoresepuffer wurden 200 ml 10x SDS-Elektrophoresepuffer mit ddH_2O auf 1 l aufgefüllt.

2.2.10.1.5. Die Herstellung der Marker und Agaroselösung

Für die Herstellung der Agaroselösung wurden 125 mg Agarose abgewogen und in 25 ml zuvor hergestelltem 1x SDS Elektrophoresepuffer gelöst. Diese Mischung wurde mit 10 µl Bromphenolblau (0,25% (w/v) in Tris/HCl) vermengt und kurz in der Mikrowelle aufgekocht.
Für die Herstellung der Marker wurden 10 µl des RPN 800 auf ein Filterpapier pipettiert und bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

2.2.10.2. Die Äquilibrierung des IPG-Streifens

Bei der Äquilibrierung handelt es sich um eine Reduktions- und Alkylierungsreaktion der Proteine auf den IPG- Streifen. Für die optimale Auftrennung mittels vertikaler Gelelektrophorese ist es wichtig, die Proteine möglichst vollständig zu entfalten und Proteinaggregate zu vermeiden.
Die Äquilibrierung wurde in 2 Schritten durchgeführt. Benötigt wurde dafür der DTT- und der Iodacetamid-Puffer.

2.2.10.2.1. Herstellung des DTT- Puffers

Dazu wurden 100 mg DTT in 10 ml SDS Äquilibrierungspuffer gelöst.

2.2.10.2.2. Herstellung des Iodacetamid-Puffers

Dafür wurden 250 mg Iodacetamid ebenfalls in 10 ml SDS Äquilibrierungspuffer gelöst.

Nach der erfolgten IEF wurden die IPG Streifen zuerst in 2x SDS Elektrophoresepuffer gereinigt und anschließend im 1. Schritt jeweils 15 Minuten in einem Röhrchen mit 10 ml DTT-Puffer und im 2. Schritt 15 Minuten in einem Röhrchen mit 10 ml Iodacetamid-Puffer geschwenkt.

2.2.10.3. Aufbringen und Fixierung von IPG-Streifen und Marker

Um den IPG-Streifen nach der Äquilibrierung zu reinigen, wurde er in 1x SDS Elektrophoresepuffer geschwenkt. Danach wurde der Streifen auf das vorbereitete Gel aus dem Kühlschrank gelegt und mit einem Spatel möglichst mittig platziert. Das zuvor mit dem Marker getränkte Filterpapier wurde ebenfalls mit einem Spatel direkt am Pluspol des IPG- Streifens auf dem Gel platziert. Die 60°C warme Agaroselösung wurde vorsichtig und möglichst luftblasenfrei auf Streifen und Marker pipettiert. Dann ließen wir die Agarose aushärten.

2.2.11. Die Elektrophorese und anschließende Fixierung der Gele

Die präparierten Gele wurden jetzt in das Ettan DALT Elektrophoresesystem eingebracht. Dieses System besteht aus 6 Ettan DALT*six* Elektrophoresis Unit, einem Transformator und einer zirkulierenden Kühlanlage. Die restlichen Elektrophorese Einheiten, die nicht mit einem Gel belegt waren, wurden mit speziellen Kunststoffplatten befüllt. Die untere Kammer wurde dann mit dem hergestellten 1x SDS Elektrophoresepuffer und die oberen Kammer mit 2x SDS Elektrophoresepuffer gefüllt.
Das Kühlaggregat wurde auf 20°C eingestellt. Die Elektrophorese wurde mit einer Leistung von 38 W durchgeführt. Die Elektrophorese dauerte etwa 4 Stunden, dann war die Lauffront der Proteine noch circa 1 cm vom unteren Rand des Gels entfernt.

Die Elektrophorese wurde gestoppt und die Gele entnommen.
Die Gele blieben in ihren Glasplatten. Diese wurden mit ddH_2O abgewaschen und sehr gründlich fusselfrei getrocknet, um das Einscannen und die spätere Auswerten nicht zu stören.

2.2.11.1. Das Einscannen und Auswerten der Gele

2.2.11.2. Das Einscannen

Mit Hilfe des Ettan DIGE Imager von Amersham wurden die Gele einzeln eingescannt.
Das Scannen erfolgte mit 3 verschiedenen Anregungswellenlängen bzw. Emmissionsfiltern, um die verschieden gefärbten Proteinspots in das Programm einzulesen:
Cy2 (IS): 488/ 520 nm
Cy3 (Kontrolle): 532/ 580 nm
Cy5 (PLS): 633/ 670 nm

2.2.11.3. Die Auswertung der eingescannten Gele

Die Auswertung der eingescannten Gele erfolgte mit Hilfe der DeCyder™ Differential Analysis Software (Version 5.0). Diese Software ermöglicht es, die mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Proteine im gleichen Gel parallel zu detektieren. Das Programm vergleicht mit Hilfe einer log Transformation die von der Software gemessenen Volumenverhältnisse der einzelnen Spots von Kontrolle, PLS Patienten und IS und erstellt daraus ein Häufigkeits-Histogramm. Über den Höhepunkt des Histogramms kann eine Modellkurve über die Normalverteilung der Proteine erstellt werden. Der Höhepunkt ist dabei die Nullstelle der x-Achse. Es wird die 2-fache Standardabweichung der Modellkurve errechnet. D.h., dass 95% der Proteine, die in den Rahmen der Modellkurve fallen, einer gesunden Patientenpopulation angehören.
Anhand dieser Modellkurve lassen sich die unterschiedlichen Volumenverhältnisse der Proteine von PLS und Kontrolle darstellen. Im Programm lässt sich einstellen, wie groß die Protein-Volumendifferenz sein sollte, die im Vergleich zu dieser Modellkurve angezeigt wird. Die Spots ab einem Regulationsfaktor von +/-1,1 werden markiert.

Die Vergleichbarkeit der beiden Gele wurde durch die Verwendung des Internen Standards gesichert.
So konnten eventuelle falsch positive Varianzen zwischen den PLS und Kontroll-Proben im selben Gel oder auch durch die Gele bedingte Unterschiede ausgeschlossen werden. Damit konnten auch sehr kleine Proteinmengendifferenzen mit großer Zuverlässigkeit gemessen werden.

2.2.11.4. Die Statistik

Um zu überprüfen, ob unsere durch die DeCyder™ Differential Analysis Software (Version 5.0) erhobenen Ergebnisse signifikant sind, wendeten wir den Student-T-Signifikanz Test an. Dieser Test wird empfohlen, da er vor allem auch bei kleinen Populationen, wie in unserem Fall, sinnvoll angewendet werden kann [WT. Shaw, 2006].
Mit Hilfe dieses Tests werden die Daten zweier verschiedener Populationen untersucht und festgestellt, ob sich die beiden Populationen signifikant unterscheiden [R. Bonita, 2006]. In unserem Fall waren die zu unterscheidenden Populationen die Kontrollgruppe und die PLS Patientengruppe. Als Unterscheidungsmerkmal dieser Populationen wurde die Proteinzusammensetzung der Proben-Pools gewählt.
Zuerst musste die Nullhypothese aufgestellt werden, dass sich beide Populationen in ihrer Proteinzusammensetzung nicht unterscheiden[R. Bonita, 2006]. Der Student-T-Test errechnete dann den P- Wert. Das Signifikanzniveau entsprach $p \leq 0{,}05$. Dies zeigte, dass unsere Nullhypothese falsch war, was bedeutete, dass sich unsere beiden Populationen in der Liquor-Proteinzusammensetzung unterschieden und unsere Untersuchung statistisch signifikant war [WT. Shaw, 2006].

2.2.12. Silberfärbung der Polyacrylamidgelen

2.2.12.1. Fixierung der Gele

Für die Fixierung der Proteine in den Gelen wurden 400 ml Ethanol und 100 ml Essigsäure mit ddH_2O auf 1 Liter aufgefüllt. Diese Lösung wurde in einer Wanne angesetzt. In dieser Wanne wurden die Gele nach der Auswertung über Nacht gelagert. Am Morgen wurden die Gele ein zweites Mal in einer frischen Lösung über 30 min geschwenkt.

2.2.12.2. Sensibilisierung

Für die Sensibilisierung wurde das Natriumacetat (68 g) als erstes in einer kleinen Menge ddH_2O gelöst. Darauf wurde 300 ml Ethanol gegeben. Erst dann wurde 5 ml Glutardialdehyd (25%), 2 g Natriumthiosulfat beigemengt und mit ddH_2O auf 1 l aufgefüllt. Das Thiosulfat soll das Gel absättigen. Dadurch lassen sich die Proteine im Gel besser einfärben. Der Kontrast zwischen Gel und Proteinen wird stärker.
In dieser Lösung wurden die Gele für 60 min geschwenkt.

2.2.12.3. Waschen

Die Gele wurden 5 mal 8 min in jeweils 1 Liter frischem ddH_2O geschwenkt.

2.2.12.4. Die Silberfärbung

2,5 g Silbernitrat wurde in 1 l ddH_2O gelöst. Kurz vor der Anwendung wurden 400 µl Formaldehyd (37%) hinzugefügt. Das Gefäß für die Silberfärbung muss absolut sauber ein. Die Lösung muss klar sein. Wenn die Silberlösung sich bräunlich verfärbt, muss sie neu angesetzt werden. In dieser Lösung wurden die Gele für 60 min geschwenkt.

2.2.12.5. Waschen

Die Gele wurden 4 x 1 min lang in je 1 Liter frischem ddH_2O geschwenkt.

2.2.12.6. Entwicklung der Silberfärbung

Dafür wurden 25 g Na-Carbonat in 1 l ddH_2O gelöst. Kurz vor der Anwendung wurden 700 µl Formaldehyd (37%) zugefügt. Die Farbentwicklung ging sehr schnell. Die Gele blieben so lange in der Lösung, bis die gewünschte Farbintensität erreicht war.

2.2.12.7. Stopp

16 g Na2-EDTA x 2H_2O wurden in 1 Liter ddH_2O gelöst. Darin wurden die Gele 45 Minuten gelagert.

2.2.12.8. Waschen und Lagerung

Da wir die Gele bis zum Picken und der Trypsin-Verdauung aufbewahren wollten, führten wir noch eine letzte Waschung mit 2 mal 1 Liter ddH2O für jeweils 30 Minuten durch. Zur Lagerung wurden die Gele in 100 ml Glycerin in 1 Liter H_2O-Lösung für 20 Minuten geschwenkt und dann bei 4°C bis zum Spot-Verdau aufbewahrt.

2.2.13. Massenspektrometrische Auswertung

Die massenspektrometrische Auswertung der Proteinspots wurde durch Dr. Olaf Jahn am Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin in Göttingen durchgeführt. Dafür mussten folgende Vorbereitungen getroffen werden:

2.2.13.1. Die Trypsin-Verdauung

Wir druckten ein Bild des Gels in Originalgröße aus. Auf diesem Bild waren die interessanten Spots von der Software eingekreist. Somit konnten wir genau diese Spots manuell aus dem Gel picken. Diese dem Gel entnommenen Spots wurden auf eine 96 well Platte gelegt und eingeschickt.

2.2.14. Ergebnisse

Die Ergebnisse der Protein-Identifizierung bekamen wir von Dr. Olaf Jahn zur weiteren Beurteilung zugeschickt.

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse der statistischen Auswertung

3.1.1. Demographische Beschreibung des Patientenkollektivs

In unserer retrospektiven Studie wurden Daten von insgesamt 79 PLS Patienten erhoben. Die Datenerhebung fand in Zusammenarbeit mit 4 verschiedenen neurologischen Zentren in ganz Deutschland statt. Die in unserer Datenbank registrierten Patienten hatten zuvor durch erfahrene Ärzte der jeweiligen Zentren die Diagnose PLS erhalten.
Von diesen 79 Patienten mussten wir 3 ausschließen. Bei diesen 3 Patienten musste die ehemalige Diagnose PLS im Anbetracht des weiteren Verlaufs und unter Berücksichtigung weiterer Befunde reevaluiert werden.
Letztendlich wurden 76 Patienten in unsere Studie eingeschlossen.
Wir hatten die Möglichkeit, einen Teil der ausgewerteten PLS Patientendaten mit ALS Patientendaten des ALS-Registers Schwaben zu vergleichen. Im ALS-Register Schwaben sind von 426 ALS Fällen anamnestische Daten registriert. Bei 208 ALS Patienten wurden neben anamnestischen auch klinische Daten ermittelt.

3.1.1.1. Vergleich der Alters- und Geschlechtsverteilung des PLS und ALS Kollektivs

Das PLS Patientenkollektiv bestand insgesamt aus 42 Frauen (55%) und 34 Männern (45%). Im Gegensatz dazu handelte es sich im ALS-Register um 53% Männer und 47% Frauen mit der Diagnose ALS.
Im Jahr 2012 hatten unsere bis zu diesem Zeitpunkt gesammelten PLS Patienten das durchschnittliche Alter von 65,61 +/-11,55 Jahren erreicht. Der jüngste Patient war zu dieser Zeit 32, der älteste 89 Jahre alt.
Der jüngste ALS Patient des Registers war 34, der älteste 92 Jahre alt.

Die männlichen PLS Patienten hatten ein mittleres Alter von 64,26 +/- 12,99 Jahren und die weiblichen von 66,69 +/- 10,19 Jahren. Der älteste männliche Patient war 89 Jahre, die älteste weibliche Patientin 86 Jahre alt. Der jüngste Mann war 32 Jahre, die jüngste Frau war 46 Jahre alt.
Die Männer des ALS Registers hatten ein mittleres Alter von 65,8+/-11,4 Jahren. Das

mittlere Alter der Frauen lag bei 68,4+/-12,4 Jahren. Die älteste Frau war 92 Jahre, die jüngste 34 Jahre alt. Der älteste Mann war 89 Jahre, der jüngste 34 Jahre alt.

Das Alter der PLS Patienten lag zu Beginn der Symptomatik bei 56,81 +/-12,61 Jahren. Der jüngste Patient war bei Symptombeginn 28 Jahre, der älteste 83 Jahre alt.

Im Vergleich zum PLS Kollektiv war das ALS Register durch mehr Männer vertreten. Das Alter der ALS und PLS Patienten war nahezu identisch. Auch bei der Differenzierung des Alters nach Geschlecht gab es praktisch keine Unterschiede zwischen den beiden Kollektiven.

3.1.1.1.1. Graphische Darstellung der Geschlechtsverteilung des PLS und ALS Kollektivs

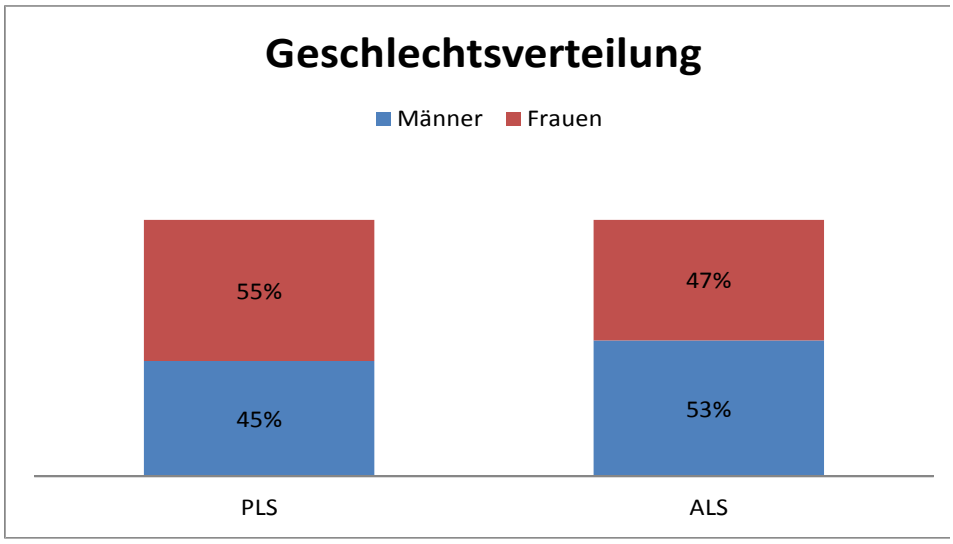


Abbildung 1: Graphische Darstellung der Geschlechtsverteilung des PLS und ALS Kollektivs. Datenbank des Universitätsklinikums Ulm ab 2009 bis zum Jahr 2012. Angaben in Prozentwerten.
[Abkürzungen: ALS = Amyotrophe Lateralsklerose; PLS = Primäre Lateralsklerose]

3.1.1.2. Die durchschnittliche Erkrankungsdauer von Symptombeginn bis zur PLS Diagnose

Die PLS Patienten in unserem Kollektiv warteten durchschnittlich 4+/-4 Jahre vom Zeitpunkt des Symptombeginns bis zur PLS Diagnose. Das Zeitfenster bis zur Diagnose lag zwischen 1 und 21 Jahren.

3.1.1.3. Die durchschnittliche Erkrankungsdauer der PLS Patienten bis zum Jahr 2012

Die durchschnittliche Erkrankungsdauer der PLS Patienten unserer Datenbank lag bei 8,79 +/- 4,70 Jahren. Die minimale Erkrankungsdauer bis zum Zeitpunkt der Auswertung lag bei 2 Jahren, die maximale Erkrankungsdauer bei 22 Jahren.

3.1.1.4. Verstorbene PLS und ALS Patienten bis zum Stichtag der Auswertung

Am Stichtag der Datenauswertung waren 7 PLS Patienten verstorben (9,21%). 4 verstorbene Patienten waren weiblich und 3 männlich.

Im ALS-Register waren 133 ALS Patienten verstorben (31,22%).

Es ist zu berücksichtigen, dass im ALS-Register auch bereits verstorbene Patienten aufgenommen wurden. Trotzdem unterscheidet sich die Anzahl der verstorbenen ALS Patienten von jener der PLS Patienten so deutlich, dass sich darin die schlechtere Prognose kombiniert mit der geringeren Lebenserwartung der ALS Patienten deutlich widerspiegelt.

3.1.2. Allgemeine Anamnese der Patientenkollektivs

3.1.2.1. Familienanamnesen der PLS und ALS Patienten

9 von 71 PLS Patienten verfügten über eine positive neuromuskuläre Familienanamnese (12,68%). Eine positive Familienanamnese in puncto Demenz hatten 2 der 76 Patienten (2,67%). Eine positive Familienanamnese für psychische Erkrankungen besaß nur einer von 76 PLS Patienten (1,33%).

In dem ALS- Register gab es ebenfalls nur einen Patienten mit positiver Familienanamnese für psychische Erkrankungen (0,23%).

3.1.2.2. Die soziale Anamnese der PLS Patienten

32 von 70 Patienten waren verheiratet (45,71%). Die restlichen Patienten waren unverheiratet, geschieden oder verwitwet.

3.1.2.3. Die Genussmittelanamnese der PLS Patienten

29,55% aller PLS Patienten konsumierten, beziehungsweise hatten in ihrem Leben

Zigaretten konsumiert. 30,43% der an PLS erkrankten Frauen waren oder sind Raucherinnen.

13,64% aller PLS Patienten hatten mit dem Rauchen aufgehört und 15,91% der PLS Patienten waren weiterhin aktive Raucher. Von diesen aktiven Rauchern waren 9,1% Frauen.

14 von 38 Patienten tranken gelegentlich oder selten Alkohol (36,84%). Die übrigen Patienten konsumierten keinen Alkohol.

3.1.2.3.1. Graphische Darstellung der Raucherinnen unter den PLS Patientinnen

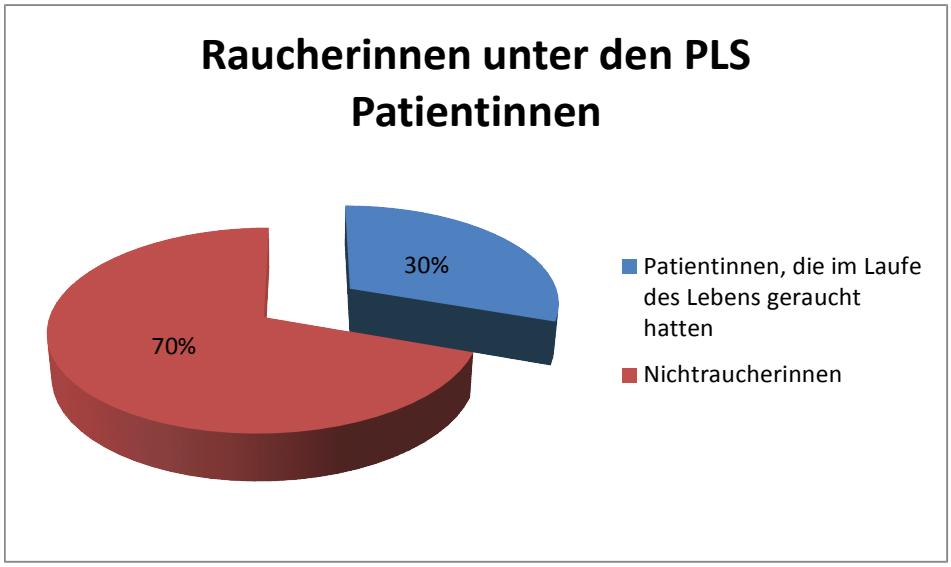


Abbildung 2: Graphische Darstellung der Raucherinnen unter den PLS Patientinnen. Datenbank des Universitätsklinikums Ulm ab 2009 bis zum Jahr 2012. Angaben in Prozentwerten.
[Abkürzungen: PLS = Primäre Lateralsklerose]

3.1.3. Die klinische Beschreibung des Patientenkollektivs

3.1.3.1. Lokalisation der Symptome bei Krankheitsbeginn der PLS und ALS Patienten

Die Lokalisation der Symptome bei Krankheitsbeginn konnte von allen 76 PLS Patienten ermittelt werden. Bei den meisten PLS Patienten begannen die Symptome an den distalen UE 67,11% (n= 51). Dies äußerte sich durch häufiges Hängenbleiben mit den Fußspitzen und durch Stolpern. Bei den ALS Patienten standen die distalen UE nur an 2. Stelle der als erste betroffenen Regionen 21,71% (n=28).

Im Gegensatz zu den PLS Patienten war bei den ALS Patienten in vielen Fällen die bulbäre

Symptomatik das erste Anzeichen der Erkrankung 33,33% (n=43). Ein bulbärer Beginn war bei PLS Patienten mit 19,74% (n=15) relativ selten.

Nach den distalen UE folgten bei den PLS Patienten die proximalen UE mit 38,16% (n=29). Bei den ALS Patienten waren die proximalen UE mit 13,18% (n=17) nicht so deutlich als Erstsymptom vertreten.

Das Schlusslicht der Erstsymptome bildeten bei den PLS Patienten die distalen OE 9,21% (n=7) zusammen mit den proximalen OE und dem Rumpf mit je nur einem 1 Fall (1,32%). Bei den ALS Patienten war dies ähnlich. Es folgten die distalen OE mit 20,93% (n=27) und die proximalen OE mit 7 Fällen (5,43%). Der Rumpf war bei keinem der ALS Patienten als erstes betroffen.

3.1.3.1.1. Graphische Darstellung der Verteilung der Erstsymptome

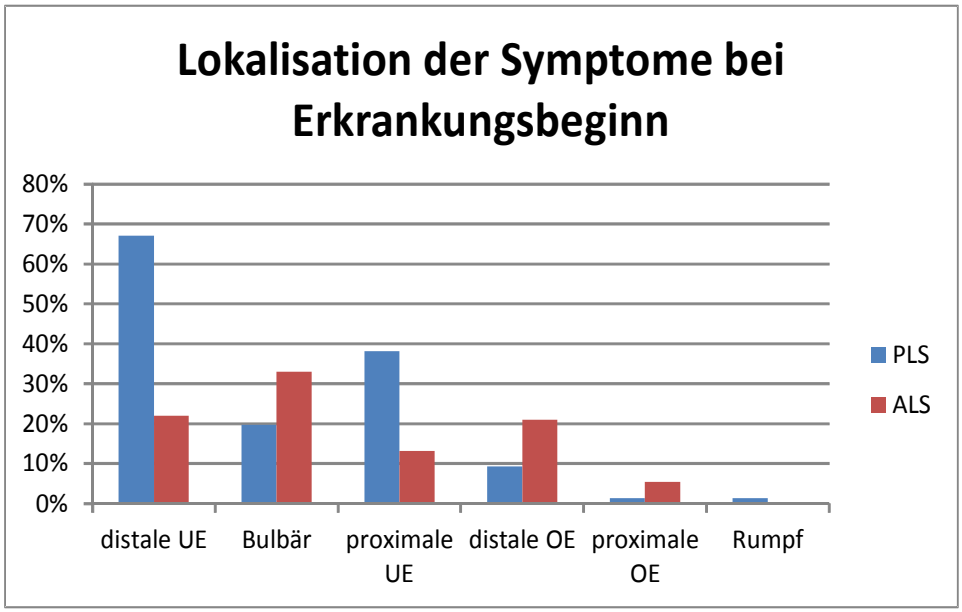


Abbildung 3: Graphische Darstellung der Lokalisation der Symptome bei ALS und PLS Patienten bei Erkrankungsbeginn. Datenbank des Universitätsklinikums Ulm ab 2009 bis zum Jahr 2012. Angaben in Prozentwerten.

[Abkürzungen: ALS = Amyotrophe Lateralsklerose; OE = Obere Extremitäten; PLS = Primäre Lateralsklerose; UE = Untere Extremitäten]

3.1.3.2. Vergleich des Reflexstatus der PLS und ALS Patienten

Bei der Ermittlung der Reflexe der PLS Patienten gliederten wir die Reflexe nach oberen

(OE) und unteren Extremitäten (UE) auf. Die Reflexe wurden in die Kategorien fehlend, abgeschwächt, normal, gesteigert und kloniform eingeteilt. Der Reflexstatus konnte von 70 PLS Patienten erhoben werden.

Kloniforme Reflexe waren im ALS Register nicht berücksichtigt worden. Diese waren ebenfalls in der Kategorie gesteigerte Reflexe erfasst worden. Um trotzdem den Reflexstatus von ALS und PLS Patienten vergleichen zu können, fassten wir bei unserem PLS Kollektiv kloniforme und gesteigerte Reflexe zusammen.

Insgesamt wurden kloniforme Reflexe an den OE bei nur 3 (4,29%) PLS Patienten gefunden, an den UE bei 15 (21,43%) PLS Patienten. Gesteigerte Reflexe hatten 52 PLS Patienten (74,29 %) an den OE und 45 (64,29%) an den UE.

Insgesamt zeigten 55 PLS Patienten (78,57%) gesteigerte oder gar kloniforme Reflexe an den OE und 60 PLS Patienten (85,71%) gesteigerte oder kloniforme Reflexe an den UE. Bei den ALS Patienten waren es hingegen nur 49,24% der Patienten mit gesteigerten Reflexen an den OE und 48,09% mit gesteigerten Reflexen an den UE.

Bei fast allen PLS Patienten waren gesteigerte Reflexe zu finden, unter den ALS Patienten nur etwa bei der Hälfte der Fälle.

15 PLS Patienten zeigten normale Reflexe an den oberen Extremitäten (21,43%). 14,29% (n=10) der PLS Patienten offenbarten normale Reflexe an den unteren Extremitäten.

Normale Reflexe waren bei 31,82% der ALS Patienten an den OE und 37,40% der Patienten an den UE zu sehen.

Abgeschwächte Reflexe waren bei 14,39% der ALS Patienten an den OE und bei 19,23% der Patienten an den UE zu finden.

Fehlende Reflexe hatten an den OE gerade 1,52% und an den UE 18,46% der ALS Patienten.

Abgeschwächte oder fehlende Reflexe waren jedoch bei keinem einzigen der PLS Patienten zu finden.

Dies bedeutet, dass die Reflexe als Kriterium zur Differenzierung zwischen ALS und PLS Patienten herangezogen werden können. Abgeschwächte oder fehlende Reflexe sind ein eindeutiger Hinweis für eine ALS. Schwierig bleibt es, zwischen ALS Patienten mit gesteigerten Reflexen und PLS Patienten zu unterscheiden.

18 von 44 dokumentierten PLS Fällen hatten asymmetrische Pyramidenbahnzeichen (40,91%).

70,99% der ALS Patienten zeigten keinerlei Pyramidenbahnzeichen.

3.1.3.2.1. Graphische Darstellung der Lokalisation der Reflexe bei ALS und PLS Patienten

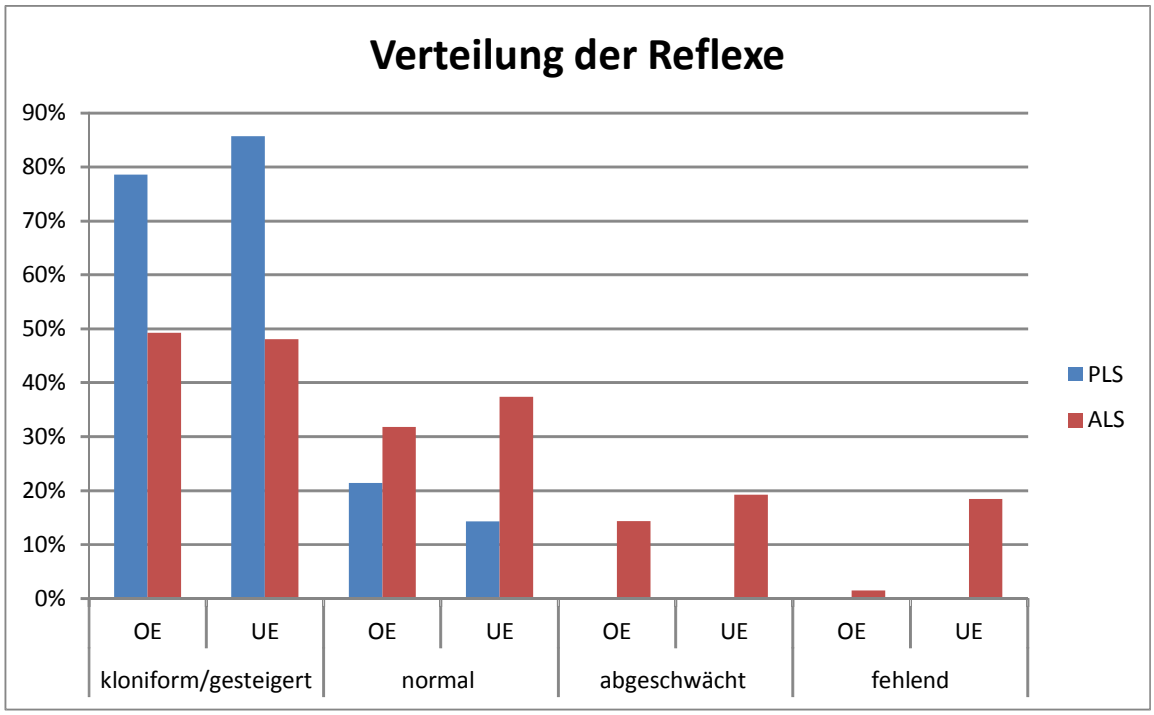


Abbildung 4: Graphische Darstellung der Verteilung der Reflexe im Vergleich von ALS und PLS Patienten. Datenbank des Universitätsklinikums Ulm ab 2009 bis zum Jahr 2012. Angaben in Prozentwerten. [Abkürzungen: ALS = Amyotrophe Lateralsklerose; OE = Obere Extremitäten; PLS = Primäre Lateralsklerose; UE = Untere Extremitäten]

3.1.3.3. Vergleich des Muskeltonus der PLS und ALS Patienten

Bei 31 von 45 PLS Patienten konnte eine Spastik der OE (68,89%) und bei sogar 88,89% (40 von 45 Patienten) konnte eine Spastik an den UE entdeckt werden. Die Spastik war bei 31,11% der PLS Patienten asymmetrisch verteilt (14 von 45 Patienten).

Unter den ALS Patienten zeigten lediglich 4,03% eine Spastik der OE und sogar nur 2,42% eine Spastik der UE.

Bei 6 von 44 PLS Patienten wurde ein Rigor der OE, UE oder in einem Fall der Nackenmuskulatur angegeben (13,64%). Bei Patienten des ALS-Registers ergaben sich keine Hinweise auf das Vorliegen eines Rigors.

3.1.3.4. Paresen der PLS und ALS Patienten

40 von 70 PLS Patienten wiesen Paresen an den OE auf (64,29%). Bei 56 PLS Patienten (80%) ließen sich Paresen an den UE erkennen. Dies liegt ungefähr in der gleichen Größenordnung wie das Auftreten der Spastik an den OE und an den UE.
Die Einteilung der Schwere der Paresen erfolgte nach der Medical Research Council Skala (MRC Skala).
Die Schwere der Paresen an den OE konnte bei 50 PLS Patienten nachvollzogen werden. Sie lag bei einem Mittelwert von 4 +/- 1,31. Die Kraftgrade der ALS Patienten nach der MRC Skala lagen an den OE bei 3,72 +/-0,75.
An den unteren Extremitäten konnten die Kraftgrade von 46 PLS Patienten nachvollzogen werden, der Mittelwert lag bei 3,8 +/-1,9. Das Minimum und Maximum der Kraftgrade lag sowohl an den OE als auch an den UE bei 0 und 5. An den UE lagen die Kraftgrade der ALS Patienten bei 3,51 +/- 1,02. Das Minimum der Kraftgrade lag an den OE bei 1 und an den UE bei 0. Das Maximum der Kraftgrade lag an den OE und UE bei 5.
Die Kraftgrade zeigen sich damit nur unwesentlich geringer ausgeprägt als bei den PLS Patienten.

3.1.3.5. Asymmetrische Klinik der PLS

31% unserer PLS Patienten zeigten eine Asymmetrie der Spastik, und 40 von 70 Patienten hatten asymmetrische Paresen (57,14%). Insgesamt war eine Asymmetrie entweder der Spastik, der Paresen, der Reflexe oder der Pyramidenbahnzeichen bei 79,07% der PLS Patienten zu beobachten.

3.1.3.6. Sensibilität der PLS Patienten

12 von 73 Patienten gaben Störungen der Oberflächen- oder Tiefensensibilität an (16,44%).
Bei 36,62% stellte sich bei der Untersuchung eine Störung der Pallästhesie dar (26 von 71 Patienten).

3.1.3.7. Die Koordination der PLS Patienten

40 von 73 Patienten (54,79%) fielen bei der Untersuchung durch Koordinationsstörungen auf. Dies lag vor allem daran, dass die Patienten an Feinmotorikstörungen infolge der Spastik der Hände litten.

3.1.3.8. Klinische Zeichen des 2. Motoneurons bei PLS und ALS Patienten

Bei 33,82% der PLS Patienten waren geringgradige Atrophien an den OE oder UE zu erkennen. Hauptsächlich die OE waren bei 20 von 68 PLS Patienten, im Sinne von dezenten Atrophien der Unterarmmuskulatur, betroffen (29,4%). An den UE waren nur 19,12% (n= 13) betroffen. Atrophien waren bei 37,50% der ALS Patienten an den OE zu entdecken (n=48) und nur bei 7,81% an den UE (n=10).

An den OE zeigten die ALS Patienten eher Atrophien als die PLS Patienten. An den UE stellte sich dies andersherum dar.

43,06% der PLS Patienten hatten Faszikulationen. Diese offenbarten sich im Wesentlichen an den unteren Extremitäten (37,5%).

Bei 22,40% der ALS Patienten wurden Faszikulationen an den OE (n=28) gesehen, aber lediglich bei 2,40% an den UE (n=3).

Auch hier zeigt sich, dass die unteren Extremitäten der PLS Patienten eher durch Faszikulationen betroffen sind als die der ALS Patienten.

Über Muskelkrämpfe klagten 55,36% der PLS Patienten, wie bei den Faszikulationen waren auch hier vorwiegend die UE betroffen (53,57%).

Ungefähr ebenso viele ALS Patienten klagten über Muskelkrämpfe; 51,52% (n=68).

3.1.3.9. Die Verteilung der klinischen Symptome bei PLS Patienten

Die UE der PLS Patienten sind insgesamt gesehen eher betroffen als die OE, sowohl durch die Spastik als auch durch die Paresen.

Interessanterweise verteilten sich die diskreten klinischen Symptome des 2. Motoneurons wie Atrophien und Faszikulationen eher auf die OE.

3.1.3.10. Weitere Symptome der PLS und ALS Patienten

3.1.3.10.1. Weitere Symptome der PLS Patienten

56,59% aller PLS Patienten gaben an, an einer Dysarthrie zu leiden (43 von 76 Patienten). Etwas weniger PLS Patienten (31 von 75) klagten über Dysphagie (41,33%). Bei der ALS waren es 79 Patienten von 164 erhobenen Patienten (48,17%). Es leiden also etwas mehr ALS Patienten an Dysphagie als PLS Patienten.

Nur 22,73% der PLS Patienten litten unter Dyspnoe (15 von 66 Patienten). Dabei handelte es sich in den meisten Fällen um eine Belastungsdyspnoe.

Bei den ALS Patienten gaben nur 18,42% eine Dyspnoe an (14 von 76 Patienten).

Über imperatives Lachen und Weinen klagten 41,79% der PLS Patienten (28 von 67 Patienten). Auch hier waren die PLS Patienten deutlicher vertreten. Unter den ALS Patienten lag bei 26 von 71 Patienten eine Affektinkontinenz im Sinne von imperativem Lachen und Weinen vor (38,03%).

3.1.3.10.1.1. Graphische Darstellung weiterer Symptome der ALS und PLS Patienten

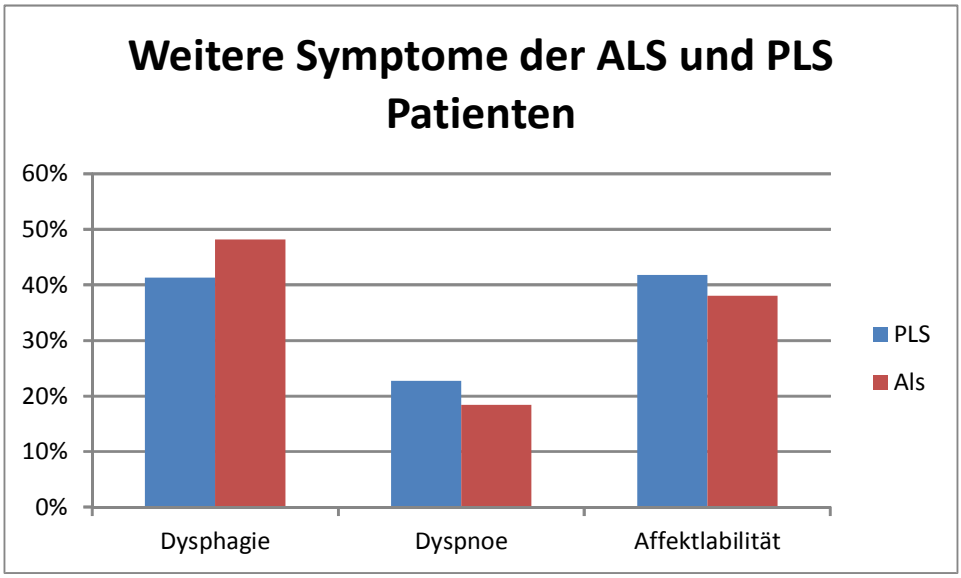


Abbildung 5: Graphische Darstellung weiterer Symptome der ALS und PLS Patienten. Datenbank des Universitätsklinikums Ulm ab 2009 bis zum Jahr 2012. Angaben in Prozentwerten.

[Abkürzungen: ALS = Amyotrophe Lateralsklerose; PLS = Primäre Lateralsklerose]

3.1.3.11. Vergleich der Begleiterscheinungen von ALS und PLS Patienten

3.1.3.11.1. Vergleich des Vorkommens von Depressionen bei ALS und PLS Patienten

Ein beträchtlicher Anteil der PLS Patienten (36,11%) litt unter Depressionen (26 von 72 Patienten). Bei den ALS Patienten handelte es sich nur um 12,12%, die an Depressionen erkrankt waren (n=16).

3.1.3.11.2. Vergleich des Vorkommens von Blasenstörungen bei ALS und PLS Patienten

In unserer retrospektiven Untersuchung erwies sich, dass 21 von 66 PLS Patienten (31,82%) an einem imperativen Harndrang litten.
Unter den ALS Patienten waren es nur 12,88% (n=17).

3.1.3.11.3. Vergleich des Vorkommens von Auffälligkeiten der Okulomotorik bei ALS und PLS Patienten.

25% der PLS Patienten zeigten Auffälligkeiten der Okulomotorik (9 von 36 Patienten). Die meisten Patienten wiesen dabei eine sakkadierte Blickfolgebewegung auf. Unter den ALS Patienten zeigten nur 2,27% (n=3) einen Nystagmus.

3.1.3.11.4.Vergleich des Vorkommens von arterieller Hypertonie bei ALS und PLS Patienten

30,99% der PLS Patienten hatten eine arterielle Hypertonie (22 Patienten). Unter den ALS Patienten waren 41,22% (n=54) an einer arteriellen Hypertonie erkrankt.

3.1.3.11.5. Vergleich des Vorkommens von Diabetes mellitus Typ 2 bei ALS und PLS Patienten

4 von 71 PLS Patienten litten an Diabetes mellitus Typ 2 (5,63%). Bei den ALS Patienten handelte es sich um 14,50% (n=19).

3.1.3.11.6. Graphische Darstellung der Begleiterkrankungen von ALS und PLS Patienten

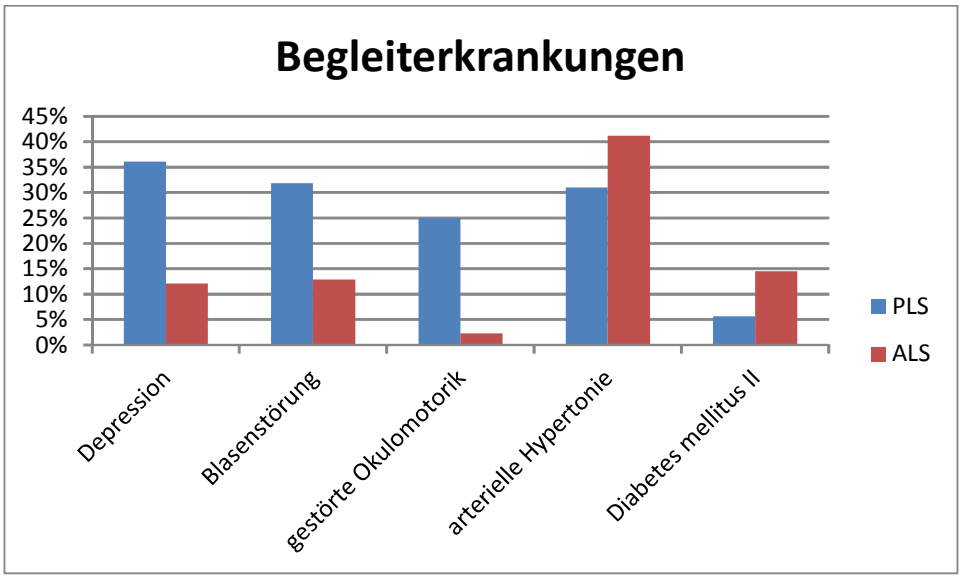


Abbildung 6: Graphische Darstellung der Begleiterkrankungen von ALS und PLS Patienten. Datenbank des Universitätsklinikums Ulm ab 2009 bis zum Jahr 2012. Angaben in Prozentwerten.

[Abkürzungen: ALS = Amyotrophe Lateralsklerose; PLS = Primäre Lateralsklerose]

3.1.3.12. Begleiterkrankungen von PLS Patienten

3.1.3.12.1. Schilddrüsenerkrankungen bei PLS Patienten

13 von 72 PLS Patienten (18,06%) waren in irgendeiner Form an der Schilddrüse erkrankt. Unter diesen 13 Patienten waren 7, die an einer Hypothyreose litten (53,85%). Diese 7 Hypothyreose Patienten waren ausschließlich Frauen. Von allen PLS Patienten wiesen 9,72% eine Hypothyerose auf. 2 Patienten litten an einer SD Funktionsstörung unklarer Genese (2,78%). Die übrigen Patienten demonstrierten verschiedene Funktionsstörungen wie Autoimmunthyreoiditis, Hyperthyreose, Z.n. SD-Op und unklare Läsion im rechten SD Lappen.

3.1.3.12.1.1. Graphische Darstellung der Schilddrüsenerkrankungen bei PLS Patienten

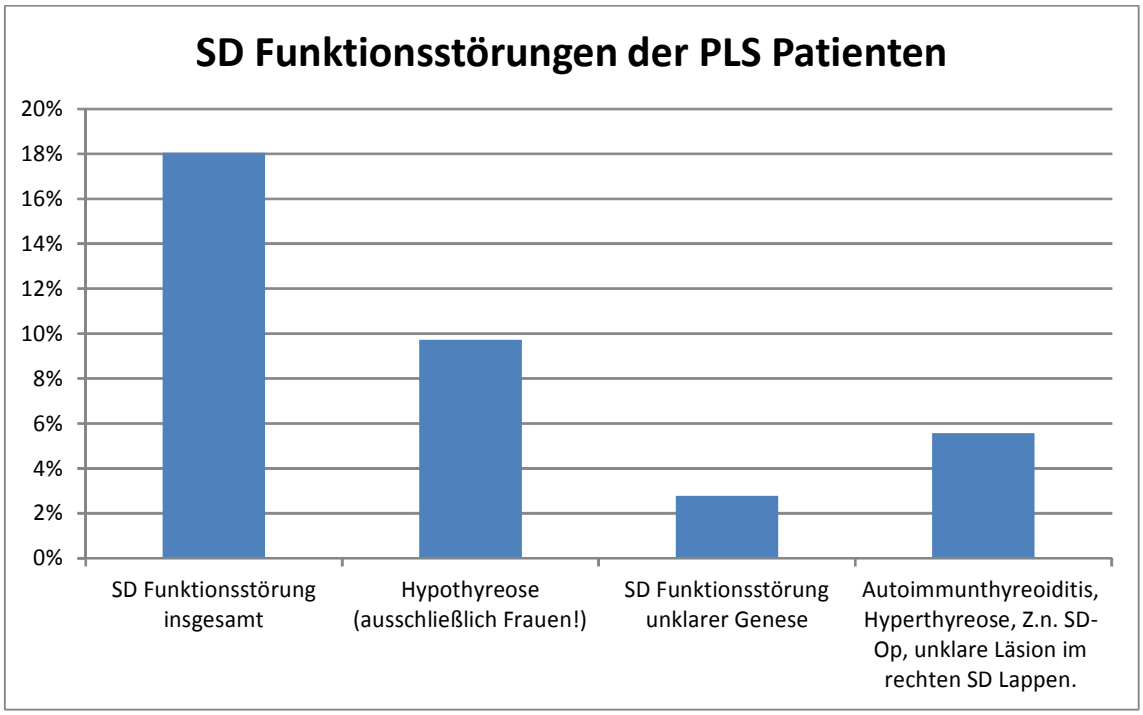


Abbildung 7: Graphische Darstellung der verschiedenen Schilddrüsenfunktionsstörungen bei PLS Patienten. Datenbank des Universitätsklinikums Ulm ab 2009 bis zum Jahr 2012. Angaben in Prozentwerten. [Abkürzungen: OP = Operation; PLS = Primäre Lateralsklerose; SD = Schilddrüse]

3.1.3.12.2. Demenz bei PLS Patienten

Nur 4 von 72 PLS Patienten zeigten die Symptomatik einer Demenz (5,56%).

3.1.3.12.3. Sonstige Erkrankungen bei PLS Patienten

Die folgenden Begleiterkrankungen konnten von 71 Patienten erhoben werden. Davon hatten 7 Patienten keinerlei Begleiterkrankungen (9,86%).

11,27% der PLS Patienten zeigten eine Hyperlipoproteinämie (8 von 71 Patienten).

6 Patienten (8,45%) litten unter einer Arthrose eines oder mehrerer Gelenke. Ebenso war die Anzahl der Patienten mit Zustand nach Bandscheibenvorfall und der Patienten mit Hypercholesterinämie.

5 Patienten zeigten degenerative Wirbelsäulenveränderungen (7,04%).

Jeweils 4 (5,63%) unterschiedliche Patienten der PLS Gruppe litten an Vorhofflimmern oder Adipositas.

Bei 4,23 Prozent (3 von 71 Patienten) war im Verlauf des Lebens eine Appendektomie durchgeführt worden.
Die im Folgenden aufgezählten Erkrankungen manifestierten sich bei 2 (2,82%) verschiedenen Patienten der PLS Gruppe:
Allergien, zerebrale Mikroangiopathie, nicht relevante Spinalkanalstenose, Z.n. Traumatischen Frakturen, Z.n. Basaliom Operation, Z.n. Borreliose, Herzrhythmusstörungen.

3.1.4. Befunde der technischen Untersuchungen

3.1.4.1 Zeichen des 2. MN im EMG der PLS Patienten

3.1.4.1.1. Mittleres Alter der PLS Patienten mit und ohne Beteiligung des 2.MN

Das mittlere Alter der PLS Patienten mit Beteiligung des 2.MN in der Elektromyographie lag bei 62,91 +/-10,55 Jahren. Das mittlere Alter der PLS Patienten ohne Beteiligung des 2. MN lag bei 65,2 +/- 10,88 Jahren.

3.1.4.2. Intensitätserhöhungen im MRT Schädel

Bei 29,55% unserer PLS Patienten ließen sich unspezifische Intensitätserhöhungen im MRT sehen (13 von 44 Patienten). 9,09% der Patienten mit Intensitätserhöhungen hatten eine diagnostizierte SVE (4 von 44 Patienten).

3.1.5. Therapiemöglichkeiten der PLS und ALS Patienten

3.1.5.1. PEG Anlage der PLS und ALS Patienten

Bei den Patienten aus dem ALS-Register hatten von 144 Patienten 16 eine PEG Anlage (11,11%). Bei unseren PLS Patienten hatten nur 2 von 73 Patienten eine PEG (2,74%).

3.1.5.2. Nicht – invasive Heimbeatmung (NIV) der PLS und ALS Patienten

3 von 73 PLS Patienten (4,11%) erhielten eine supportive Nicht- invasive Heimbeatmung. Von den ALS Patienten wurden rund doppelt so viele (19 von 194 Patienten = 9,79%) mit einer NIV versorgt.

3.1.5.3. L-Dopa Substitution bei PLS Patienten

Bei 24 Patienten unseres Ulmer PLS Kollektivs wurde L-Dopa eindosiert. 5 von diesen 24 Patienten erfuhren eine subjektive und objektive Verbesserung der Spastik, der Gehfähigkeit oder der Feinmotorik (20,83%). Bei 5 der 24 Patienten kam es zu keinerlei Verbesserung (20,83%) und bei 14 Patienten konnte anhand der Dokumentation nicht erfahren werden, wie die Wirkung der L-Dopa Therapie war.
Immerhin nahmen aber 28 von 59 Ulmer Patienten L-Dopa als Medikation ein, ohne einen anderen definierten Grund zu haben. Dies bedeutet, dass bei 28 von 59 Patienten die L-Dopa Therapie einen positiven Effekt gehabt haben muss (47,46%), da sonst eine dauerhafte Gabe von L-Dopa nicht erfolgt wäre.

3.1.5.3.1. Graphische Darstellung der L-Dopa Substitution bei PLS Patienten

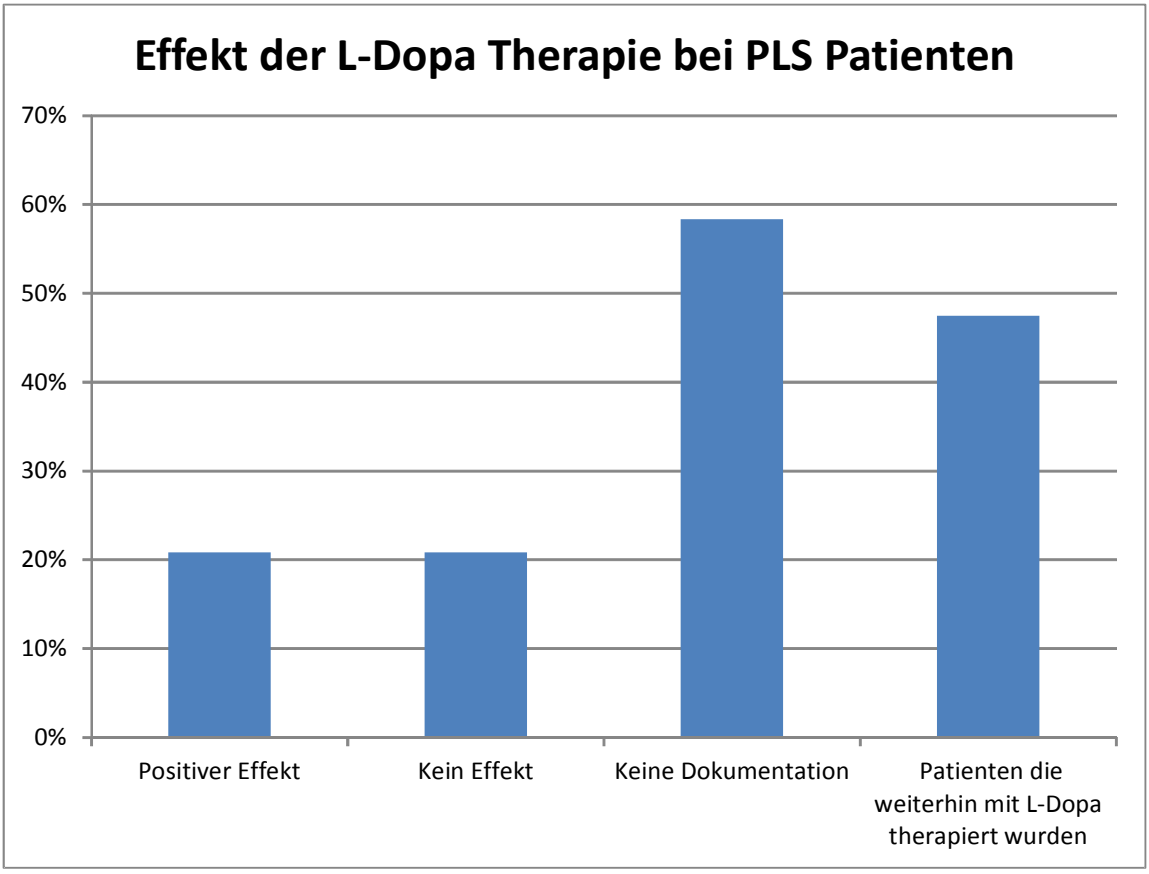


Abbildung 8: Graphische Darstellung des Effekts der L-Dopa Substitution bei PLS Patienten. Datenbank des Universitätsklinikums Ulm ab 2009 bis zum Jahr 2012. Angaben in Prozentwerten.
[Abkürzungen: PLS = Primäre Lateralsklerose]

3.2. Ergebnisse der Liquorproteomanalyse

3.2.1. Kurze Darstellung der Liquorproteomanalyse

Im Rahmen der Liquorproteomanalyse fertigten wir 2 2D-DIGE Gele an. Durch die Gelelektrophorese wurden die auf den Gelen aufgetragenen Proteine nach Ladung und Molekulargewicht getrennt. Die Liquorproben mussten dafür, wie im Methodenteil beschrieben, präpariert werden. Nach Computer gestütztem Volumenvergleich der Proteinspots von PLS Patienten und Kontrollen wurden interessante Spots mit auffälligem Volumenunterschied ausgewählt. Nach Anfärbung der Gele wurden diese ausgewählten Proteinspots aus dem Gel gepickt und durch Trypsin verdaut. Diese durch Trypsin-Verdauung hergestellten Fragmente der Proteine konnten mit Hilfe der Massenspektrometrie identifiziert werden

3.2.2. Silbergefärbtes 2D-DiGE-Gel

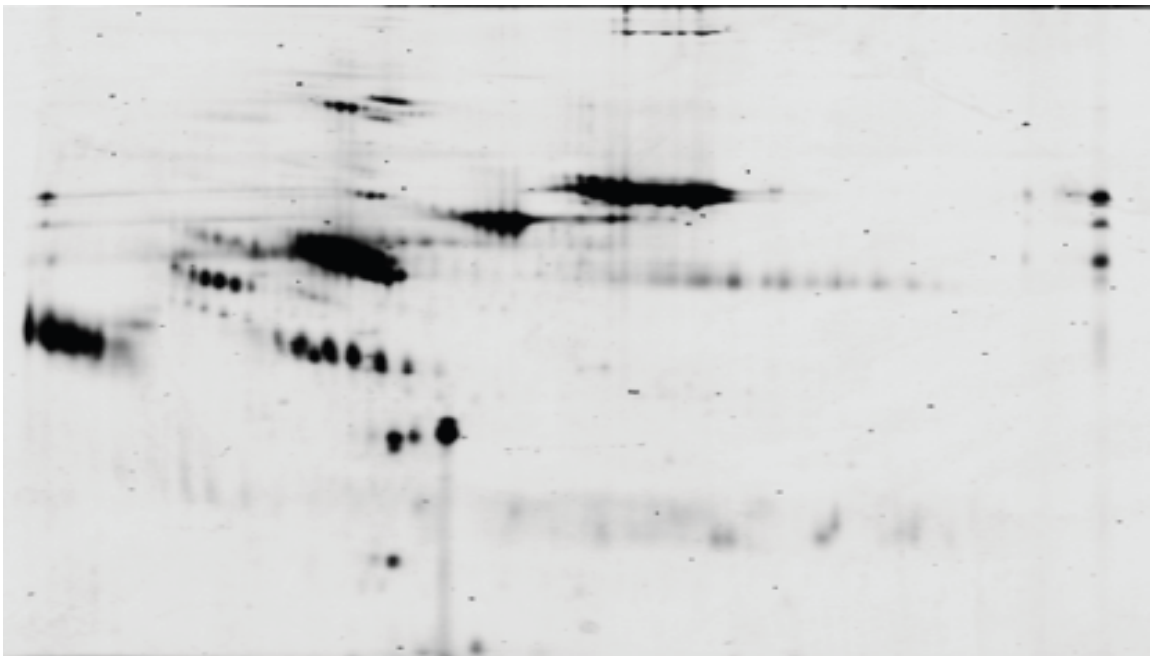


Abbildung 9: Mit Silberlösung gefärbtes 2D-DIGE-Gel. Die Färbung erfolgte nach dem Einscannen und Auswerten der Gele mit Hilfe der DeCyder-Software. Die schwarzen Punkte und Flecken stellen die angefärbten Proteinspots dar. Die Spots setzen sich aus Proteinen der gepoolten PLS Patientenproben, der alters- und geschlechtsgematchten Kontrollproben und des IS zusammen. Proben der Liquor-Biobank des Universitätsklinikums Ulm ab 2011 bis zum Jahr 2012.
[Abkürzungen: 2D-DIGE = Zweidimensionale Difference In-Gel Elektrophorese; IS = Interner Standard; PLS = Primäre Lateralsklerose]

3.2.3. Auswertung und Darstellung der Proteinspots mit Hilfe der DeCyder- Software

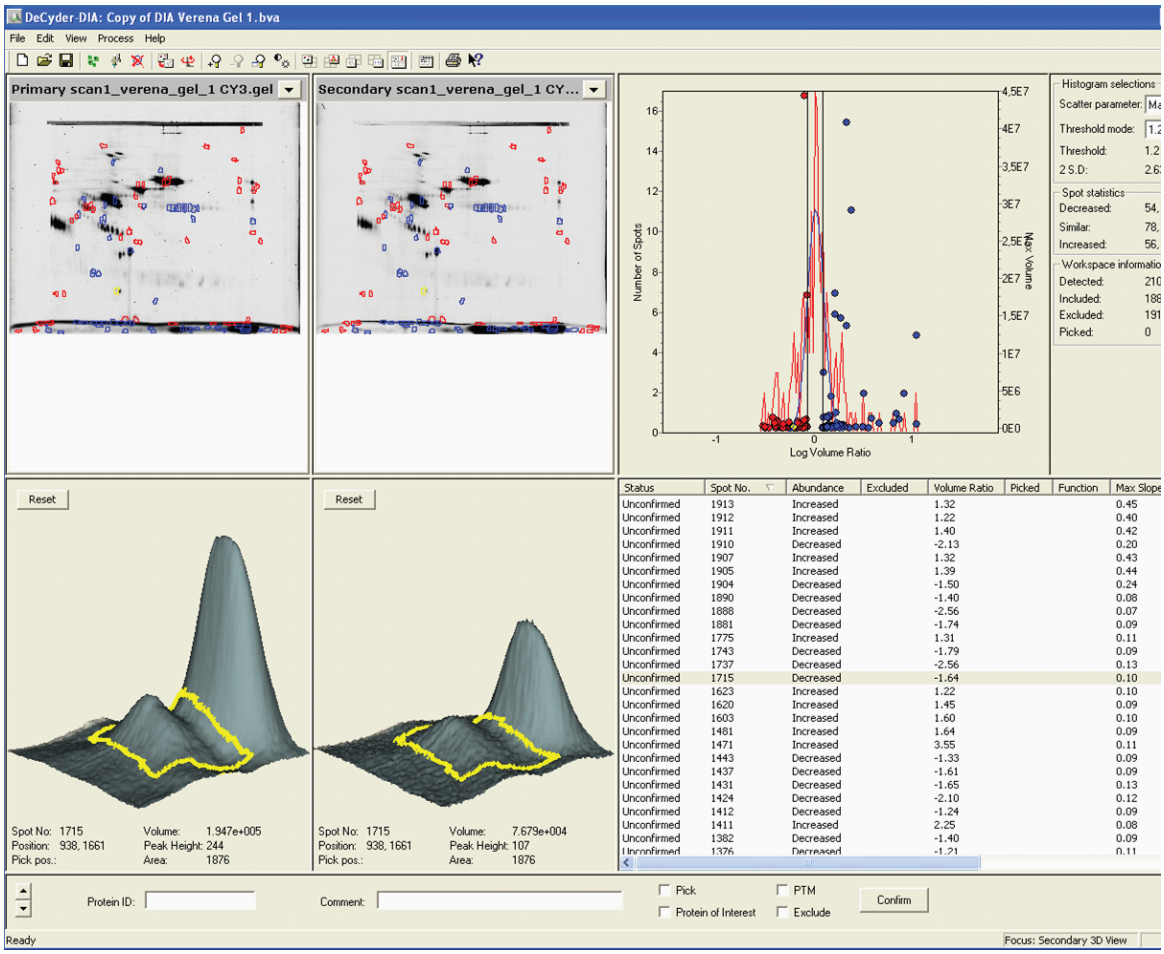


Abbildung 10: Ergebnis nach dem Einscannen durch den Ettan DIGE Imager. Vergleich des Proteinvolumens einzelner Spots des Kontroll Kollektivs mit dem Proteinvolumen des PLS Kollektivs. Spots, deren Volumen im Vergleich zur Kontrollgruppe um mindestens das 1,2 fache erhöht ist, werden rot umrandet; Spots, deren Volumen um mindestens das 1,2 fache vermindert ist, werden blau eingekreist (siehe oben links).
Unten links sind identische Proteinspots beider eingescannter Gele nebeneinander dargestellt. Der kleinere gelb umkreiste Spot ist der Spot der PLS Gruppe, der größere Spot gehört zur Kontrollgruppe.
In der Tabelle rechts unten kann abgelesen werden, um welchen Faktor die Proteinmenge im Vergleich zur Kontrolle herauf- oder herunterreguliert wurde. Proben der Liquor-Biobank des Universitätsklinikums Ulm ab 2011 bis zum Jahr 2012.
[Abkürzungen: PLS = Primäre Lateralsklerose]

3.2.4. Identifikation der Proteinspots

Nach der Auswertung durch die DeCyder Software pickten wir 24 Spots aus dem Gel, die aufgrund des herauf- oder herunterregulierten Volumens und der Lokalisation interessant erschienen. Innerhalb dieser 24 Spots konnten anhand der Massenspektrometrie 372

Proteinstrukturen detektiert werden. Mit Hilfe der Referenzdatenbank konnten wiederum 14 verschiedene Proteine in 9 verschiedenen Spots sicher identifiziert werden. Teilweise wiederholte sich das Vorkommen der Proteine in den verschiedenen Spots. Letztendlich konnten von diesen Proteinen 7 relevante angegeben werden. Die Spots mit relevanten Proteinen sind auf der Abbildung 11 rot umkreist.

3.2.4.1. Darstellung der identifizierten Proteinspots auf dem Gel

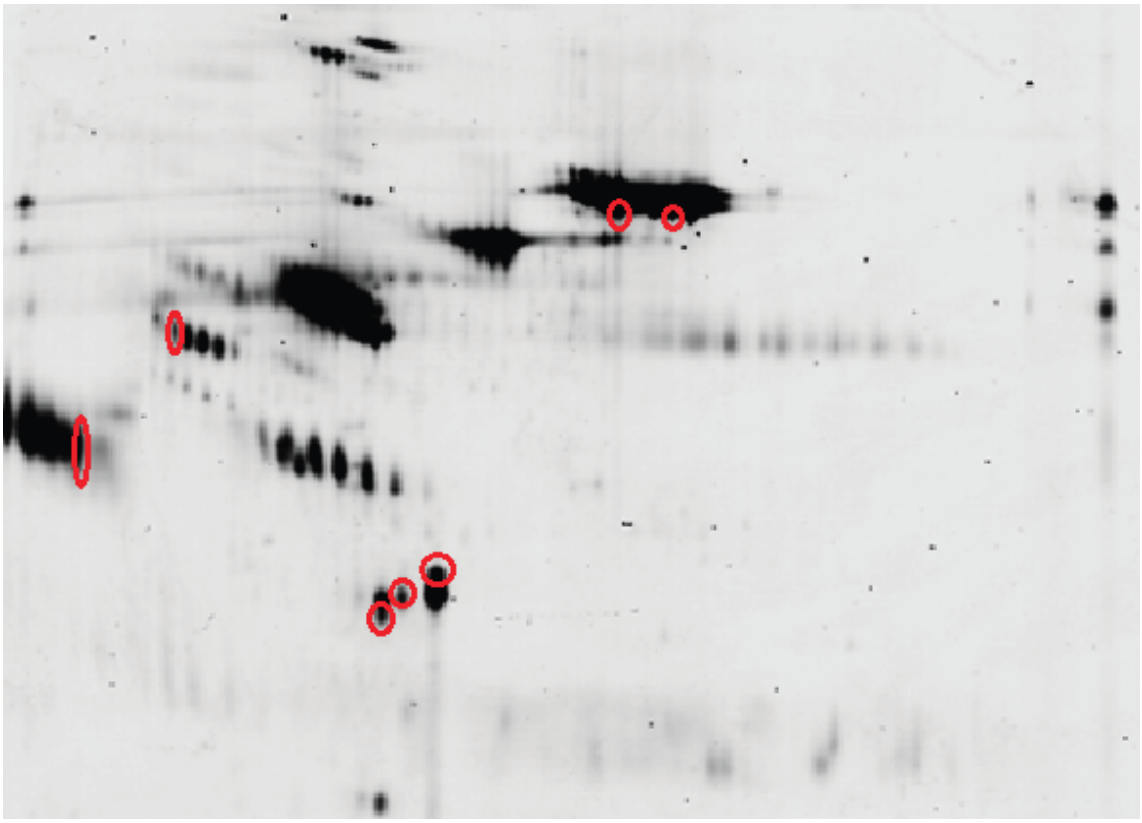


Abbildung 11: Original 2D-DIGE-Gel von gepoolten PLS- Kontrollproben und IS. Die rot umkreisten Spots konnten nach dem Picken aus dem Gel und der Trypsin-Verdauung durch die Massenspektrometrie mit Hilfe einer Referenzdatenbank identifiziert werden. Proben der Liquor-Biobank des Universitätsklinikums Ulm ab 2011 bis zum Jahr 2012.

[Abkürzungen: IS = Interner Standard; PLS = Primäre Lateralsklerose]

3.2.5. Tabellarische Darstellung der identifizierten Proteinspots

Tabelle 11: Tabellarische Darstellung der identifizierten Proteinspots mit Regulationsfaktor. Vergleich von Kontroll und PLS Proben. Proben der Liquor-Biobank des Universitätsklinikums Ulm ab 2011 bis zum Jahr 2012.

[Abkürzungen: „+" = hochreguliert bei PLS Patienten; „-" = herunterreguliert bei PLS Patienten]

Spot Nr.	*Regulationsfaktor*	*Protein*
24	-1,43	Carnitine O-palmitoyltransferase 1 (Leber Isoform)
26	-1,22	Transthyretin
28/29	-1,39/-1,95	Transthyretin, Chain A, Struktur von Präalbumin
31	-1,32	Lipoprotein Signal Peptidase
32	+1,45	Alpha-1-acid Glycoprotein, Orosomucoid 1
34	-1,1	Zytoskeletales Keratin Typ I
37	-2,56	Apolipoprotein C II
44	-1,27	T-cell Rezeptor alpha, Chain A, Apo-Human Serum, Transferrin (Glycosylated), PRO1400, Serotransferrin (Transferrin)
46	-1,1	Serotransferrin (Positive Kontrolle)
47	-	Kein Protein (negativ Kontrolle)

4. Diskussion

4.1. Die statistische Auswertung

4.1.1. Kurze Darstellung der Datenerhebung

In einer retrospektiven Aktenstudie untersuchten wir die phänotypische Ausprägung der Primären Lateralsklerose anhand von 76 Patienten. Einige der ermittelten Daten verglichen wir mit Werten von ALS Patienten des ALS-Registers Schwaben.

4.1.2. Vergleich der Klinik von ALS und PLS Patienten

4.1.2.1. Vergleich der Spastik bei ALS und PLS Patienten

68,89% der PLS Patienten hatten eine Spastik an den OE und sogar bei 88,89% der Patienten konnte eine Spastik an den UE entdeckt werden. Die Spastik ist eine der Komponenten des UMN Syndroms [G. Sheean et al. 2002]. Sie fällt unter die positiv Symptome, die durch Muskelüberaktivität charakterisiert sind [G. Sheean et al. 2002]. Unter den ALS Patienten zeigten lediglich 4,03% eine Spastik an den OE und sogar nur 2,42% an den UE.

Dies wurde ebenso in einer Studie von Tartaglia et al. 2007 dargestellt, in welcher die Klinik von ALS mit der von PLS Patienten verglichen wurde [MC. Tartaglia et al. 2007]. In dieser Untersuchung wiesen Patienten mit PLS zu 47% eine Spastik auf, ALS Patienten nur zu 4% [MC. Tartaglia et al. 2007]. Die Signifikanz dieses Vergleichs war deutlich ($p<0,001$) [MC. Tartaglia et al. 2007].

Auch in anderen Publikationen wurde beschrieben, dass eine Spastik bei allen oder zumindest bei fast allen PLS Patienten zu finden war [MA. Singer et al. 2005][J. Kuipers-Upmeijer et al. 2001][N. Le Forestier et al. 2001]. Wir gehen daher davon aus, dass in Zusammenschau aller klinischen und technischen Befunde durch das Auftreten einer Spastik die Diagnose ALS unwahrscheinlicher wird.

4.1.2.2. Vergleich des Reflexstatus der PLS und ALS Patienten

Kloniforme Reflexe waren im ALS-Register im Gegensatz zu unserer PLS Studie nicht gesondert aufgeführt worden, sondern unter den Begriff „gesteigerte Reflexe“ gefallen. Um trotzdem den Reflexstatus von ALS und PLS Patienten vergleichen zu können, fassten

wir bei unserem PLS Kollektiv kloniforme und gesteigerte Reflexe ebenfalls zusammen. Insgesamt gesehen hatten 55 PLS Patienten (78,57%) gesteigerte oder gar kloniforme Reflexe an den OE und 60 PLS Patienten (85,71%) gesteigerte oder kloniforme Reflexe an den UE. Bei den ALS Patienten wiesen hingegen nur 49,24% der Patienten gesteigerte Reflexe an den OE und 48,09% gesteigerte Reflexe an den UE auf.
Zusammengefasst zeigten nicht einmal die Hälfte der ALS Patienten gesteigerte Reflexe im Gegensatz zu den PLS Patienten. Diese Verteilung der Reflexe wird auch in den Untersuchungen von Kuipers-Upmeijer et al., Pringle et al. und Le Forestier et al. deutlich [J. Kuipers-Upmeijer et al. 2001][CE. Pringle et al. 1992][N. Le Forestier et al. 2001].
In einer weiteren Publikation von Werneck et al. war dieser Unterschied des Reflexstatus etwas weniger stark ausgeprägt. In dieser Studie waren bei jeweils 65,7% der ALS Patienten an OE und UE gesteigerte Reflexe zu finden [LC. Werneck et al. 2007]. Auch Winter et al. sprechen von bei ALS vorwiegend gesteigert vorkommenden Reflexen [S. Winter et al. 2004].
Doch selbst wenn man von einem Prozentsatz von 65,7% gesteigerter Reflexe bei ALS Patienten ausgeht, reicht dieser nicht an die Häufigkeit gesteigerter und kloniformer Reflexe unter PLS Patienten heran.

Abgeschwächte Reflexe waren bei 14,39% der ALS Patienten an den OE zu finden und bei 19,23% der ALS Patienten an den UE.
Fehlende Reflexe hatten an den OE nur 1,52% der ALS Patienten und an den UE 18,46% der Patienten. Auch in der Studie von Werneck et al. hatten 4% der ALS Patienten fehlende Reflexe sowohl an den OE als auch an den UE [LC. Werneck et al. 2007]. Abgeschwächte oder fehlende Reflexe waren jedoch bei keinem einzigen PLS Patienten zu finden weder in unserer Untersuchung noch in anderen Publikationen.
Dies bedeutet, dass der Reflexstatus als Kriterium zur Differenzierung zwischen ALS und PLS Patienten herangezogen werden kann. Abgeschwächte oder fehlende Reflexe sind ein eindeutiger Hinweis für eine ALS. Schwierig bleibt es zwischen ALS Patienten mit gesteigerten Reflexen und PLS Patienten zu unterscheiden.

4.1.2.3. Vergleich der Begleiterkrankungen von ALS und PLS Patienten

4.1.2.3.1. Vergleich des Vorkommens von Depressionen bei ALS und PLS Patienten

Ein beträchtlicher Anteil der PLS Patienten, 36,11%, litt unter Depressionen (26 von 72 Patienten). Bei den ALS Patienten handelte es sich nur um 12,12%, die an Depressionen erkrankt waren (n=16).

Folglich waren unsere PLS Patienten überraschender Weise merklich häufiger von Depressionen betroffen als die ALS Patienten.

Wenn überhaupt, wäre man davon ausgegangen, dass eher ALS Patienten unter Depressionen leiden, da ihre Prognose drastisch schlechter ist als die der PLS Patienten. Jedoch sind motorisch stark eingeschränkte ALS Patienten entgegen unseren Vorstellungen nicht häufiger depressiv und weisen eine subjektiv gute Lebensqualität auf [D. Lulé et al. 2008]. Beatmete ALS Patienten gaben in der Untersuchung sogar eine bessere Lebensqualität an als ALS Patienten, die nicht beatmet wurden [D. Lulé et al. 2008]. Im Vergleich zu todkranken Krebspatienten waren ALS Patienten nicht vermehrt depressiv und hatten keine schlechtere Lebensqualität [D. Lulé et al. 2012].

Hinsichtlich der PLS gibt es keine Studien, die das Thema Depressionen behandeln. In bisherigen Publikationen wird ausschließlich die auftretende erhöhte Affektdurchlässigkeit besprochen, welche keinesfalls mit einer Depression gleichzusetzen ist.

Warum also unser PLS Kollektiv eher unter Depressionen leidet als die Patienten des ALS-Registers, lässt sich nur vermuten.

Zum einen könnte dies daran liegen, dass ALS Patienten hinsichtlich ihrer fatalen Prognose geringere Ansprüche und Forderungen an ihre Lebenssituation haben als PLS Patienten.

Zum anderen könnten eventuell rein statistische Ursachen eine Rolle spielen. Als Grundlage der Datenerhebung des PLS Kollektivs lagen häufig mehrere zeitlich auseinander liegende Untersuchungsbefunde vor. Im Gegensatz dazu handelte es sich bei den ALS Patienten in den meisten Fällen um einmalige Untersuchungen. Durch die höhere Anzahl an Befunden bei den PLS Patienten im Vergleich zu den ALS Patienten könnte die Wahrscheinlichkeit, eine Depression der PLS Patienten aufzudecken, größer sein.

4.1.2.3.2. Vergleich des Vorkommens von Blasenstörungen bei ALS und PLS Patienten

In unserer retrospektiven Untersuchung zeigte sich, dass 21 von 66 PLS Patienten (31,82%) an einem imperativen Harndrang litten. Der durchschnittliche Erkrankungszeitraum bis zum Auftreten der Blasenstörungen konnte bei 11 Patienten nachvollzogen werden. Er lag bei 5,82 +/-4,69 Jahren. Die minimale Zeitspanne, bis eine Blasenstörung eintrat, war 1 Jahr, die maximale 18 Jahre. Die PLS Patienten waren zum Zeitpunkt des Auftretens der Blasenstörung durchschnittlich 62,91 +/-11,01 Jahre alt.

Unter den ALS Patienten waren nur 12,88% (n=17) von Blasenstörungen betroffen.

Das vermehrte Auftreten von Blasenstörungen bei PLS Patienten im Vergleich zu ALS Patienten könnte durch eine Detrusor Hyperreflexie und/oder eine Spastik des inneren Blasensphinkters bei PLS Patienten erklärt werden [MA. Singer et al. 2007].

In weiteren Publikationen hatte etwa die Hälfte der PLS Patienten nach einer Zeitspanne von circa 4,5 Jahren Probleme mit Blasenstörungen [CE. Pringle et al. 1992][N. Le Forestier et al. 2001].

Der imperative Harndrang ist damit ein begleitendes Symptom, welches eher für eine PLS als eine ALS Erkrankung spricht.

4.1.2.3.3. Vergleich von Auffälligkeiten der Okulomotorik bei ALS und PLS Patienten.

Bei 25% der PLS Patienten ließen sich Auffälligkeiten der Okulomotorik finden (9 von 36 Patienten). Die meisten dieser betroffenen Patienten wiesen eine sakkadierte Blickfolgebewegung auf. Unter den ALS Patienten fielen nur 2,27% (n=3) durch einen Nystagmus auf.

Dieses Phänomen der gestörten Okulomotorik bei Patienten mit Motoneuronerkrankungen wurde schon einige Male beschrieben. Pringle et al. schilderten sakkadierte Blickfolgebewegungen bei 7 der 8 untersuchten PLS Patienten [CE. Pringle et al. 1992]. Auch Le Forestier et al. beobachteten bei 2 ihrer PLS Patienten eine Störung der Okulomotrik [N. Le Forestier et al. 2001]. In weiteren Publikationen wurde von langsamen vertikalen Sakkaden bei Patienten mit ALS berichtet [L. Averbuch-Heller et al.1998][B. Okuda et al. 1992][L. Jacobs et al. 1981]. In den Autopsien dieser betroffenen ALS Patienten wurden, neben histo-pathologischen Befunden die mit einer ALS vereinbar

waren, Zellverluste im rostralen interstitiellen Nukleus des medialen longitudinalen Faszikulus und der Substantia nigra gefunden [L. Averbuch-Heller et al. 1998][B. Okuda et al. 1992][L. Jacobs et al. 1981]. Die Autoren überlegten, dass das frühzeitige Auftreten von vertikalen Sakkaden auf eine besondere klinisch-pathologische Entität der MN Erkrankungen hinweisen, beziehungsweise, dass es sich um eine spezielle Gruppe von Mulitsystem Degnerationen handeln könnte [L. Averbuch-Heller et al. 1998][B. Okuda et al. 1992][L. Jacobs et al. 1981]. Kushner et al. dachten bereits 1984 darüber nach, ob Motoneuronerkrankungen eine heterogene Gruppe von Störungen umfassen könnten [MJ. Kushner et al. 1984].
Wir sehen durch die beschriebenen Befunde der Autopsien die Theorie bestätigt, dass bei Motoneuronerkrankungen nicht nur die Motoneurone selbst, sondern auch andere Einheiten des zentralen Nervensystems betroffen sein können, woraus die Vielfalt der Symptome der Patienten folgt.

4.1.2.3.4. Vergleich des Vorkommens von arterieller Hypertonie bei ALS und PLS Patienten

30,99% der PLS Patienten waren an einer arteriellen Hypertonie (aHT) erkrankt (22 von 71 Patienten). Unter den ALS Patienten waren es mit 41,22% (n=54) deutlich mehr.
Die Prävalenz der arteriellen Hypertonie liegt in den westlichen Ländern bei 25% [G. Herold et al. 2008]. Ab dem 60. Lebensjahr steigt diese allerdings auf 50% an [G. Herold et al. 2008]. Das Alter der PLS Patienten mit aHT lag bei 69,91+/-10,65 Jahren, das der ALS Patienten bei 65,61+/-11,55 Jahren.
Die ALS Patienten des ALS-Registers Schwaben unterscheiden sich folglich hinsichtlich der Prävalenz der aHT nicht von der Allgemeinbevölkerung. PLS Patienten scheinen sogar seltener an arterieller Hypertonie zu leiden als die Allgemeinbevölkerung.

In der Literatur wird nicht über Auffälligkeiten bei PLS Patienten hinsichtlich einer aHT berichtetet, jedoch über hypertensive Entgleisungen und Blutdruckerhöhungen bei ALS Patienten [HL. Lee et al. 2012][C. Moreau et al. 2012]. Diese traten bei ALS Patienten häufiger auf als in den entsprechenden Kontrollgruppen [HL. Lee et al. 2012][C. Moreau et al. 2012]. Die Autoren gehen davon aus, dass eine autonome Dysregulation bei der

Entstehung der aHT bei ALS Patienten eine Rolle spielt [HL. Lee et al. 2012] [D. Linden et al. 1998][T. Shimizu et al. 1996]. Es wurden Hinweise darauf gefunden, dass bei ALS Patienten eine sympathische Signalverstärkung, zusätzlich zu einer vagalen Signalabschwächung, begleitet von einer reduzierten Barorezeptor Sensitivität vorliegt [D. Linden et al. 1998][T. Shimizu et al. 1996]. Diese Phänomene sind auch bei Patienten mit essentieller Hypertonie zu finden [D. Linden et al. 1998].
In einer Studie von Moreau et al. 2012 wurde gezeigt, dass die Anzahl der Jahre, in denen ALS Patienten an einer Hypertonie litten, positiv vergesellschaftet waren mit dem Überleben dieser Patienten (HR = 1.04 (1.01-1.07))[C. Moreau et al. 2012]. Moreau und seine Kollegen stellten daher die Überlegung an, dass das vermehrte Vorkommen von Hypertension bei ALS Patienten kompensatorisch ausgelöst sein könnte, um einer zu geringen Sauerstoffzufuhr der Motoneuronen entgegen zu wirken [C. Moreau et al. 2012].

Anhand unserer Zahlen scheinen diese autonomen Dysregulationen bei PLS Patienten eher nicht aufzutreten.

4.1.2.3.5. Vergleich des Auftretens von Diabetes mellitus Typ 2 bei ALS und PLS Patienten

Bei jeweils 4 von 71 PLS Patienten (5,63%) war ein Diabetes mellitus Typ 2 diagnostiziert worden, unter den ALS Patienten waren es mehr als doppelt so viele 14,50% (n=19).
In einer anderen Studien zeigte sich hingegen kein signifikanter Unterschied bei dem Auftreten von Diabetes mellitus zwischen ALS und PLS Patienten [MC. Tartaglia et al. 2007]. Leider gibt es keine weiteren Untersuchungen, die sich mit dem Thema Diabetes mellitus bei PLS Patienten auseinander setzen.
Im Alter von 60 Jahren liegt die Prävalenz des Diabetes mellitus Typ 2 (D.m.2) in der Allgemeinbevölkerung bei 10% [G. Herold, 2008]. Damit befinden sich die ALS Patienten deutlich oberhalb der Prävalenz in der Allgemeinbevölkerung, während die PLS Patienten sogar darunter liegen.
Dass ALS Patienten deutlich häufiger unter D.m.2 leiden als die Allgemeinbevölkerung, wird auch in einer Studie von Reyes et al. beschrieben [ET. Reyes et al. 1984]. In weiteren Publikationen wird sogar erörtert, ob ein D.m.2 eventuell das Auftreten einer ALS etwas

verzögern könnte [A. Jawaid et al. 2010]. Es wird vermutetet, dass es einen Zusammenhang zwischen der Pathophysiologie der ALS und metabolischen Anomalien der Patienten gibt [ET. Reyes et al. 1984][A. Jawaid et al. 2010].
Die Datenlage zu diesem Thema ist jedoch beschränkt. Wenn wir aber von der Korrektheit dieser Hypothese ausgehen, könnten wir auf weitere Unterschiede in der Pathologie von ALS und PLS schließen, die bisher noch nicht aufgedeckt werden konnten.
Des Weiteren wird erneut deutlich, dass Motoneuronerkrankungen, wie bereits durch das Auftreten von Störungen der Okulomotorik zu sehen ist, über die Affektion des 1. und/ oder des 2. Motoneurons hinaus weitere physiologische Systeme betreffen können.

4.1.2.3.6. Zusammenfassung: Differenzierung zwischen PLS und ALS

In unserer Untersuchung hat sich gezeigt, dass einige klinische Charakteristika, selbst wenn sie sowohl bei der ALS als auch bei der PLS auftreten können, eher für eine PLS sprechen. Dazu gehört zum Beispiel das Auftreten ein Spastik. Zwar ist die Spastik ein allgemeiner Bestandteil der Symptomatik von MN Erkrankungen bei denen das 1.MN betroffen ist, dennoch wurde offenkundig, dass die Spastik zur Abgrenzung der PLS gegenüber der ALS verwendet werden kann, da sie bei der ALS eher selten auftritt. Nicht ganz so eindeutig lässt sich das auf gesteigerte oder kloniforme Reflexe übertragen. PLS Patienten weisen fast alle gesteigerte oder kloniforme Reflexe auf, dieser Anteil ist jedoch bei ALS Patienten ebenfalls relativ groß. Die Differenzierung fällt in diesem Punkt deshalb nicht so leicht, wie das für die Spastik der Fall ist.
Andersherum ist jedoch eindeutig zu beobachten, dass fehlende oder abgeschwächte Reflexe bei einer PLS Erkrankungen so gut wie nie auftreten.
Weiter konnten wir feststellen, dass Blasenstörungen im Sinne eines imperativen Harndrangs eher bei PLS als unter ALS Patienten auftreten. Ebenso verhält es sich mit dem Auftreten einer gestörten Okulomotorik.
Hypertonie und Diabetes mellitus Typ 2 scheinen hingegen eher ALS Patienten zu betreffen. Da aber sowohl die Hypertonie als auch der Diabetes mellitus in der Bevölkerung sehr weit verbreitet sind, ist es schwierig diese Erkrankungen zur Differenzierung zwischen ALS und PLS Patienten heranzuziehen. Des Weiteren müsste in

folgenden Untersuchungen erst belegt werden, dass es sich hier tatsächlich um unterschiedliche Prävalenzen handelt.

Gleichermaßen verhält es sich mit dem gehäuften Auftreten von Depressionen bei PLS Patienten im Vergleich zu ALS Patienten. Auch wenn in unserer Untersuchung die Zahlen eindeutig sind, ist dieses Phänomen mit Vorsicht zu betrachten. Es existieren keine weiteren Untersuchungen, die sich mit dieser Thematik beschäftigen. Daher muss geklärt werden, ob es hinsichtlich des Auftretens von Depressionen tatsächlich Differenzen zwischen ALS und PLS Patienten gibt, oder ob es sich ausschließlich um ein statistisches Phänomen handelt.

Was sich jedoch deutlich abzeichnet, ist der Fakt, dass MN Erkrankungen nicht auf MN beschränkt bleiben müssen, sondern auch andere Strukturen betroffen sein können. Bei diesen Strukturen muss es sich nicht einmal um neurologische Systeme handeln. Dies wird durch die vielseitigen Symptome der Patienten belegt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Differenzierung zwischen ALS und PLS, aufgrund der Zusammenschau aller klinischen und elektrophysiologischen Befunde, in einem für MN Erkrankungen spezialisierten neurologischen Zentrum erfolgen sollte. Die Erkenntnisse aus unserer Untersuchung können bei dieser Differenzierung als zusätzliche Anhaltspunkte herangezogen werden.

4.1.3. Diskussion interessanter Aspekte der PLS

4.1.3.1. Zigarettenkonsum der PLS Patienten

29,55% der PLS Patienten konsumierten, beziehungsweise hatten in ihrem Leben Zigaretten konsumiert. 30,43% der an PLS erkrankten Frauen waren oder sind Raucherinnen. 13,64% aller PLS Patienten hatten mit dem Rauchen aufgehört und 15,91% der PLS Patienten waren weiterhin aktive Raucher. Von diesen aktiven Rauchern waren 9,1% Frauen. Laut Mikrozensus rauchten 2009 25,7% der Menschen und 21,2% der Frauen in Deutschland [Mikrozensus, 2009].

Unter unseren PLS Patienten waren aktive Raucher folglich unterdurchschnittlich vertreten.

Vom Mikrozensus wurde jedoch nicht erhoben, wie viele Menschen in ihrem Leben jemals Zigaretten konsumiert hatten. Dies wäre interessant, da sich in einer prospektiven Studie von Doyle et al. 2012 und in einer Meta-analyse von Alonso et al. 2010 herausgestellt hatte, dass Frauen, die jemals in ihrem Leben geraucht hatten, ein um 20% erhöhtes Risiko hatten, an einer Motoneuronerkrankung zu erkranken [P. Doyle et al. 2012]. Dies galt selbst dann noch, wenn diese Frauen im Laufe ihres Lebens mit dem Rauchen aufgehört haben [P. Doyle et al. 2012]. Dabei war die Menge der Zigaretten nicht relevant, Raucherinnen, die weniger als 15 Zigaretten pro Tag rauchten und die die mehr als 15 Zigaretten pro Tag rauchten, hatten das gleiche Risiko [P. Doyle et al. 2012].

Auch in einem Evidenz basierten Review aus Studien von 2003 bis 2009 über exogene Risikofaktoren hinsichtlich des Auftretens einer sporadischen ALS stellte der Reviewer C. Armon fest, dass Rauchen als Risikofaktor für eine sporadische ALS berücksichtigt werden sollte [C. Armon, 2009]. Armon hatte bereits 2003 ein Review zu diesem Thema durchgeführt. Damals kam er ebenfalls zu der Schlussfolgerung, dass Rauchen ein möglicher Risikofaktor sein könnte, er nannte es einen „(more likely than not) risk factor for ALS“ [C. Armon, 2003].

Aufgrund der fehlenden Daten können wir nicht feststellen, ob unter unseren PLS Patienten im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung mehr Frauen Zigaretten konsumiert hatten. Daher können wir auch nicht nachvollziehen, ob die Ergebnisse von Doyle und Armon auf unsere Studie übertragbar sind.

Dass es weniger aktive Raucher in unserem PLS Patientenkollektiv gibt als in der Allgemeinbevölkerung, könnte daran liegen, dass bei vielen Patienten in Anbetracht ihrer Erkrankung das Gesundheitsbewusstsein geweckt wurde und sie daher das Rauchen aufgaben.

4.1.3.2. Rigor bei PLS Patienten

In der Literatur wird wenig und eher zurückhaltend von dem Vorkommen eines Rigors bei PLS Patienten berichtet. Meist wird von einem nicht näher beschriebenen „parkinsonism“

der PLS Patienten gesprochen, der aber sehr selten sei [MC. Tartaglia et al. 2007][M. Konagaya et al. 1998]. Mochizuki et al. beschrieben 2004 einen PLS Patienten, der im Verlauf seiner Erkrankung eine Bradykinesie und Rigidität des Halses und aller Extremitäten entwickelte [A. Mochizuki et al. 2004]. Die Behandlung des Patienten mit Carbidopa-Levodopa brachte eine minimale Verbesserung dieser Symptome [A. Mochizuki et al. 2004]. Gordon et al. schlugen bei der Einteilung der PLS sogar eine gesonderte Kategorie für Patienten mit zusätzlichen Symptomen wie Demenz, Parkinsonismus und Störungen der Somatosensorik, „PLS plus“, vor [MA. Singer et al. 2007].
Fakt ist, dass der Rigor bei PLS Patienten durchaus eine Rolle spielt und einen beachtlichen Anteil an der Klinik hat [AC. Ludolph, 2012]. Viele PLS Patienten leiden nicht nur unter einer Spastik, sondern unter einer Kombination aus Spastik und Rigor [AC. Ludolph, 2012]. In unserer Studie zeigten 6 von 44 Patienten einen Rigor 13,64%. Wir gehen jedoch davon aus, dass in der Realität deutlich mehr PLS Patienten von einem Rigor betroffen sind.
Bei der Untersuchung eines PLS Patienten wird häufig nicht explizit auf das Vorliegen eines Rigors geachtet, da dieses klinische Charakteristikum bisher nicht in das Bild der Symptomatik einer PLS Erkrankung passt, sondern eher einer Parkinson Erkrankung zugeordnet wird. Des Weiteren kann es unter Umständen schwierig sein, einen mit Spastik kombinierten Rigor bei der klinischen Untersuchung zu erkennen.

4.1.3.3. L-Dopa Substitution bei PLS Patienten

Die Grundlage für die Substitution von L-Dopa bei PLS Patienten beruht auf einer Entdeckung bei transgenen Mausmodellen der familiären ALS [V. Kostic et al. 1997]. Bei diesen anerkannten Cu/Zn-SOD Mausmodellen wurde ein signifikanter Verlust der dopaminergen Neuronen festgestellt [V. Kostic et al. 1997]. Diese Entdeckung passt zu den durch Autopsie gesicherten Degenerationen der Substantia nigra bei einigen familiären ALS Fällen [V. Kostic et al. 1977].
Schon 1970 stellte Barbeau fest, dass Symptome der ALS bei Patienten mit Parkinson-Demenz Komplex auftraten [A. Barbeau, 1970]. Aufgrund dieser Tatsache verordnete er einigen wenigen, schon sehr fortgeschrittenen Fällen L-Dopa und kam zu „überraschenden, nicht erklärbaren“ Ergebnissen [A. Barbeau, 1970].

In einer 1971 von Mendell et al. durchgeführten Studie zeigte sich, dass es durch L-Dopa Substitution bei ALS Patienten zu einer Verbesserung der Motorik kam [JR. Mendell et al. 1971].
2008 führte Göldner in seiner Dissertation einen Heilversuch von ALS Patienten mit Levodopa durch [AJM. Göldner, 2008]. Die Patienten wiesen zum Teil drastische Verbesserungen der Motorik an Armen und Beinen und eine deutliche Verringerung der muskulären Tonuserhöhung auf [AJM. Göldner, 2008]. Lira untersuchte daraufhin 2008 in ihrer Dissertation ein ALS Kollektiv auf die Langzeitwirkung von L-Dopa [SJ. Lira, 2008]. In diesem Kollektiv waren auch 2 PLS Patienten [SJ. Lira, 2008]. In ihrer Dissertation wurde offenkundig, dass vor allem Patienten mit einer Affektion des 1. MN, Patienten mit Rigor und/oder mit Spastik auf die Therapie mit L-Dopa ansprachen [SJ. Lira, 2008].
Bei der klinischen Anwendung dieser Erkenntnisse an der Universitätsklinik Ulm stellte sich über die Jahre heraus, dass der L-Dopa Effekt circa 1 bis 2 Jahre anhält [AC. Ludolph, 2012].
Bei 24 Patienten unseres Ulmer PLS Kollektivs wurde L-Dopa eindosiert. 5 dieser 24 Patienten erfuhren eine subjektive und objektive Verbesserung der Spastik, der Gehfähigkeit oder der Feinmotorik (20,83%). Bei 5 der 24 Patienten kam es zu keinerlei Verbesserungen (20,83%) und bei 14 PLS Patienten konnte anhand der Dokumentation nicht erfahren werden, welche Auswirkungen die L-Dopa Therapie hatte.
Immerhin hatten aber 28 von 59 Ulmer Patienten L-Dopa weiterhin als Medikation erhalten, ohne dass es dafür einen anderen ersichtlichen Grund gab. Dies deutet daraufhin, dass bei 28 von 59 Patienten die L-Dopa Therapie zu einer Funktionsverbesserung geführt haben muss (47,46%), da sonst eine dauerhafte Gabe von L-Dopa eingestellt worden wäre.
Zusammenfassend lässt sich also von einem positiven Effekt des L-Dopas berichten, den man sich sowohl in der Diagnostik als auch in der Therapie zu Nutze machen sollte.

4.1.3.4. Schilddrüsenerkrankungen bei PLS Patienten

Bei der Auswertung der Begleiterkrankungen der PLS Patienten kam der Eindruck auf, dass viele Patienten an Schilddrüsenfunktionsstörungen litten. Es stellte sich heraus, dass 13

von 72 Patienten (18,06%) an in irgendeiner Form gearteten Störung der Schilddrüse (SD) erkrankt waren.

Unter diesen 13 Patienten waren 7 die an einer Hypothyreose litten (53,85%). Diese 7 Hypothyreose Patienten waren ausschließlich Frauen. Dementsprechend waren 16,67% der an PLS erkrankten Frauen ebenfalls von einer Hypothyreose betroffen.

In der Allgemeinbevölkerung leiden 15% aller Frauen und 3 % aller Männer an einer Hypothyreose [JV. Kulic, 2012]. Es liegt also keine signifikante Abweichung der Prävalenz hinsichtlich einer Hypothyreose bei PLS Patienten im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung vor.

Allerdings bilden die Hypothyreose Patienten nur etwa die Hälfte der PLS Patienten mit SD Funktionsstörungen. Weitere 2 Patienten litten an einer SD Funktionsstörung unklarer Genese (2,78%) und die übrigen 4 Patienten litten an verschiedenen Funktionsstörungen wie Autoimmunthyreoiditis, Hyperthyreose, Z.n. SD-Op und unklarer Läsion im rechten SD Lappen. Insgesamt waren 26,19% der Frauen in irgendeiner Form an der SD erkrankt (11 von 42 Patientinnen).

Dies ist nicht das erste Mal, dass Schilddrüsen Erkrankungen im Rahmen einer Untersuchungen von Motoneuronerkrankungen auffallen [GE. Rodríguez et al. 2003][J. Itzecka et al. 2003]. Immer wieder wurde im Laufe der Jahre erörtert, ob durch eine Veränderungen des Schilddrüsenhormonspiegels oder anderen Veränderungen im Rahmen von SD Erkrankungen das Entstehen von Motoneuronerkrankungen begünstigt werden kann [GE. Rodríguez et al. 2003].

2003 untersuchte Itzecka et al. die Schilddrüsenfunktion von ALS Patienten [J. Itzecka et al. 2003]. Der Hormonspiegel der ALS Patienten unterschied sich aber nicht von dem der Kontrollgruppe und ließ sich auch nicht in Zusammenhang mit der Schwere der Klinik der ALS Patienten bringen [J. Itzecka et al. 2003]. Zu demselben Ergebnis kamen auch Rodríguez et al. ebenfalls im Jahr 2003 in ihrer Studie.

Bereits 1980 stellten McMenamin et al. dar, weshalb es sich bei dem anscheinend vermehrten Vorkommen von SD Erkrankungen bei MN Erkrankungen um einen reinen Zufall handeln könnte [J. McMenamin et al. 1980]. Die Autoren berechneten aufgrund der Prävalenz von MN Erkrankungen bei Frauen und der Prävalenz des Morbus Basedow bei

Frauen die Wahrscheinlichkeit, dass bei einer Frau beide Erkrankungen gleichzeitig auftreten könnten [J. McMenamin et al. 1980]. Sie kamen dabei auf eine Anzahl von etwa einer halben Million Frauen in Neuseeland innerhalb von 5-10 Jahren [J. McMenamin et al. 1980]. Als weiteres Argument brachten sie hervor, dass Patienten mit MN Erkrankung meist sehr genau untersucht werden und deshalb eher SD Erkrankung entdeckt werden könnten, als es bei der restlichen Bevölkerung der Fall sei [J. McMenamin et al. 1980]. Diese Argumentation ist durchaus schlüssig, sie könnte jedoch ebenso für jede andere Begleiterkrankungen bei Patienten mit Motoneuronerkrankungen erfolgen. Dennoch sind es die SD Funktionsstörungen die bei den Patienten mit Motoneuronerkrankungen immer wieder in Erscheinung treten.

Dies ist vor allem interessant, da Angelucci et al. bereits 1990 festgestellt hatten, dass durch TRH die Motoneurone im Rückenmark von Fröschen depolarisiert werden können [L. Angelucci et al. 1990]. Dadurch kommen gesteigerte monosynaptische Reflexe zustande [L. Angelucci et al. 1990]. Weiter zeigte sich in diesen Studien, dass TRH einen trophischen Effekt auf Kulturen von Rattenfetus Rückenmark hatte [L. Angelucci et al. 1990]. In diesem Zusammenhang wurde TRH wohl auch erfolgreich bei der Behandlung von ALS angewandt [L. Angelucci et al. 1990]. Auch Guiloff et al. berichteten, dass ein langwirksames TRH Analogon einen deutlichen positiven Effekt auf die bulbäre Symptomatik bei ALS Patienten hatte [RJ. Guiloff et al. 1987]. Die Sprache, der Muskeltonus, Faszikulationen und die Muskelkraft hätten sich bei diesen Patienten verbessert [RJ. Guiloff et al. 1987].

Der Zusammenhang zwischen SD- und Motoneuronerkrankungen konnte bisher nicht gefunden werden, und auch in unserer Studie vermögen wir ihn nicht eindeutig herzustellen. Auffällig ist jedoch, dass in unserer Untersuchung fast ausschließlich Frauen und nur 2 Männer von SD Erkrankungen betroffen sind. Dieser Anteil der Frauen mit 26,19% scheint doch beachtlich zu sein.

4.1.3.5. Kumulative Risikofaktoren für MN Erkrankungen

Bei der Literaturrecherche zur Auswertung unserer Studie hatte sich gezeigt, dass es Faktoren gibt, die bei der Entstehung und Progression der MN Erkrankungen eine Rolle

spielen könnten, dies konnte bisher jedoch nicht bewiesen werden. Dazu gehören auch Rauchen und SD- Funktionsstörungen bei Frauen.
Aus diesem Grund stellten wir die Überlegung an, ob eventuell die Kumulation dieser Faktoren ein Bestandteil der Pathogenese sein könnte. Diese Hypothese konnte anhand unserer Zahlen nicht belegt werden. Die Frauen, die Zigaretten konsumierten oder konsumiert hatten, wiesen keine SD Funktionsstörungen auf während die Frauen mit SD Funktionsstörungen keine Zigarettenkonsumentinnen waren.
Dennoch bleibt offen, ob alle Frauen jede Zigarette, die sie jemals in ihrem Leben konsumiert hatten, bei der Anamneseerhebung angegeben hatten. Da aber laut Doyle et al. auch ehemaliger Zigarettenkonsum in geringen Mengen eine Rolle spielt, lässt sich die kumulative Auswirkung der Faktoren Rauchen und SD-Erkrankungen bei Frauen nicht sicher ausschließen [P. Doyle et al. 2012].

4.1.3.6. Zusammenfassung: Interessante Aspekte der PLS

Im Rahmen unserer Untersuchung des PLS Kollektivs konnten wir einige interessante Aspekte beleuchten, die umstritten sind oder sich bisher nicht etabliert haben.
Darunter fällt die Existenz von Risikofaktoren für MN Erkrankungen. Nach den Autoren Armon und Doyle könnte Rauchen vor allem bei Frauen ein Risikofaktor sein. Sogar Frauen die nicht aktiv Rauchen, aber in ihrem Leben schon einmal geraucht haben könnten dadurch betroffen sein. Da wir keine vergleichbaren Zahlen hinsichtlich dieses Aspekts haben, konnten wir diese Frage anhand unserer Studie nicht klären.
Ein weiterer Punkt, den wir mit Hilfe unseres PLS Patienten Kollektivs beobachten konnten, war das Auftreten eines Rigors. Ein Rigor scheint im Rahmen einer PLS Erkrankung deutlich häufiger aufzutreten, als bisher angenommen beziehungsweise akzeptiert. Hinsichtlich dieser Thematik konnten unsere Zahlen nicht die endgültige Klärung bringen. Dennoch plädieren wir dafür einen Rigor als Bestandteil der PLS Symptomatik zu akzeptieren und weiter zu etablieren.
Ein weiterer Gesichtspunkt, den wir darstellen konnten, ist die L-Dopa Therapie bei PLS Patienten. Trotz Dissertationen und weiterer Publikationen zu diesem Thema, hat sich diese Option des Therapieversuchs noch nicht etabliert. Wir setzten uns dafür ein, den PLS

Patienten diese Option zugänglich zu machen. Auch wenn der positive Effekt dieser Therapie nur für ungefähr 1-2 Jahre anhält. Anhand unserer Zahlen ist zu erkennen, dass circa die Hälfte der behandelten Patienten eine objektive oder subjektive Verbesserung ihrer Symptome erfahren hatten.

Eine weitere Thematik war der Zusammenhang zwischen SD Funktionsstörungen und MN Erkrankungen. Wir gehen davon aus, dass in irgendeiner Form eine Interaktion zwischen MN Erkrankungen und SD Funktionsstörungen zu finden sein könnte, vor allem was SD Erkrankungen bei Frauen betrifft.
Zu guter Letzt beleuchteten wir die Möglichkeit von kumulativen Risikofaktoren. Wenn SD Funktionsstörungen und Rauchen eventuell eine Rolle bei MN Erkrankungen vor allem von Frauen spielen, dies aber nicht signifikant bewiesen werden kann, könnte dies auch daran liegen, dass nur das Zusammenspiel dieser Faktoren das Risiko erhöht. Anhand unserer Studie konnten wir das Vorkommen von kumulativen Risikofaktoren nicht bestätigen, aber auch nicht sicher ausschließen.

4.1.4. Diskussion der Pringle Kriterien

In unserer Untersuchung hat sich gezeigt, dass einige Forderungen, welche in den Pringle Kriterien für die sichere Diagnose der PLS gestellt werden, diskutiert werden sollten.

4.1.4.1. Die Pringle Kriterien

1. Beginn der Erkrankung im Erwachsenenalter.
2. Progression der Erkrankung über mindestens 3 Jahre.
3. Negative Familienanamnese für Motoneuronerkrankungen (MND).
4. Nahezu symmetrische, beidseitige Beteiligung der Pyramidenbahn mit Gesichtsbeteiligung.
5. Unauffälliges Serumlabor hinsichtlich Vitamin B12 und Folsäure Mangel.
6. Negative Testung für oligoklonale Banden, Syphilis, Lyme- Borreliose und HTLV-1/2 im Liquor.
7. Keine Kompressionen der Medulla spinalis im MRT der Halswirbelsäule.

8. Keine Signalanhebungen im MRT des Schädels.
9. Keine Denervationspotentiale in der Elektromyographie

[CE. Pringle et al. 1992]

4.1.4.2. Zu Punkt 1 der Pringle Kriterien: Beginn der Erkrankung im Erwachsenenalter

Die Forderung nach dem Beginn der PLS Erkrankung im Erwachsenenalter konnte von unserem Patientenkollektiv zwar eingehalten werden, dennoch stellt sich die Frage, ob dieser Anspruch als Einschlusskriterium für die PLS Diagnose herangezogen werden sollte. In der Literatur wurden Fälle von PLS Erkrankungen bei Kindern beschrieben [ML. Grunnet et al. 1989]. In einem der Fälle handelt sich um ein Kind, das vor dem 12. Lebensmonat eine fortschreitende Motoneuronerkrankung entwickelte, die durch eine generalisierte Spastik gekennzeichnet war [ML. Grunnet et al. 1989]. Dieses Kind verstarb mit 47 Monaten [ML. Grunnet et al. 1989]. In der post mortem durchgeführten neuropathologischen Untersuchung zeigte sich eine ausschließliche Degeneration des kortikospinalen Trakts [ML. Grunnet et al. 1989]. Grunnet und seine Kollegen schlossen aus den klinischen und neuropathologischen Befunden, dass dieses Kind an einer typischen PLS Erkrankung gelitten hatte [ML. Grunnet et al. 1989]. Wenn man die Pringle Kriterien anwendet, müsste diese klinisch und neuropathologisch fundierte Diagnose als falsch angesehen werden. Dieses Kriterium ist dementsprechend als wissenschaftlich sehr fragwürdig anzusehen.

4.1.4.3. Zu Punkt 2 der Pringle Kriterien: Progression der Erkrankung über mindestens 3 Jahre

Pringle möchte mit Hilfe dieses Kriteriums vor allem Fehldiagnosen von ALS Patienten mit Dominanz des 1. Motoneurons vermeiden. Die PLS Patienten in unserer Untersuchung mussten durchschnittlich 4 +/- 4 Jahre von Beginn ihrer Symptome bis zur Diagnose ihrer PLS Erkrankung warten. Ein Patient musste sogar 21 Jahre auf seine Diagnose warten. Singer et al. beschreiben in ihrer Studie mit 25 Patienten ein ähnliches Phänomen, die Patienten warteten ebenfalls circa 3,2 Jahre auf die PLS Diagnose, der Zeitraum lag dabei zwischen 1 und 10 Jahren.

Dies zeigt, dass die Forderung von Pringle nach einem dreijährigen Beobachtungszeitraum eher über- als unterschritten wird.
In unserer Untersuchung lag die Erkrankungsdauer der Patienten mit diskreter Beteiligung des 2. MN durchschnittlich bei 8,4+/-5,0 Jahren (Range: 2-21 Jahre).
Natürlich geht es Pringle nicht um die diskrete Beteiligung des 2. MN, sondern gerade um die ausgeprägte, was für eine ALS sprechen würde. Allerdings, wenn PLS Patienten selbst nach 21 Jahren noch eine diskrete Beteiligung des 2. MN entwickeln, könnten sie theoretisch auch zu jedem anderen beliebigen Zeitpunkt eine deutliche Beteiligung des 2. MN ausbilden.
Unser Vorschlag wäre daher, anhand einer prospektiven Studie zu untersuchen, zu welchem Zeitpunkt der Hauptanteil der Patienten Zeichen des 2. MN entwickelt. So könnte ein empirisch gesicherter Zeitpunkt für die Diagnosefindung festgelegt werden. Zweifellos wird es aber auch bei einem derart festgelegten Zeitraum immer wieder Patienten geben, die außerhalb dieses Zeitfensters eine Beteiligung des 2.MN ausbilden. Die Patienten müssten darüber aufklärt werden, dass eine gewisse Wahrscheinlichkeit besteht, dass die Diagnose PLS im Verlauf reevaluiert werden muss. Diese Aufklärung, über eine mögliche Änderung der Diagnose, müssen aber ohnehin alle Patienten mit der Diagnose Motoneuronerkrankung erhalten, bei denen diese Diagnose nicht genetisch oder durch Biomarker gesichert werden konnte.

2 unserer PLS Patienten wiesen bis zum Zeitpunkt der Auswertung eine Erkrankungsdauer von 2 Jahren auf. Wir schlossen diese beiden Patienten, bei eindeutigen PLS Symptomen, ohne jegliche klinische und elektrophysiologische Beteiligung des 2. Motoneurons, im Hinblick auf die oben genannten Gründe bei der Auswertung unserer Datenbank nicht aus.

4.1.4.4. Zu Punkt 3 der Pringle Kriterien: negative Familienanamnese für MND

Pringle et al. stellten diese Forderung, um die PLS gegen die HSP (hereditäre spastische Paralyse) abzugrenzen. Dies ist ein wichtiger Aspekt, dennoch stellt sich die Frage, ob eine positive Familienanamnese als Ausschlusskriterium gehandhabt werden sollte. 9 unserer

PLS Patienten verfügten über positive neuromuskuläre Familienanamnesen. Dies waren zwar keine positiven Familienanamnesen hinsichtlich einer eindeutig diagnostizierten PLS der Verwandten, es handelte sich zum Beispiel um einen Großvater mit Gangstörung unbekannter Genese oder Eltern, die an einer „Multiplen Sklerose“ erkrankt waren. Aus heutiger Sicht lässt sich aber nicht ausschließen, dass sich hinter diesen Diagnosen eine unerkannte PLS oder ALS Erkrankung verbirgt [AC. Ludolph, 2012]. In der damaligen Zeit wurden PLS Erkrankungen häufig gerade als Multiple Skler
ose oder atypisches Parkinson-Syndrom fehl diagnostiziert [IM. Norlinah et al. 2007]. Des Weiteren hat sich in den letzten Jahren gezeigt, dass es durchaus Familien mit vererbter PLS zu geben scheint [N. Dupré et al. 2007][PN. Valdmanis et al. 2008]. Es wurden sogar in 2 nicht verwandten SOD1- negativen ALS Familien jeweils ein PLS Patient entdeckt [F. Brugman et al. 2005].

In einer weiteren genetischen Untersuchung von Brugman et al. 2008 wurden Gene gesucht, die für UMN Syndrome verantwortlich sein könnten. Brugman stieß dabei auf Paraplegin Mutationen, die eine häufige Ursache für sporadische spastische Paraparesen sind [F. Brugman et al. 2008].

Zusammenfassend deutet dies darauf hin, dass eine genetische Komponente bei PLS Patienten vorhanden sein kann. Wir plädieren daher dafür, eine negative Familienanamnese nicht als Einschlusskriterium, sondern vielmehr als zusätzliches diagnostisches Kriterium einzusetzen. Wir nahmen Patienten mit „positiver“ Familienanamnese dementsprechend nicht aus der Datenbank (DB), sondern ließen im Gegenteil die Genetik dieser Patienten untersuchen.

4.1.4.5. Zu Punkt 4 der Pringle Kriterien: Nahezu symmetrische, beidseitige Beteiligung der Pyramidenbahn mit Gesichtsbeteiligung

4.1.4.5.1. Gesichtsbeteiligung:

In einer Studie von Le Forestier et al. entwickelten von 9 PLS Patienten nur 2 Symptome einer fazialen Hypokinesie oder Amimie [N. Le Forestier et al. 2001]. Das Gleiche zeigte sich in einer Studie von Norlinah et al., in dieser entwickelte von 5 nur 1 Patient nach 2 Jahren eine Gesichtsbeteiligung [IM. Norlinah et al. 2007]. Die Gesichtsbeteiligung ist also

kein Muss, um eine PLS eindeutig diagnostizieren zu können. Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass Pringle et al. nicht die Urheber dieses Kriteriums sind, sondern dass es im Laufe der Zeit eingeführt wurde [N. Le Forestier et al. 2001].

4.1.4.5.2. Nahezu symmetrische, beidseitige Beteiligung der Pyramidenbahn:

In unserer Untersuchung hat sich entgegen der Pringle Kriterien gezeigt, dass die PLS eher nicht symmetrisch ist, sondern vielmehr meist das Gegenteil zutrifft: Die PLS ist in der Regel asymmetrisch. 31% unserer PLS Patienten ließen eine Asymmetrie der Spastik und 57% eine Asymmetrie der Paresen erkennen. Asymmetrische Pyramidenbahnzeichen waren bei 40,91% der PLS Patienten zu sehen. Insgesamt war eine Asymmetrie entweder der Spastik, der Paresen, der Reflexe oder der Pyramidenbahnzeichen bei 79,07% der PLS Patienten zu beobachten. Auch in anderen Studien hat sich gezeigt, dass PLS Patienten, vor allem in den Anfangsstadien, eine asymmetrische Klinik aufweisen [JL. Gastaut et al. 1988] [ML. Grunnet et al. 1989].

Wir schließen daraus, dass eine Asymmetrie der Spastik, der Paresen, der Reflexe und der Pyramidenbahnzeichen bei der PLS in fast allen Fällen gegeben ist [AC. Ludolph, 2012]. Daher sollte unserer Meinung nach selbst die einschränkende Formulierung von Pringle „nahezu symmetrisch“ nicht als diagnostisches Kriterium für eine PLS Erkrankung herangezogen werden.

4.1.4.6. Zu Punkt 5 der Pringle Kriterien: Unauffälliges Serumlabor hinsichtlich Vitamin B12 und Folsäure Mangel.

Da es sich bei der PLS um eine Ausschlussdiagnose handelt, ist es sinnvoll durch ein einfache Serumdiagnostik andere Ursachen der Symptome zu eliminieren. Eine besondere Rolle spielt dabei der Vitamin B12 und Folsäure Mangel. Diese Vitaminmängel können neurologisches Symptome hervorrufen, die eine PLS teilweise nachahmen können [JL Cabrerizo-García et al. 2012]. Mangel an Folsäure provoziert diverse neurodegenerative Störungen [T. Partearroyo et al. 2012]. Verursacht durch Vitamin B12 Mangel kann eine funikuläre Myelose auftreten, die meist mit symmetrischen Störungen der Pallästhesie und mit motorischen Symptomen wie Kraftverlust, Spastik sowie kloniformen,

abgeschwächten oder fehlenden Reflexen einhergeht [JL Cabrerizo-García et al. 2012]. Zwar sind diese Vitaminmangelzustände eher selten, da es sich aber um leicht behebbare Störungen handelt, sollten sie unbedingt vor der PLS Diagnose ausgeschlossen werden [JL Cabrerizo-García et al. 2012].

4.1.4.7. Punkt 6 der Pringle Kriterien : Negative Testung für oligoklonale Banden, Syphilis, Lyme-Borreliose und HTLV-1/2 im Liquor.

Die Liquoruntersuchung wird hauptsächlich durchgeführt, um neurologische Erkrankungen inflammatorischen Ursprungs wie MS, Syphilis, Lyme-Borreliose und HTLV-1//2 auszuschließen [S. Jesse et al. 2011]. Diese entzündlichen Erkrankungen können die Symptome einer PLS mimen.

Vor allem in früheren Zeiten wurden MS Fälle mit einer ALS oder PLS verwechselt. Durch oligoklonale Banden in Kombination mit einem MRT des Schädels, kann MS heute sicher als Differenzialdiagnose eliminiert werden [LM. Villar et al. 2005].

Bei der Syphilis handelt sich um eine Erkrankung, die viele verschiedene neurologische Symptome hervorrufen kann, darunter Hör- und Visus-Verluste, pyramidale und extrapyramidale Symptome, aber auch Demenz, die sich ähnlich wie eine Alzheimer Demenz verhält [M. Raycheva et al. 2012][EM. Draper et al. 2012]. Aus diesem Grund wird sie auch "the great imitator" genannt [SE. Parker et al. 2012]. Seit einigen Jahren ist die Syphilis erneut auf dem Vormarsch. Aus diesem Grund darf sie bei den Ausschlussdiagnosen nicht außer Acht gelassen werden [PL. Mattei et al. 2012].

1988 beschrieben Fredrikson et al. einen Patienten, der eine Borrelia burgdorferi Spirochäten Infektion hatte, die die Klinik einer Affektion des 1. MN zeigte ohne jegliche sensorische Beeinträchtigung [S. Fredrikson et al. 1988]. Auch die Infektion mit HTLV-1/2 scheint Symptome einer Beteiligung des 1.MN zu verursachen [S. Fredrikson et al. 1988].

Wir empfinden die Liquoruntersuchung daher auch weiterhin als einen wichtigen Bestandteil der PLS Diagnostik. Wir regen ferner an, nach weiteren neurotropen Erregern einer Myelitis wie zum Beispiel HSV zu suchen und auch HIV als Ursache der Smyptomatik zu berücksichtigen. Wir würden daher eine umfassendere Formulierung, wie z.B. keine inflammatorischen Zeichen im Liquor und Abwesenheit von oligoklonale Banden,

bevorzugen.

4.1.4.8. Punkt 7 der Pringle Kriterien: Keine Kompressionen der Medulla spinalis im MRT der Halswirbelsäule.

Eine Kompression der Medulla spinalis erzeugt Symptome wie zum Beispiel eine Paraparese, eine Beeinträchtigung der Oberflächensensibilität, neuropathische und radikuläre Schmerzen, Blasenfunktionsstörung und Taubheitsgefühle der Beine [N. Pencovich et al. 2012][T. Simon et al 2012]. Zwar sind dies eher nicht die typischen Symptome einer PLS, trotzdem fordern Pringle et al. den Ausschluss einer Kompression der Medulla spinalis durch ein MRT. Vor allem da eine zervikale Myelopathie operativ behandelbar ist, sind auch wir der Meinung, dass diese unbedingt ausgeschlossen werden muss. Aus diesem Grund ist das MRT der Halswirbelsäule auch heute ein sehr wichtiger Bestandteil auf dem Weg zur PLS Diagnose.

4.1.4.9. Punkt 8 der Pringle Kriterien: Keine Signalanhebungen im MRT des Schädels.

Durch diese Forderung möchte Pringle Signalanhebungen, wie sie bei einer MS gesehen werden können, ausschließen [CE. Pringle et al. 1992]. Letztendlich wird diese genaue Definition der Konfiguration der Signalanhebungen aber häufig außer Acht gelassen. Dieses Ausschlusskriterium ist daher kritisch zu betrachten. Die Diagnose der MS wird heutzutage auf mehrere Säulen gestützt: Oligoklonale Banden im Liquor, typisch lokalisierte Signalanhebungen im MRT Schädel und eine teilweise sehr typische Klinik. Daher ist die Wahrscheinlichkeit, die MS mit einer PLS zu verwechseln, in der heutigen Zeit gering.

Weiter sind Signalanhebungen im MRT nicht nur bei einer MS sondern beispielsweise auch bei subkortikaler vaskuläre Enzephalopathie (SVE) zu finden. Die SVE äußert sich durch motorische Symptome wie Gangstörungen, posturale Instabilität und Verlangsamung der Sprache und der Motorik [H. Baezner et al. 2003][H. Merkli et al. 2001]. Hauptsächlich zeichnet sich die SVE durch eine stark fortschreitende Demenz aus [DR. Thal et al. 2012]. In unserem Patientenkollektiv wiesen 29,55% der Patienten Signalanhebungen im MRT auf (13 von 44). Bei 9,09% war eine SVE diagnostiziert worden

(4 von 44). Bei den übrigen Patienten handelte es sich um unspezifische Einzelerscheinungen.
Bei Signalanhebungen im MRT sollte an Differentialdiagnosen gedacht werden. Jedoch ist zu bedenken, dass das Alter der PLS Patienten durchschnittlich bei um die 60 Jahre liegt. In diesem Alter sind Intensitätserhöhungen im MRT keine Seltenheit. Die Befunde des MRTs müssen daher immer im Kontext der Ergebnisse der Liquor-, der Labor- und vor allem der klinischen Untersuchung bewertet werden.

4.1.4.10. Zu Punkt 9 der Pringle Kriterien: Denervationspotentiale in der Elektromyographie

Mit Hilfe der Elektrophysiologie können Schädigungen des 2. Motoneurons nachgewiesen werden. Dazu gehören pathologische Spontanaktivitäten wie Fibrillationspotentiale und positive scharfe Wellen [N. Le Forestier et al. 2001]. Faszikulationen, die klinisch nicht wahrgenommen werden, können teilweise durch die Elektromyographie dargestellt werden. Bei leichter Muskelanspannung können Zeichen von chronischer Denervierung, im Sinne von großen Muskelsummenaktionspotenzialen (MSAP) mit erhöhtem Anteil an polyphasischen Potenzialen, nachgewiesen werden [S. Körner et al. 2011]. Ein gelichtetes Interferenzmuster kann sich bei maximaler Muskelanspannung offenbaren und deutet ebenfalls auf eine Denervierung hin [S. Winter et al. 2004].

Bei einigen unserer PLS Patienten zeigten sich zum einen bei der klinischen Untersuchung zum anderen in der Elektromyographie diskrete Zeichen einer Beteiligung des 2. MN.
Zum Beispiel ließen 33,82% der PLS Patienten geringgradige Atrophien an den OE oder UE erkennen. Hauptsächlich waren die OE, im Sinne von dezenten Atrophien der kleinen Handmuskeln, betroffen (29,4%). 43,06% der PLS Patienten hatten Faszikulationen. Diese offenbarten sich im Wesentlichen an den unteren Extremitäten (37,5%).
Die geringe Ausprägung der Atrophien und Faszikulationen der jeweils betroffenen PLS Patienten ließ sich auch daran erkennen, dass diese Phänomene nach der ersten Beobachtung bei jeder weiteren Dokumentation der klinischen Untersuchung der Patienten teils nicht mehr genannt wurden.

Im EMG zeigten 42,31% der Patienten eine dezente Beteiligung des 2. MN. Wie bei der klinischen Beteiligung des 2. MN handelte es sich um sehr unauffällige Phänomene.
Die Prominenz des 1. MN war zu jeder Zeit eindeutig gegeben. Die Ergebnisse der Elektromyographie als auch die der klinischen Befunde waren stets mit der Diagnose PLS vereinbar.

1992 waren Pringle und seine Kollegen mit eben dieser auch bei unseren Patienten beobachteten, diskreten Beteiligung des 2. MN in der Elektrophysiologie ihrer Patienten konfrontiert. Sie hatten 8 Patienten 1 bis 4 mal im Zeitraum von 1 bis 18 Jahren elektrophysiologisch untersucht [CE. Pringle et al. 1992]. Bei 2 Patienten, die bei der erstmaligen EMG Untersuchung keinerlei Hinweise auf eine Denervation erkennen ließen, waren in der 2 Jahre später wiederholten Untersuchung gelegentliche Fibrillationen zu sehen [CE. Pringle et al. 1992]. Pringle und seine Kollegen nahmen daher an, dass dezente Zeichen einer Denervation in der Elektrophysiologie auch bei der PLS vorliegen könnten [A. Piquard et al. 2006]. Sie drückten dies in ihren PLS Diagnosekriterien wie folgt aus: "absence of denervation potentials or, at most, occasional fibrillation and increased insertional activity in a few muscles (late and minor)" [CE. Pringle et al. 1992]. Weiter fügten sie hinzu, dass durch wiederholte EMG Kontrollen im Verlauf die signifikante Beteiligung des 2. Motoneurons ausgeschlossen werden sollte [CE. Pringle et al 1992].

Nicht nur Pringle auch anderen Autoren bemerkten während ihren Studien, dass die beobachteten PLS Patienten im Krankheitsverlauf eine Affektion des 2. Motoneurons entwickelten [MC. Tartaglia et al. 2007][RP. Bruyn et al. 1995]. Le Forestier et al. beschrieben, dass nach einer dreijährigen Beobachtung von 9 PLS Patienten bei keinem der Patienten eine klare Abwesenheit einer Beteiligung des 2. MN bestätigt werden konnte [N. Le Forestier et al. 2001]. Le Forestier stellte daher die Theorie auf, dass bei den PLS Patienten Perioden der Denervation stattfänden [N. Le Forestier et al. 2001]. Diesen Perioden der Denervation würden nach einiger Zeit Perioden der Reinnervation folgen [N. Le Forestier et al. 2001]. Diese Theorie würde eine zeitweilige Beteiligung beziehungsweise bei progredienter PLS Erkrankung eine chronische Affektion des 2. MN

erklären [N. Le Forestier et al. 2001]. Zur Bekräftigung ihrer Theorie führt Le Forstier post mortem Studien an, in denen von einer Demyelinisierung der Vorderhörner berichtet wird, die allerdings deutlich geringer ausgeprägt sei als bei ALS Patienten [N. Le Forestier et al. 2001][MF. Beal et al. 1981][CL. Short et al. 2005]. Weiter stellt die Gruppe um Le Forestier die Überlegung an, dass PLS Patienten genau durch diese Perioden der De- und Reinnervation einen deutlich längeren Verlauf und eine bessere Prognose haben als ALS Patienten [N. Le Forestier et al. 2001].
Weitere Überlegungen sind, dass eine Beteiligung des 2.MN bei der PLS nach einer gewissen Zeit den Übergang der PLS zu einer ALS darstellt [MC Tartaglia et al. 2007]. Beziehungsweise, dass die PLS eine langsam fortschreitende Form der ALS ist [MC Tartaglia et al. 2007]. Tartaglia et al. und Forestier et al. schrieben dazu, dass der Verlauf der PLS ein langsamerer und auch insgesamt anderer Prozess sei als der bei der ALS zu beobachtende. Sie fordern in Betracht zu ziehen, dass die PLS nicht auf das UMN begrenzt bleibt [MC Tartaglia et al. 2007][N. Le Forestier et al. 2001].
Wir schließen uns der Meinung von Tartaglia und Forestier an. Bei der PLS bleibt die Degeneration in vielen Fällen nicht auf das 1. MN beschränkt. Die Abgrenzung der PLS zur ALS kann unter diesen Umständen nur noch anhand des Grades und der Stabilität des Befalls des 2. MN erfolgen.

4.1.4.11. Zusammenfassung der Pringle Kriterien

Die Pringle Kriterien sind 1992 entstanden. Seit dieser Zeit ist das Wissen über die Primäre Lateralsklerose stetig gewachsen. Aus diesem Grund erscheinen uns einige Punkte der Pringle Kriterien umstritten.

Zu diesen unserer Ansicht nach strittigen Kriterien gehören:

1. Beginn der Erkrankung im Erwachsenenalter, gewöhnlich im 5. Lebensjahrzehnt oder später.
2. Progression der Erkrankung über 3 Jahre.
3. Negative Familienanamnese für MND.
4. Nahezu symmetrische, beidseitige Beteiligung der Pyramidenbahn mit

Gesichtsbeteiligung.

5. Keine Denervationspotentiale in der Elektromyographie.
6. Negative Testung für oligoklonale Banden, Syphilis, Lyme-Borreliose und HTLV-1/ 2 im Liquor.

Die bis zur heutigen Zeit wissenschaftlich fundierten Punkte der Pringle Kriterien sind:

1. Unauffälliges Serumlabor hinsichtlich Vitamin B12 und Folsäure Mangel.
2. Keine Kompressionen der Medulla spinalis im MRT der Halswirbelsäule.
3. Keine MS typischen Läsionen im MRT des Schädels.

Letztendlich reicht die Erfüllung dieser 3 anerkannten Punkte nicht aus, um die Diagnose PLS zu stellen. Jedoch erscheint das Aufstellen dogmatischer klinischer Kriterien für die Diagnostik nicht sinnvoll, da sich die PLS häufig durch eine vielfältige Symptomatik äußert. Unser Vorschlag zur Modifizierung der Pringle Kriterien wäre daher, wie bereits von Pringle 1992 vorgeschlagen, die erneute Einteilung in 3 Kategorien: Ein klinisches Hauptkriterium, Einschlusskriterien und Nebenkriterien.

4.1.4.12. Modifizierte Fassung der diagnostischen Kriterien

4.1.4.12.1. Kategorie 1: Ein einziges klinisches Hauptkriterium

Progressive und fast ausschließliche Affektion des 1. MN im Sinne einer spastischen Parese, gesteigerter monosynaptischer Reflexe und positiver Pyramidenbahnzeichen.

4.1.4.12.2. Kategorie 2: Einschlusskriterien

Zum sicheren Ausschluss andere Diagnosen:

1. Normales Serumlabor inklusive Vitamin B12 und Folsäure Spiegel.
2. Keine Entzündungszeichen im Liquor und Abwesenheit von Oligoklonalen Banden.
3. Keine Kompression des Myelons im spinalen MRT.
4. Keine einer MS ähnlich konfigurierten Intensitätserhöhungen im MRT Schädel.
5. Abwesenheit von Denervationspotentialen bzw. ausschließlich gelegentliche Fibrillationen oder gesteigerte Muskelaktivität im EMG.

4.1.4.12.3. Kategorie 3: Nebenkriterien

1. Störungen der Okulomotorik
2. Positiver Effekt der L-Dopa Therapie
3. Blasenentleerungsstörungen wie beispielsweise Dranginkontinenz
4. Negative Familienanamnese

Das klinische Hauptkriterium, als auch die Einschlusskriterien müssen erfüllt werden. Die Nebenkriterien können die PLS Diagnose weiter absichern, müssen aber nicht zwangsläufig erfüllt sein.

Im Gegensatz zu Pringle et al. die die erhaltenen Blasenfunktion der Patienten forderten, sprechen unsere Daten dafür, dass PLS Patienten unter imperativen Harndrang leiden. 21 von 66 PLS Patienten litten unter imperativem Harndrang (31,82%) im Gegensatz zu 12,88% (n=17) der ALS Patienten.

Weitere diagnostische Forderungen und Einschränkungen sind unserer Ansicht nach für die Diagnose der PLS nicht nötig. Die Abgrenzung gegen die ALS erfolgt dann allein anhand des Ausmaßes und der Stabilität der Beteiligung des 2. MN. Wie auch schon von Le Forestier et al. und Tartaglia et al. gefordert.
Solange kein Biomarker für die PLS Diagnostik identifiziert werden kann, kann die Diagnose PLS nicht mit absoluter Sicherheit gestellt werden. Bis zu diesem Zeitpunkt wird es immer PLS und ALS Fälle geben, die Diskussionen hervorrufen.

4.1.5. Diskussion der Methode

Bei unserer statistischen Erhebung handelt es sich um eine retrospektive Aktenstudie. Diese Form der Erhebung birgt ein gewisses Fehlerpotential.
Manche Symptome könnten in unserem PLS Kollektiv im Verhältnis zur Realität zu häufig positiv erhoben worden sein.
Dies könnte daran liegen, dass in Arztbriefen eher dokumentiert wird, worunter ein Patient leidet, und nicht, woran er nicht leidet. Als einfaches Beispiel führen wir das Symptom Faszikulationen an. Wenn ein Patient Faszikulationen aufwies, wurde dies im

Arztbrief dokumentiert und folglich in der Datenbank aufgenommen. Wenn ein Patient aber nicht unter Faszikulationen litt, wurde dies im Arztbrief eher nicht dokumentiert. Dementsprechend fällt dieser Patient bei der Auswertung hinsichtlich der Faszikulationen aus der DB.
Auf diese Weise könnten mehr Patienten ohne Faszikulationen, als Patienten mit Faszikulationen aus der Auswertung gefallen sein.

Die Patientenzahl unserer Studie erscheint auf den ersten Blick vergleichsweise gering. Von allen bislang zur PLS durchgeführten Untersuchungen weist unsere jedoch die größte Patientenzahl auf. In den bisherigen Studien wurden zwischen 8 und 46 Patienten untersucht [CE Pringle, 1992][J. Kuipers-Upmeijer,2001][MA. Singer, 2005]. Dies liegt daran, dass die PLS Erkrankung relativ selten ist.

4.1.6. Schlussfolgerung der statistischen Auswertung

In unserer Studie zur Primären Lateralsklerose haben wir uns mit 3 großen Themengebieten beschäftigt.
Der Differenzierung zwischen ALS und PLS, Besonderheiten der PLS und den Pringle Kriterien.
Hinsichtlich der Abgrenzung der PLS gegen die ALS kamen wir zu folgenden Ergebnissen: ALS Patienten scheinen eher zu autonomen Dysregulationen zu neigen als PLS Patienten.

Auch Diabetes mellitus Typ 2 könnte ein Bestandteil der Pathologie der ALS sein, der bei der PLS nicht in dem Maße ausschlaggebend zu sein scheint.

Des Weiteren zeigte sich, dass PLS Patienten eher unter Depressionen leiden als ALS Patienten. Wenn sich dies bestätigen sollte, müsste die Überlegung angestellt werden, durch welche Faktoren die vermehrten Depressionen bei PLS Patienten bedingt sein könnten.

Diese Theorien müssen in weiteren Studien untersucht werden, da die Datenlage zur PLS

im Zusammenhang mit arterieller Hypertonie, Diabetes mellitus Typ 2 und Depression sehr spärlich ist und sich daher die Frage stellt, ob es sich allein um ein statistisches Phänomen handelt.

Durch Literaturrecherche konnten wir einige Erkenntnisse unserer Untersuchung untermauern.
Dazu gehören die Hypothesen, dass sowohl Spastik, als auch gesteigerte Reflexe, imperativer Harndrang und eine gestörte Okulomotorik eher bei PLS als bei ALS Patienten auftreten. Besonders deutlich konnte dies für die Spastik gezeigt werden.

Bezüglich der Untersuchung interessanter Aspekte des PLS Kollektivs fiel uns folgendes auf:
Bei den Patientinnen des PLS Kollektivs zeigte sich ein gehäuftes Vorkommen von SD Erkrankungen. Auch wenn in bisherigen Studien kein eindeutiger Zusammenhang zwischen SD- und MN-Erkrankungen zu finden war, könnte es sein, dass eine Interaktion zwischen diesen beiden Erkrankungen besteht. Um diesen Aspekt abschließend zu klären, müssten weitere Studien realisiert werden.
Ein weiterer Aspekt war das Rauchen als Risikofaktor für MN Erkrankungen bei Frauen. Dies konnte in unserer Studie aus Mangel an Vergleichszahlen nicht widerlegt, aber auch nicht bestätigt werden.

In diesem Zusammenhang beschäftigten wir uns mit kumulativen Risikofaktoren für das Auftreten einer PLS Erkrankung. Nachdem bei Frauen sowohl das Rauchen als auch SD Erkrankungen im Zusammenhang mit einer PLS Erkrankung diskutiert werden, untersuchten wir unser Kollektiv auf ein Zusammenspiel dieser Faktoren.
Letztendlich konnten wir keine Beziehung feststellen. Dies macht einen möglichen kumulativen Faktor eher unwahrscheinlich, schließt ihn aber nicht aus. Über diese oder andere Möglichkeiten kumulativer Faktoren könnte weiter nachgedacht werden, da eine PLS Erkrankung multifaktoriell bedingt sein könnte, im Sinne einer vorbestehenden genetischen Disposition im Zusammenspiel mit Umweltfaktoren.

Bei unserer Erhebung fiel uns ein Symptom auf, welches bisher bei den Untersuchungen der PLS vernachlässigt wurde: Der Rigor. Dieser tritt deutlich häufiger auf, als bisher angenommen und akzeptiert wurde.
Wir plädieren aus diesem Grund dafür, den Rigor als möglichen Bestandteil der PLS Symptomatik zu etablieren und PLS Patienten auf eben diesen zu untersuchen.
Ein weiterer interessanter Aspekt wäre der Vergleich des Vorkommens eines Rigors zwischen ALS und PLS Patienten.

Ferner beleuchteten wir die L-Dopa Therapie bei PLS Patienten. Trotz Dissertationen und Publikationen zu diesem Thema, hat sich diese Option der Behandlung noch nicht durchgesetzt. Wir engagieren uns deshalb dafür, PLS Patienten diese Therapieoption zugänglich zu machen. Die Hälfte unseres PLS Kollektivs profitierte von dem Behandlungsversuch.

Zu guter Letzt beschäftigen wir uns mit der Modifizierung der Pringle Kriterien. Dabei kamen wir zu dem Ergebnis, dass neben dem Ausschluss von Differentialdiagnosen durch Liquorpunktion, Serologie und MRT der HWS allein das Ausmaß und die Stabilität der Affektion des 2. MN klinisch und in der Elektrophysiologie für die Diagnose PLS und zur Abgrenzung gegen die ALS zunächst ausreichen sollte.

Nach der Erörterung dieser 3 großen Themengebiete ist unser Fazit, dass solange kein Biomarker für die PLS Diagnostik identifiziert wird, die Diagnose PLS nicht mit absoluter Sicherheit gestellt werden kann. Bis zu diesem Zeitpunkt wird es immer PLS und ALS Fälle geben, die Diskussionen hervorrufen. Dies beruht vor allem auf der Tatsache, dass es bei der PLS in einigen Fällen früher oder später zu einer mehr oder weniger stark ausgeprägten Beteiligung des 2. MN kommt.
Die Differenzierung zwischen ALS und PLS kann daher nur in darauf spezialisierten Zentren aufgrund der Zusammenschau aller klinischen und elektrophysiologischen Befunde erfolgen.
Einige Symptome die eher bei einer PLS bzw. einer ALS auftreten, können das Ergebnis

dieser Diskussion untermauern, sie aber nicht ersetzen.
Zu den Symptomen, die eher bei PLS Patienten auftreten, gehören die Spastik, imperativer Harndrang, gestörte Okulomotorik und gesteigerte Reflexe.

Eine weitere Erkenntnis ist, dass Motoneuronerkrankungen im Allgemeinen und die PLS Erkrankung im Besonderen, nicht auf das 1. und 2. Motoneurone beschränkt bleiben. Dafür sprechen allein schon die vielfältigen Symptome wie gestörte Okulomotorik und Rigor, sowie das Ansprechen auf L-Dopa. Falls sich eine autonome Dysregulation, ein vermehrtes Auftreten von Diabetes mellitus und SD Erkrankungen bei ALS Patienten und/ oder PLS Patienten bewahrheiten sollte, spricht dies dafür, dass sich MN Erkrankungen sogar über neurologischen Systeme hinwegsetzten.
Dadurch ließen sich dann auch die verschiedenen Ausprägungen, die schleichenden Übergänge zwischen den Subtypen und die deutlich unterschiedlichen Prognosen erklären.

4.2. Diskussion der Liquorproteomanalyse

4.2.1. Kurze Darstellung der Liquorproteomanalyse

Wir führten mit Hilfe des Liquor von 9 PLS Patienten und 9 alters- und geschlechtsgematchten Kontrollen eine 2D-DIGE Elektrophorese durch. Die Proteine der Patienten- und Kontrollproben wurden dabei nach Ladung und molekularem Gewicht aufgetrennt und sammelten sich in sogenannten Spots (Proteinanhäufungen). Anschließend wurden diese Spots durch eine spezielle Computersoftware hinsichtlich ihres Volumenunterschieds differenziert. Proteinspots, die im Verhältnis zu Kontrollspots um das 1,2 fache herauf- oder herunterreguliert waren, wurden aus dem Gel gepickt und nach der Trypsinverdauung mittels Massenspektrometrie identifiziert.
Das Ziel dieses experimentellen Versuchs war die Entdeckung und Entwicklung eines Biomarkers für die PLS Erkrankung. So sollte es möglich werden die Diagnose PLS eindeutig zu stellen, Hinweise auf den Pathomechanismus der PLS zu finden beziehungsweise ein therapeutisches Angriffsziel zu identifizieren.

4.2.2. Diskussion der entdeckten Proteine

4.2.2.1. Apolipoprotein CII

Bei der Auswertung der 2D-DIGE Gelelektrophorese fiel vor allem das Protein Apolipoprotein CII (Apo-CII) auf. Es zeigte mit dem Faktor -2,56 den deutlichsten Volumenunterschied der Proteinspots zwischen PLS Patienten und Kontrollen. Apolipoproteine sind Bestandteil der Lipoproteine [AR. Koudinov et al. 2001]. Zusammen mit den Phospholipiden bilden Apolipoproteine die hydrophile Oberfläche der Lipoproteine [AR. Koudinov et al. 2001]. Diese hydrophile Oberfläche dient sowohl als strukturelles Gerüst, als auch als Erkennungs- und Andockmoleküle, zum Beispiel für Membranrezeptoren [AR. Koudinov et al. 2001]. Apolipoproteine können in 5 Hauptklassen unterteilt werden: Apolipoprotein A bis E [AR. Koudinov et al. 2001]. Lipoproteine transportieren Cholesterol, welches für den Auf- und Umbau von Myelinscheiden, neuronalen und glialen Plasmamembranen, synaptisches Remodeling und die Generation von synaptischen Vesikeln benötigt wird [AR. Koudinov et al. 2001]. Damit kommt den Lipoproteinen eine wichtige Funktion bei der Reifung und Aufrechterhaltung der Plastizität von Synapsen zu [AR. Koudinov et al. 2001].
Jede Gruppe der Lipoproteine trägt ihr spezielles Apolipoproteine [Y. Shen et al. 2000]. Apolipoprotein CII ist so zum Beispiel Bestandteil von Chylomikronen und very low densitiy lipoprotein (VLDL) [Y. Shen et al. 2000]. Das Apolipoprotein CII ist dabei ein Aktivator der Lipoproteinlipase (LPL) [Y. Shen et al. 2000]. Die Lipoproteinlipase ist verantwortlich für die Hydrolyse von Triglyceriden der Chylomikronen und VLDL [MM. Hoffmann et al 1996].
Wie die folgenden Beispiele offenbaren, konnte in der Forschung der letzten Jahre immer wieder gezeigt werden, dass Apolipoproteine eine Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen spielen:
So wurde beispielsweise eine erhöhte Apo B und Apo CII Konzentrationen bereits bei der diabetischen Neuropathie entdeckt [T. Ikeda et al. 1993]. Auch ist bekannt, dass Cholesterol in reziproker Manier mit Amyloid beta-Protein interagiert und dies zu Tauopathien führen kann [M. Michikawa, 2003]. Ergänzend zu diesen Erkenntnissen konnte außerdem gezeigt werden, dass die Cholesterol-Ester Konzentration im Liquor

während aktiver Demyelinisierung ansteigt [PS. Roheim et al 1979]. Es wurde sogar die Hypothese aufgestellt, dass an Peptide gebundene Lipide die Amyloid-Fibrillenbildung verhindern könnten, indem Peptid Di- und Oligomere in nicht fibrillen-bildende Formen umgewandelt werden würden [A. Hung et al 2009]. Die Amyloid-Fibrillenbildung ist wiederum ein Bestandteil der Alzheimer Pathogenese.
Diese Forschungsergebnisse machen deutlich, wie wichtig Apolipoproteine und der damit verbundene Lipidstoffwechsel im ZNS sind.

Ob und wie eine Verringerung von Apo CII bei PLS Patienten eine Auswirkung auf die Pathogenese hat, lässt sich bisher nicht sagen.
Durch das Fehlen von Apo CII könnte die Aktivierung von LPL beeinträchtigt sein und daher könnte nicht genug Cholesterol und Triglyceride für den oben beschriebenen Auf- und Umbau von Myelinscheiden, die neuronalen und glialen Plasmamembranen, das synaptisches Remodeling und die Generation von synaptischen Vesikeln vorhanden sein. Dies könnte dann auch als Folge zu einer Degeneration von Motoneuronen führen.

4.2.2.2. Transferrin

Transferrin war bei den PLS Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen nur um das 1,27 fache herunterreguliert, jedoch waren bereits 2008 Brettschneider et al. in einer Liquorproteomanalyse bei dem Vergleich von ALS Patienten mit gesunden Kontrollen ein ebenfalls herunterreguliertes Transferrin der ALS Patienten aufgefallen [J. Brettschneider et al. 2008]. Zu dem gleichen Ergebnis kamen auch Mitchell et al. [RM. Mitchell et al. 2010]. In ihrer Studie hatten die ALS Patienten einen signifikant höheren Plasmaspiegel L-Ferritin und eine deutlich geringere Konzentration an Transferrin [RM. Mitchell et al. 2010]. Mitchell und seine Kollegen überlegten daher, dass die Eisen-Homöostase bei ALS Patienten gestört sein könnte und Veränderungen des Eisen und des Transferrins auf bestehende entzündliche Prozesse hinweisen könnten [RM. Mitchell et al. 2010].
Aufgrund dieser Erkenntnisse von Brettschneider und Mitchell, wollen wir hier näher auf die mögliche Funktion von Transferrin bei der PLS eingehen.
Transferrin ist ein eisenbindendes Protein [Y. Mizuno et al.2006]. Es spielt eine wichtige

Rolle beim Transport von Eisen zum Zielgewebe [Y. Mizuno et al.2006]. Transferrin erhält auf 2 Wegen Zugang zu den Motoneuronen. Transferrin aus hepatischer Synthese gelangt über unspezifischen retrograden axonalen Transport zum Soma der Motoneuronen, Transferrin aus intrazerebraler Synthese Rezeptor assoziiert [T. Moos, 1995].
Bei autoptischen Untersuchungen von ALS Patienten konnten Bunina Körperchen und strangförmige Einschlüsse gefunden werden [Y. Mizuno et al.2006][H. Braak et al. 2010]. Neben dem hauptsächlichen Bestandteil der Einschlüsse (aggregiertes, phosphoryliertes und ubiquitinyliertes TDP-43) war es möglich, in diesen Körperchen und Einschlüssen Transferrin zu markieren [Y. Mizuno et al.2006][H. Braak et al. 2010]. Daher wird angenommen, dass Transferrin an der Bildung dieser Einschlüsse beteiligt sein könnte, auch wenn der Mechanismus der Akkumulation des Transferrins nicht bekannt ist [Y. Mizuno et al.2006]. Des Weiteren wurden Eiseneinschlüsse in den Vorderhörnern von SOD1G37R transgenen ALS Mäusen im Alter von 12 Monaten gefunden [SY. Jeong et al. 2009]. Wild Typ Mäuse im selben Alter zeigten diese Eiseneinschlüsse nicht [SY. Jeong et al. 2009]. Jeong et al. sprachen deshalb von einer Eisen vermittelten Zytotoxizität [SY. Jeong et al. 2009].
Kupershmidt et al. bewiesen anhand von MN Zellkulturen, dass Eisenradikale in MN eindringen und diese zerstören können [L. Kupershmidt et al. 2009]. Durch weitere Versuche mit MN Zellkulturen konnte dokumentiert werden, dass mit einem Eisen-Chelator inkubierte MN Zellkulturen ein signifikant erhöhtes Überleben gegenüber unbehandelten MN Kulturen hatten, wenn beide Kulturen mit H_2O_2 attackiert wurden [L. Kupershmidt et al. 2009].
Aufgrund dieser Untersuchungen führten Kupershmidt et al. eine Therapiestudie mit EG93A-SOD1 transgenen ALS Mäusen durch [L. Kupershmidt et al. 2009]. Dabei bekamen die Mäuse oral Eisen-Chelatoren verabreicht [L. Kupershmidt et al. 2009].
Die so behandelten Mäuse wiesen ein späteres Auftreten der funktionellen motorischen Beeinträchtigungen auf, das Körpergewicht der behandelten Mäuse war höher, motorische Defizite waren weniger stark ausgeprägt und das Überleben war deutlich verlängert im Vergleich zu nicht behandelten EG93A-SOD1 transgenen ALS Mäusen [L. Kupershmidt et al. 2009].

Letztendlich wurde dieser Effekt des Eisen-Chelators aber nicht nur dem Abfangen des Eisens zugeschrieben, sondern auch der Aktivierung der Proteinkinase C und des MAP-Kinase Wegs [L. Kupershmidt et al. 2009]. Beide Wege dienen der Signaltransduktion und regeln so Wachstum und Stoffwechsel der Zellen [L. Kupershmidt et al. 2009].

Zusammengefasst zeigt dies, dass der Eisenstoffwechsel, an dem Transferrin beteiligt ist, bei der ALS eine Rolle zu spielen scheint.
Allerdings schrieben Brettschneider et al. bereits 2008, dass Transferrin nicht als Biomarker für die ALS geeignet sei, da es bereits zuvor bei den verschiedensten neurologischen Erkrankungen gefunden worden war und daher nicht spezifisch sei [J. Brettschneider et al. 2008]. Dieses Argument würde dann ebenso für die PLS gelten. Eventuell wäre es jedoch möglich, eine Differenzierung zwischen einer stark progressiven ALS und einer langsam fortschreitenden ALS anhand der Transferrin-Konzentration zu realisieren. Dies beschrieben Brettschneider et al. in einer weiteren Liquorproteomanalyse 2010 [J. Brettschneider et al. 2010]. Sie hatten heraufreguliertes Transferrin bei sehr stark progressiver ALS im Vergleich zu langsam fortschreitender PLS gefunden [J. Brettschneider et al. 2010].
Leider gibt es keinerlei vergleichende Studien zu Eisen bzw. Transferrin Konzentrationen bei PLS Patienten im Liquor. Wir können also nur davon ausgehen, dass sich der pathologische Mechanismus ähnlich wie bei der ALS verhält. Ob und wo die Unterschiede liegen, muss aber erst noch in vergleichenden Studien zwischen ALS und PLS Patienten festgestellt werden.

4.2.2.3. Transthyretin (TTR)

Transthyretin ist verantwortliche für den Transport von Schilddrüsenhormonen in Blut und Liquor [SD. Santos et al. 2010]. Transthyretin ist des Weiteren ein akutes Phase Protein [H. Ryberg et al. 2010]. Eine Mutation im TTR Gen kann zu einer hereditären Transthyretin Amyloidose führen [G. Riboldi et al. 2011]. Laut einer Studie von Ryberg et al., bei welcher ebenfalls eine Liquorproteomanalyse durchgeführt worden war, wurde festgestellt, dass Transthyretin den besten diagnostischen prädiktiven Wert für die ALS hatte [H. Ryberg et

al. 2010]. Ryberg et al. unterschieden weiter in ihrer Studie zwischen herunterreguliertem nativen Transthyretin und heraufreguliertem CysGly-Transthyretin [H. Ryberg et al. 2010]. CysGly-Transthyretin ist eine modifizierte Form, die durch oxidativen Stress entsteht [H. Ryberg et al. 2010] [MH. Vincente et al. 2010]. Diese durch oxidativen Stress verursachte Modifikationen des Transthyretin kam bei ALS Patienten vermehrt vor, allerdings traf dies auch auf andere neurodegenerative Erkrankungen zu [H. Ryberg et al. 2010][MH. Vincente et al. 2010]. Die Autoren gehen davon aus, dass diese oxidierte Form des Transthyretins seine Funktion unter den metabolischen Konditionen bei der ALS stabilisiert [H. Ryberg et al. 2010][MH. Vincente et al. 2010]. Jedoch vertreten Vincente et al. andererseits die Meinung, dass die modifizierte Form des Transthyretins beim Abbau beeinflusst wird und dies wiederum zu Fehlfaltungen und Anhäufungen führen könnte [MH. Vincente et al. 2010]. Weiter nehmen sie an, dass diese Glykosylierung dafür verantwortliche sein könnte, dass über den AGE Rezeptor (RAGE) die Bildung von reaktiven Radikalen und die Induktion von NF kappa B angeregt wird und dadurch die Inflammation und der oxidative Stress ausgelöst wird [MH. Vincente et al. 2010]. Vincente et al. sind der Ansicht, dass diese Glycosylierung von Proteinen ein Ziel für therapeutische Interventionen sein könnte [MH. Vincente et al. 2010].

Darüber hinaus beschrieben Brettschneider et al., dass Transthyretin bei sehr stark progressiver ALS im Vergleich zu langsam fortschreitender ALS heraufreguliert sei [J. Brettschneider et al. 2010]. Dies ergäbe die Möglichkeit, eine Differenzierung zwischen einer stark progressiven ALS und einer langsam fortschreitenden ALS anhand der Transthyretin-Konzentration zu realisieren. Brettschneider et al. postulierten daher, dass TTR ein vielversprechender Kandidat für einen Marker der Krankheitsprogression für die ALS sein könnte [J. Brettschneider et al. 2010]. Hier wäre interessant zu wissen, ob ebenfalls Unterschiede zwischen einer langsamen fortschreitenden ALS und einer PLS zu finden sind.

Es sieht so aus, als hätte Transthyretin einen gewissen Anteil am Pathomechanismus der ALS. Dies könnte folglich ebenso für die PLS gelten.

Die Sauerstoffversorgung der MN scheint ein Bestandteil bei der Entwicklung von MN Erkrankungen zu sein. Aus ungeklärten Gründen sieht es so aus, als wäre sie bei MN

Patienten nicht suffizient gewährleistet. Es hat den Anschein, als könnte sich Transthyretin an diese besondere metabolische Situation anpassen, indem es eine modifizierte Form bildet, welche leistungsfähiger zu sein scheint. Allerdings entsteht daraus laut Vincente der Nachteil, dass der Abbau des Transthyretins nicht mehr reibungslos ablaufen kann und es zu Fehlfaltungen kommt.

Letztendlich stellen sich 2 Fragen:

1. Ob bei stark progressiver ALS das Transthyretin im Vergleich zu langsam progredienter ALS erhöht ist, weil die metabolische Situation nach der modifizierten Form des Transthyretin verlangt.

Und 2. ob eher unabhängig von der metabolischen Situation vermehrt Transthyretin gebildet wird, welches dann wiederum im Abbau blockiert ist und so die MN schädigt.

Dies muss in weiteren Studien geklärt werden.

4.2.3. Diskussion der Methode

4.2.3.1. Die 2D-DIGE

Die 2D-DIGE ist eine sehr gute Methode, um Sekrete nach Proteinen zu scannen und sie zu identifizieren.

Die Vorteile dieser Methode sind, dass die Volumenunterschiede der Proteine in den zu vergleichenden Proben in nur einem Analysedurchgang verglichen werden können. Dies fördert die Genauigkeit dieser Methode. Durch den internen Standard und das Anfärben der Proben mit jeweils alternierenden Farbstoffen wird eine Auswirkung des Färbens auf das Proteinvolumen ausgeschlossen.

Zu berücksichtigen ist jedoch, dass die Proteinzusammensetzungen des Liquors sowohl bei gesunden als auch betroffenen Probanden schwanken können [W. Hueber et al. 2006]. Dies wird durch die Modellkurve der Standardabweichung und die Signifikanz der herauf- bzw. herunterregulierten Proteine ausgeglichen. Dennoch sollte dies stets beachtet werden.

4.2.3.2. Die Patientenauswahl

Das Patientenkollektiv und Kontrollkollektiv bestand aus jeweils 9 Patienten. Die PLS ist eine seltene Erkrankung. Die Anzahl der asservierten Liquorproben ist daher relativ gering. Da es jedoch die erste Untersuchung dieser Art ist, kann sie richtungsweisend sein. Für weitere Liquoranalysen wäre es wünschenswert, eine größere Probenzahl zu asservieren. Bei den Kontrollpatienten waren aufgrund von Erkrankungen wie Migräne, Spannungskopfschmerzen und zum Ausschluss einer SAB Liquorpunktionen durchgeführt worden. Es ist anzunehmen, dass diese Erkrankungen nicht zu Proteinveränderungen im Liquor führen. Wissenschaftlich gesichert ist dies allerdings nicht. Ideal wären gesunde Kontrollen, was ethisch allerdings problematisch sein könnte.

4.2.4. Schlussfolgerung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl Apo CII, Transferrin und Transthyretin eine gewisse Rolle im Pathomechanismus der PLS zu spielen scheinen. Aus diesem Grund stellt sich die Frage, ob ein übergeordneter Faktor Einfluss auf diese Parameter nimmt, oder ob sogar eines dieser Proteine ein auslösender Faktor ist.
Weitere Studien zu diesen Proteinen werden sich daher sicherlich lohnen.
Vor allem Transthyretin erscheint uns ein sehr interessantes Protein zu sein, da es einen Zusammenhang zwischen den gehäuft vorkommenden SD Erkrankungen bei Frauen und MN Erkrankungen darstellen könnte. Eventuell wäre es sinnvoll, eine 2D-DIGE nur mit Frauen durchzuführen bzw. den Liquor von Frauen auf andere Weisen nach Transthyretin zu untersuchen. Apo CII erscheint hingegen vor allem deshalb interessant, da in unserer Untersuchung ein ausgeprägter Regulationsunterschied zwischen Kontrollen und PLS Patienten zu finden war.
Nachdem aber der Zusammenhang zwischen den Proteinen und deren Rolle im Pathomechanismus noch nicht geklärt werden konnte, sind weitere Untersuchungen vonnöten. Einen Biomarker konnten wir deshalb unter diesen 3 vielversprechenden Proteinen bisher nicht eindeutig identifizieren.

5. Zusammenfassung

Bei der Primären Lateralsklerose (PLS) handelt es sich um eine Motoneuron Erkrankung, die fast ausschließlich das 1. Motoneuron betrifft.
In unserer retrospektiven Studie erstellten wir eine Datenbank mit 76 PLS Patienten aus 4 auf Motoneuronerkrankungen spezialisierten Zentren in ganz Deutschland. Einen Teil der erhobenen Daten der PLS Patienten konnten wir mit Ergebnissen des Amyothrophen Lateralsklerose (ALS)-Registers Schwaben vergleichen.
Die Schwerpunkte der Studie waren die Differenzierung der PLS von der ALS, besondere Aspekte der PLS und die Diskussion der Pringle Kriterien. Des Weiteren führten wir mit Hilfe von 9 PLS Liquorproben eine Liquorproteomanalyse durch.

Hinsichtlich der Differenzierung zwischen ALS und PLS konnte gezeigt werden, dass eine Spastik bei PLS Patienten deutlich häufiger auftritt als bei ALS Patienten. Ebenso, wenn auch nicht so stark ausgeprägt, verhielt es sich mit gesteigerten oder kloniformen Reflexen bei ALS und PLS Patienten. Fehlende oder abgeschwächte Reflexe waren unter PLS Patienten im Gegensatz zu ALS Patienten überhaupt nicht zu finden.
Weiter litten PLS Patienten im Vergleich zu ALS Patienten merklich häufiger unter Depressionen, imperativem Harndrang und gestörter Okulomotorik. Hingegen kamen arterielle Hypertonie und/oder Diabetes mellitus Typ 2 bei ALS Patienten offenkundig häufiger vor.

Bezüglich besonderer Aspekte der PLS konnte gezeigt werden, dass der Rigor durchaus ein Bestandteil einer PLS Erkrankung sein kann. Des Weiteren erwies sich, dass die L-Dopa Therapie eine sinnvolle symptomatische Therapie für PLS Patienten darstellen kann.

Aus Mangel an vergleichbaren Kontrollgruppen konnte nicht abschließend geklärt werden, ob das Rauchen als Risikofaktor für Motoneuronerkrankungen bei Frauen gezählt werden kann und ob Schilddrüsenerkrankungen oder eine Kumulation von Rauchen und SD Funktionsstörungen bei Frauen in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen.

Bei der genauen Betrachtung der Pringle Kriterien kamen wir zu dem Ergebnis, dass eine Modifizierung derselben anhand neuer Forschungsergebnisse sinnvoll erscheint. In diesem Rahmen schlagen wir vor, die Kriterien in 3 Gruppen zu unterteilen. Ein zentrales Hauptkriterium, Ausschluss- und Nebenkriterien. Dabei müssen das Hauptkriterium und die Ausschlusskriterien für die Diagnose PLS erfüllt sein. Die Nebenkriterien wiederum sind nur als zusätzliche Faktoren anzusehen.

Im Rahmen der Liquorproteomanalyse stießen wir auf 3 interessante Proteine: Apo CII, Transferrin und Transthyretin. Diesen Proteinen scheint eine gewisse Rolle im Pathomechanismus der PLS zu zukommen. Vor allem Apo CII zeigte einen ausgeprägten Regulationsunterschied im Vergleich zu gesunden Kontrollen.
Ob diese Proteine durch einen anderen Faktor beeinflusst werden oder selbst beeinflussende Faktoren sind, konnte nicht geklärt werden. Aus diesem Grund sind weitere Forschungen vonnöten, um die Funktionalität dieser Proteine als mögliche zukünftige Biomarker zu klären.

Sowohl im statistischen als auch im experimentellen Teil dieser Arbeit zeichnete sich klar ab, dass MN Erkrankungen nicht auf Motoneurone beschränkt bleiben müssen, sondern auch andere Systeme betroffen sein können. Bei diesen Systemen muss es sich noch nicht einmal um neurologische Einheiten handeln. Dies wird durch die vielseitigen Symptome der PLS Patienten deutlich.

6. Literaturverzeichnis in alphabetischer Reihenfolge

1. Alonso A, Logroscino G, Hernán MA: Smoking and the risk of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 81: 1249-1252 (2010).

2. Angelucci L, Lorentz G, Maccari S, Patacchiolo FR, Scaccianoce S, Taglialatela G: Pharmacologic profile of protirelin tartrate. Ann Ital Med Int. 5: 232-244 (1990).

3. Armon C: Smoking may be considered an established risk factor for sporadic ALS. Neurology. 73: 1693-1698 (2009).

4. Armon C: An evidence-based medicine approach to the evaluation of the role of exogenous risk factors in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Neuroepidemiology. 22: 217-228 (2003).

5. Averbuch-Heller L, Helmchen C, Horn AK, Leigh RJ, Büttner-Ennerver JA: Slow vertical saccades in motor neuron disease: correlation of structure and function. Ann Neurol. 44: 641-648 (1998).

6. Bach F, Larsen BH, Rohde K, Borgesen SE, Gjerris F, Boge-Rasmussen T, Agerlin N, Rasmusson B, Stjernholm P, Sorensen PS: Metastatic spinal cord compression. Occurrence, symptoms, clinical presentations and prognosis in 398 patients with spinal cord compression. Acta Neurochir. (Wien) 107: 37-43 (1990).

7. Baezner H, Daffertshofer M: Subcortical vascular encephalopathy. Ther Umsch. 60: 541-552 (2003).

8. Barbeau A: Dopamine and disease. Can Med Assoc J. 103: 824-832 (1970).

9. Beal MF, Richardson EP Jr: Primary lateral sclerosis: a case report. Arch Neurol. 38: 630

-633 (1981).

10. Braak H, Ludolph A, Thal DR, Del Tredici K: Amyotrophic lateral sclerosis: dash-like accumulation of phosphorylated TDP-43 in somatodendritic and axonal compartments of somatomotor neurons of the lower brainstem and spinal cord. Acta Neuropathol. 120: 67-74 (2010).

11. Brettschneider J, Lehmensiek V, Mogel H, Pfeifle M, Dorst J, Hendrich C, Ludolph AC, Tumani H: Proteome analysis reveals candidate markers of disease progression in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Neurosci Lett. 468: 23-27 (2010).

12. Brettschneider J, Mogel H, Lehmensiek V, Ahlert T, Süssmuth S, Ludolph AC, Tumani H: Proteome analysis of cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Neurochem Res. 33: 2358-2363 (2008).

13. Brownwell B, Oppenheimer DR, Hughes JT: The central nervous system in motor neurone disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 33: 338 -357 (1970).

14. Brugman F, Wokke JH, Vianney de Jong JM, Franssen H, Faber CG, Van den Berg LH:Primary lateral sclerosis as a phenotypic manifestation of familial ALS. Neurology. 64: 1778-1779 (2005).

15. Brugman F, Scheffer H, Wokke JH, Nillesen WM, de Visser M, Aronica E, Veldink JH, van den Berg LH: Paraplegin mutations in sporadic adult-onset upper motor neuron syndromes. Neurology. 71: 1500-1505 (2008).

16. Bruyn RP, Koelman JH, Troost D, de Jong JM: Motor neuron disease (amyotrophic lateral sclerosis) arising from longstanding primary lateral sclerosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 58: 742-744 (1995).

17. Buerger K, Otto M, Teipel SJ, Zinkowski R, Blennow k, DeBernardis J, Kerkman D, Schröder J, Schönknecht P, Cepek L, McCulloch C, Möller HJ: Dissociation between CSF total tau and tau protein phosphorylated at threonine 231 in Creutzfeldt–Jakob disease. Neurobiol Aging. 27: 10-15 (2006).

18. Burkard TR, Planyavsky M, Kaupe I, Breitwieser FP, Bürckstümmer T, Bennett KL, Superti-Furga G, Colinge J: Initial characterization of the human central proteome. BMC Syst Biol. 5: 17 (2011).

19. Cabrerizo-García JL, Sebastián-Royo M, Montes N, Zalba-Etayo B: Subacute combined spinal cord degeneration and pancytopenia secondary to severe vitamin B12 deficiency. Sao Paulo Med J. 130: 259-262 (2012).

20. Coon EA, Whitwell JL, Parisi JE, Dickson DW, Josephs KA: Right temporal variant frontotemporal dementia with motor neuron disease. J Clin Neurosci. 19: 85-91 (2012).

21. Copeman MC: Presenting symptoms of neoplastic spinal cord compression. J Surg Oncol. 37: 24-25 (1988).

22. Davenport RJ, Swingler RJ, Chancellor AM, Warlow CP: Avoiding false positive diagnoses of motor neuron disease: lessons from the Scottish Motor Neuron Disease Register. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 60: 147-151 (1996).

23. Davson H, Oldendorf WH: Symposium on membrane transport. Transport in the central nervous system. Proc R Soc Med. 60: 326-329 (1967).

24. Doyle P, Brown A, Beral V, Reeves G, Green J: Incidence of and risk factors for Motor Neurone Disease in UK women: a prospective study. BMC Neurol. 12: 377-471 (2012).

25. Draper EM, Malloy KA: Progressive Visual and Hearing Loss Secondary to Neurosyphilis.

Optom Vis Sci. 28: [Epub ahead of print] (2012).

26. Dupré N, Valdmanis PN, Bouchard J-P, Rouleau GA: Autosomal dominant primary lateral sclerosis. Neurology. 68: 1156-1157 (2007).

27. Fink JK: The hereditary spastic paraplegia: nine genes and counting. Arch Neurol. 60: 1156-1157 (2007).

28. Fredrikson S, Link H: CNS-borreliosis selectively affecting central motor neurons. Acta Neurol Scand. 78: 181-184 (1988).

29. Frick E, Scheid-Seydel L: Untersuchungen mit J131-markiertem γ-Globulin zur Frage der Abstammung der Liquoreiweißkörper. J Mol Med. 18: 857-863 (1958).

30. Gastaut JL, Michel B, Figarella- Branger D, Somma- Mauvais H: Chronic progressive spinobulbar spasticity. A rare form of primary lateral sclerosis. Arch Neurol. 45: 509-513 (1988).

31. Gitcho MA, Baloh RH, Chakraverty S, Mayo K, Norton JB, Levitch D, Hatanpaa KJ, White CL 3rd, Bigio EH, Caselli R, Baker M, Al-Lozi MT, Morris JC, Pestronk A, Rademakers R, Goate AM, Cairns NJ: TDP-43 A315T mutation in familial motor neuron disease. Ann Neurol. 63: 535-538 (2008).

32. Gore S, Carr L, Moore A, Thompson D: Hereditary primary lateral sclerosis with cone dysfunction. Ophthalmic Genet. 31: 221-226 (2010).

33. Göldner AJM: Therapeutische Wirksamkeit von L-Dopa bei Amyotropher Lateralsklerose Eine Analyse von 50 therapeutischen Heilversuchen. Med. Dissertation, Universität Ulm (2008).

34. Groth J: Das Proteom. In: Jürgen Groth: Meine Moleküle Deine Moleküle, von der molekularen Individualität. Überarbeitung, Bd1, 1. Aufl, Rhombos Verlag Berlin, (2012).

35. Grunnet ML, Leicher C, Zimmerman A, Zalneraitis E, Barwick M: Primary lateral sclerosis in a child. Neurology. 39: 1530-1532 (1989).

36. Guiloff RJ, Eckland DJ, Demaine C, Hoare RC, MacRae KD, Lightman SL: Controlled acute trial of a thyrotrophin releasing hormone analogue (RX77368) in motor neuron disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 50: 1359-1370 (1987).

37. Gunnarsson LG, Bodin L, Söderfeldt B, Axelson O: A case-control study of motorneuron disease: Its relation to heritability, and occupational exposures, particularly to solvents. Br J Ind Med. 49: 791-798 (1992).

38. Hanemann CO, Ludolph AC: Hereditary motor neuropathies and motor neuron diseases: which is which. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord. 3: 186-189 (2002).

39. Helweg-Larsen S, Sorensen PS: Symptoms and signs in metastatic spinal cord compression: a study of progression from first symptom until diagnosis in 153 patients. Eur J Cancer. 30A: 396-398 (1994).

40. Henson BJ, Zhu W, Hardaway K, Wetzel JL, Stefan M, Albers KM, Nicholls RD:Transcriptional and Post-Transcriptional Regulation of SPAST, the Gene Most Frequently Mutated in Hereditary Spastic Paraplegia. PloS One. 7: [Epub] (2012).

41. Herold G und Mitarbeiter: Innere Medizin. Gerd Herold, Köln, S. 276 (2008).

42. Herold G und Mitarbeiter: Innere Medizin. Gerd Herold, Köln, S. 658 (2008).

43. Hoffmann MM, Stoffel W: Construction and functional characterization of recombinant fusion proteins of human lipoprotein lipase and apolipoprotein CII. Eur J Biochem. 237: 545-552 (1996).

44. Hueber W, Robinson WH: Proteomic biomarkers for autoimmune disease. Proteomics. 6: 4100-4105 (2006).

45. Hugon J, Ludolph AC, Spencer PS, Gimenez Roldan S, Dumas JL: Studies of the etiology and pathogenesis of motor neuron diseases. III. Magnetic cortical stimulation in patients with lathyrism. Acta Neurol Scand. 88: 412-416 (1993).

46. Hung A, Griffin MD, Howlett GJ, Yarovsky I: Lipids enhance apolipoprotein C-II-derived amyloidogenic peptide oligomerization but inhibit fibril formation. J Phys Chem B. 113: 9447-9453 (2009).

47. Ikeda T, Sugiuchi H, Senba U, Shibuya Y, Uji Y, Okabe H, Araki S: Preliminary findings on the variation of serum apolipoprotein levels in neural degenerative disorders. J Clin Lab Anal. 7: 1-4 (1993).

48. Itzecka J, Stelmasiak Z: Thyroid function in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Ann Univ Mariae Curie Sklodowska Med. 58: 343-347 (2003).

49. Jacobs L, Bozian D, Heffner RR Jr, Barron SA: An eye movement disorder in amyotrophic lateral sclerosis. Neurology. 31: 1282-1287 (1981).

50. Jawaid A, Salamone AR, Strutt AM, Murthy SB, Wheaton M. McDowell EJ, Simpson E, Appel SH, York MK, Schulz PE: ALS disease onset may occur later in patients with pre-morbid diabetes mellitus. Eur J Neurol. 17: 733-739 (2010).

51. Jeong SY, Rathore KI, Schulz K, Ponka P, Arosio P, David S: Dysregulation of iron

homeostasis in the CNS contributes to disease progression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. J Neurosci. 29: 610- 609 (2009).

52. Jesse S, Brettschneider J, Süssmuth SD, Landwehrmeyer BG, von Arnim CA, Ludolph AC, Tumani H, Otto M: Summary of cerebrospinal fluid routine parameters in neurodegenerative diseases. J Neurol. 258: 1034-1041 (2011).

53. Johnson KS, Sexton DJ, Aminoff MJ, Wilterdink JL: Lumbar puncture: Technique; indications; contraindications; and complications in adults. Uptodate. (2012).

54. Johnson KS, Sexton DJ, Calderwood SB, Thorner AR: Cerebrospinal fluid: Physiology and utility of an examination in disease states. N Engl J Med. 297: 410 (1977).

55. Jurado R, Walker HK: Cerebrospinal Fluid. In: Walker HK, Hall WD, Hurst JW (Hrsg.): Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations. Bd. 1 3.Aufl. Boston: Butterworths (1990).

56. Kassubek J, Ludolph AC, Müller HP: Neuroimaging of motor neuron diseases. Ther Adv Neurol Disord. 5: 119-127 (2012).

57. Konagaya M, Sakai M, Matsuoka Y, Konagaya Y, Hashizume Y: Upper motor neuron predominant degeneration with frontal and temporal lobe atrophy. Acta Neuropathol. 96: 532-536 (1998).

58. Körner S, Dengler R, Petri S: Diagnostik der amyotrophen Lateralsklerose. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 12: 124-128 (2011).

59. Kostic V, Gurney ME, Deng HX, Siddique T, Epstein CJ, Przedborski S: Midbrain dopaminergic neuronal degeneration in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol. 41: 497-504 (1997).

60. Koudinov AR, Koudinova NV: Essential role for cholesterol in synaptic plasticity and neuronal degeneration. FASEB J. 15: 1858-1860 (2001).

61. Kuipers- Upmeijer J, de Jager AE, Hew JM, Snoek JW, van Weerden TW: Primary lateral sclerosis: clinical, neurophysiological, and magnetic resonance findings. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 71: 615-620 (2001).

62. Kulic JV. Milicic J, Letinic D, Rahelic D, Zekanovic D: Dermatoglyphics in patients with hypothyreosis. Coll Anropol. 36: 389-394 (2012).

63. Kumar N: Metabolic and toxic myelopathies. Semin Neurol. 32: 123-136 (2012).

64. Kuner R, Groom AJ, Bresink I, Kornau HC, Stefovska V, Müller G, Hartmann B, Tschauner K, Waibel S, Ludolph AC, Ikonomidou C, Seeburg PH, Turski L: Late-onset motoneuron disease caused by a functionally modified AMPA receptor subunit. Proc Natl Acad Sci U S A 102: 5826-5831 (2005).

65. Kupershmidt L, Weinreb O, Amit T, Mandel S, Carri MT, Youdim MB: Neuroprotective and neuritogenic activities of novel multimodal iron-chelating drugs in motor-neuron-like NSC-34 cells and transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. FASEB J. 23: 3766-3779 (2009).

66. Kushner MJ, Parrish M, Burke A, Behrens M, Hays AP, Frame B, Rowland LP: Nystagmus in motor neuron disease: clinicopathological study of two cases. Ann Neurol. 16: 71-7 (1984).

67. Kuźma-Kozakiewicz M, Usarek E, Ludolph AC, Barańczyk-Kuźma A: Mice with mutation in dynein heavy chain 1 do not share the same tau expression pattern with mice with SOD1-related morot neuron disease. Neurochem Res. 36: 978-985 (2011).

68. Lee HL, Lee JK: Amyotrophic lateral sclerosis with an acute hypertensive crises. Ann Rehabil Med. 36: 418-422 (2012).

69. Le Forestier N, Maisonobe T, Piquard A, Rivaud S, Crevier-Buchman L., Salachas F, Pradat PF, Lacomblez L, Meininger V: Does primary lateral sclerosis exist? A study of 20 patients and a review of the literature. Brain. 124: 1989-1999 (2001).

70. Le Forestier N, Maisonobe T, Spelle L, Lesort A, Salachas F, Lacomblez L, Samson Y, Bouche P, Meininger V: Primary lateral sclerosis: further clarification. J Neurol Sci. 185: 95-100 (2001).

71. Linden D, Diehl RR, Berlit P: Reduced baroreflex sensitivity and cardiorespiratory transfer in amyotrophic lateral sclerosis. Electroencephalogr Clin Neurophysiol. 109: 387-390 (1998).

72. Lira SJ: Therapeutische Wirksamkeit von L-Dopa bei Amyotropher Lateralsklerose Eine Beobachtung von 39 Patienten im Langzeitverlauf. Med. Dissertation, Universität Ulm (2008).

73. Ludolph AC: (2012 persönliche Mitteilung).

74. Lulé D, Häcker S, Ludolph A, Birbaumer N, Kübler A: Depression and quality of life in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Dtsch Arztebl Int. 105: 397-403 (2008).

75. Lulé D, Pauli S, Altintas E, Singer U, Merk T, Uttner I, Birbaumer N, Ludolph AC: Emotional adjustment in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). J Neurol. 259: 334-341 (2012).

76. Mann M, Jensen ON: Proteomic analysis of post-translational modifications. Nat Biotechnol. 21: 255-261 (2003).

77. Mattei PL, Beachkofsky TM, Gilson RT, Wisco OJ: Syphilis: a reemerging infection. Am Fam Physician. 86: 433-440 (2012).

78. McDermott C, White K, Bushby K, Shaw P: Hereditary spastic paraparesis: a review of new developments. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 69: 150-160 (2000).

79. McMenamin J, Croxson M: Motor neurone disease and hyperthyroid Graves' disease: a chance association? Psychiatry. 43: 46-49 (1980).

80. Meininger V: ALS, what new 144 years after Charcot? Arch Ital Biol. 149: 29-37 (2011).

81. Mendell JR, Chase TN, Engel WK: Amyotrophic lateral sclerosis: metabolism of central monoamines and treatment with L-dopa. Trans Am Neurol Assoc. 96: 284-286 (1971).

82. Merkli H, Pál E, Horváthné VI: Clinical characteristics of subcortical arteriosclerotic encephalopathy (Binswanger's disease). Orv Hetil. 142: 1221-1226 (2001).

83. Michikawa M: Cholesterol paradox: is high total or low HDL cholesterol level a risk for Alzheimer´s disease? J Neurosci Res. 72: 141-146 (2003).

84. Mikrozensus: https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/GesundheitszustandRelevantesVerhalten/Tabellen/Rauchverhalten.html (02.10.2012).

85. Mitchell RM, Simmons Z, Beard JL, Stephens HE, Connor JR: Plasma biomarkers associated with ALS and their relationship to iron homeostasis. Muscle Nerve. 42: 95-103 (2010).

86. Mizuno Y, Amari M, Takatama M, Aizawa H, Mihara B, Okamoto K: Transferrin localizes in Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis. Acta Neuropathol. 112: 597-603 (2006).

87. Mochizuki A, Komatsuzaki Y, Iwamoto H, Shoji S: Frontotemporal dementia with ubiquitinated neuronal inclusions presenting with primary lateral sclerosis and parkinsonism: clinicopathological report of an autopsy case. Acta Neuropathol. 107: 377-380 (2004).

88. Moos T: Age-dependent uptake and retrograde axonal transport of exogenous albumin and transferrin in rat motor neurons. Brain Res. 672: 14-23 (1995).

89. Moreau C, Brunaud-Danel V, Dallongeville J, Duhamel A, Laurier- Grymonprez L, de Reuck J, Wiart AC, Perez T, Richard F, Amouyel P, Bordet R, Defebyre L, Destée A, Devos D: Modifying effect of arterial hypertension on amyotrophic lateral sclerosis. Amyotroph Lateral Scler. 13: 194-201 (2012).

90. Norlinah IM, Bathia KP, Ostergaard K, Howard R, Arabia G, Quinn NP: Primary Lateral Sclerosis Mimicking Atypical Parkinsonism. Mov Disord. 22: 2057-2062 (2007).

91. Okuda B, Yamamoto T, Yamasaki M, Maya K, Imai T: Motor neuron disease with slow eye movements and vertical gaze palsy. Acta Neurol Scand. 85: 71-76 (1992).

92. Olukoga A, Bolodeoku J, Donaldson D: Origins of Cerebrospinal fluid analysis in clinical diagnosis. J Clin Pathol. 50: 187-192 (1997).

93. Panzeri C, De Palma C, Martinuzzi A, Daga A, De Polo G, Bresolin N, Miller CC, Tudor EL, Clementi E, Bassi MT: The first ALS2 missense mutation associated with JPLS reveals new aspects of alsin biological function. Brain. 129: 1710-1719 (2006).

94. Parker SE, Pula JH: Neurosyphilis presenting as asymptomatic optic perineuritis. Case Rep Ophtalmol Med. Epup. (2012).

95. Partearroyo T, Pérez-Miguelsanz J, Ubeda N, Valencia-Benítez M, Alonso-Aperte E,

Varela-Moreiras G: Dietary folic acid intake differentially affects methionine metabolism markers and hippoccampus morphology in aged rats. Eur J Nutr. 26: [Epub ahead of print] (2012).

96. Paternostro-Sluga T, Grim-Stieger M, Posch M, Schuhfried O, Vacariu G, Mittermaier C, Bittner C. Fialka-Moser V: Reliability and validity of the Medical Research Council (MRC) scale and a modified scale for testing muscle strength in patients with radial palsy. J Rehabil Med. 40: 665-671 (2008).

97. Paulus W, Engel W, Sauter S, Neesen J: Hereditäre spastische Paraplegie. Dtsch Arztebl. 99: 44 (2002).

98. Pena MJ, Ravasco P, Machado M, Pinto A, Pinto S, Rocha L., de Carvalho M, Pinto HC: What is the relevance of percutaneous endoscopic gastrostomy on the survival of patients with amyotrophic lateral sclerosis? Amyotroph Lateral Scler. 13: 550-554 (2012).

99. Pencovich N, Ben-Sira L, Constantini S: Massive cystic dilatation within a tethered filum terminale causing cauda equina compression and mimicking syringomyelia in a young adult patient. Childs Nerv Syst. [Epub ahead of print]: (2012).

100. Piquard A, Le Forestier N, Baudoin-Madec V, Delgadillo D, Salachas F, Pradat PF, Derouesné C, Meininger V, Lacomblez L: Neuropsychological changes in patients with primary lateral sclerosis. Amyotrop Lateral Scler. 7: 150-160 (2006).

101. Plassart E, Fontaine B: Genes with triplet repeats: a new class of mutations causing neurological diseases. Biomed Pharmacother. 48: 191-197 (1994).

102. Pringle CE, Hudson AJ, Munoz DG, Kiernan JA, Brown WF, Ebers GC: Primary lateral sclerosis. Clinical features, neuropathology and diagnostic criteria. Brain. 115: 495-520

(1992).

103. Rafiq MK, Bradburn M, Proctor AR, Billings C, Bianchi S, McDermott CJ, Shaw PJ: Using transcutaneous carbon dioxide monitor (TOSCA 500) to detect respiratory failure in patients with amyotrophic lateral sclerosis: A validation study. Amyotroph Lateral Scler. 13: 528-532 (2012).

104. Raycheva M, Stankova T, Penev L, Grigorova O, Traykov L: Neurosyphilis with dementia and bilateral hippocampal atrophy on brain magnetic resonance imaging. BMC Neurol. 12: [Epub ahead of print] (2012).

105. Reiber H: Proteins in cerebrospinal fluid and blood: barriers, CSF flow rate and source-related dynamics. Restor Neurol Neurosci. 21: 79-96 (2003).

106. Reiber H: Flow rate of cerebrospinal fluid (CSF)--a concept common to normal blood-CSF barrier function and to dysfunction in neurological diseases. J Neurol Sci. 122: 189-203 (1994).

107. Reiber H, Peter JB: Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. J Neurol Sci. 184: 101-122 (2001).

108. Reyes ET, Perurena OH, Festoff BW, Jorgensen R, Moore WV: Insulin resistance in amyotrophic lateral sclerosis. J Neurol Sci. 63: 317-324 (1984).

109. Riboldi G, Del Bo R, Ranieri M, Magri F, Sciacco M, Moggio M, bresolin N, Corti S, Comi GP: Tyr78Phe Transthyretin Mutation with Predominant Motor Neuropathy as the Initial Presentation. Case Rep Neurol. 3: 62-68 (2011).

110. Rodríguez GE, Califano IM, Alurralde AM, Ercolano M, Silva MC, Sica RE: Amyotrophic lateral sclerosis: its relationship with thyroid function and phosphate calcium

metabolism. Rev Neurol. 36: 104-108 (2003).

111. Roheim PS, Carey M, Forte T, Vega GL: Apolipoproteins in human cerebrospinal fluid. Proc Natl Acad Sci. USA. 76: 4646-4649 (1979).

112. Rowland LP: Primary lateral sclerosis: disease, syndrome, both or neither? J Neurol Sci. 170: 1-4 (1999).

113. Ryberg H, An J, Darko S, Lustgarten JL, Jaffa M, Gopalakrishnan V, Lacomis D, Cudkowicz M, Bowser R: Discovery and verification of amyotrophic lateral sclerosis biomarkers by proteomics. Muscle Nerve. 42: 104-111 (2010).

114. Sancho J, Servera E, Díaz JL, Banuls F, Marín J: Home tracheotomy mechanical ventilation in patients with amyotrophic lateral sclerosis: causes, complications and 1-year survival. Thorax. 66: 948-952 (2011).

115. Santos SD, Lambertsen KL, Clausen BH, Akinc A, Alvarez R, Finsen B, Saraiva MJ: CSF transthyretin neuroprotection in a mouse model of brain ischemia. J Neurochem. 115: 1434-1444 (2010).

116. Shaw WT: Sampling Student's T distribution – use of the inverse cumulative distribution function. Journal of Computational Finance. 9: 37-73 (2006).

117. Sheean G: The pathophysiology of spasticity. Eur J Neurol. 9: 53-61 (2002).

118. Shen Y, Lindberg A, Olivecrona G: Apolipoprotein CII from rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) is functionally active but structurally very different from mammalian apolipoprotein CII. Gene. 254: 189-198 (2000).

119. Shimizu T, Kato S, Hayashi M, Hayashi H, Tanabe H: Amyotrophic lateral sclerosis with

hypertensive attacks: blood pressure changes in response to drug administration. Clin Auton Res. 6: 241-244 (1996).

120. Short CL, Scott G, Blumbergs PC, Koblar SA: A case of presumptive primary lateral sclerosis with upper and lower motor neurone pathology. J Clin Neurosci. 12: 706-709 (2005).

121. Simon T, Niemann CA, Hero B, Henze G, Suttorp M, Schilling FH, Berthold F: Short- and long-term outcome of patients with symptoms of spinal cord compression by neuroblastoma. Dev Med Child Neurol. 54: 347-352 (2012).

122. Singer MA, Kojan S, Barohn RJ, Herbelin L, Nations SP, Trivedi JR, Jackson CE, Burns DK, Boyer PJ, Wolfe GI: Primary lateral sclerosis: clinical and laboratory features in 25 patients. J Clin Neuromuscul Dis. 7: 1-9 (2005).

123. Singer MA, Statland JM, Wolfe GI, Barohn RJ: Primary lateral sclerosis. Muscle Nerve. 35: 291-302 (2007).

124. Sotaniemi KA, Myllylä VV: Primary lateral sclerosis; a debated entity. Acta Neurol Scand. 71: 334-336 (1985).

125. Spataro R, Lo Re M, Piccoli T, Piccoli F, La Bella V: Causes and place of death in Italian patients with amyotrophic lateral sclerosis. Acta Neurol Scand. 122: 217-223 (2010).

126. Spencer PS, Roy DN, Ludolph A, Hugon J, Dwivedi MP, Schaumburg HH: Lathyrism: evidence for role of the neuroexcitatory aminoacid BOAA. Lancet. 2: 1066-1067 (1986).

127. Talbot K, Davies KE: Spinal muscular atrophy. Semin Neurol. 21: 189-197 (2001).

128. Tartaglia MC, Rowe A, Findlater K, Orange JB, Grace G, Strong MJ: Differentiation

between primary lateral sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis: examination of symptoms and signs at disease onset and during follow-up. Arch Neurol. 64: 232-236 (2007).

129. Thal DR, Grinberg LT, Attems J: Vascular dementia: Different forms of vessel disorders contribute to the development of dementia in the elderly brain. Exp Gerontol. [Epub ahead of print] (2012).

130. Thompson EJ: Cerebrospinal fluid. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 59: 349-357 (1995).

131. Traynor BJ, Zhang H, Shefner JM, Schoenfeld D, Cudkowicz ME: Functional outcome measures as clinical trial endpoints in ALS. Neurology. 63: 1933-1935 (2004).

132. Unrath A, Müller HP, Riecker A, Ludolph AC, Sperfeld AD, Kassubek J: Whole brain-based analysis of regional white matter tract alterations in rare motor neuron diseases by diffusion tensor imaging. Hum Brain Mapp. 31: 1727-1740 (2010).

133. Upton ML, Weller RO: The morphology of cerebrospinal fluid drainage pathways in human arachnoid granulations. J Neurosurg. 63: 867-875 (1985).

134. Valdmanis PN, Dupré N, Rouleau GA: A Locus for Primary Lateral Sclerosis on Chromosome 4ptel-4p16.1.. Arch Neurol. 65: 383-386 (2008).

135. Villar LM, Masjuan J, Sádaba MC, Gonzáles-Porqué P, Plaza J, Bootello A, Alvarez-Cermeno JC: Early differential diagnosis of multiple sclerosis using a new oligoclonal band test. Arch Neurol. 62: 574-577 (2005).

136. Vincente MH, Outeiro TF: The sour side of neurodegenerative disorders: the effects of protein glycation. J Pathol. 221: 13-25 (2010).

137. Wechsler IS, Brody S: The problem of primary lateral sclerosis. J Am Med Assoc. 130: 1195-1198 (1946).

138. Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, Williams KL: Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. Biotechnol Genet Eng Rev. 13: 19-50 (1996).

139. Williams DB, Gubbay SS, Mulder DW, Brooks B: The Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale: Assessment of Activities of Daily Living in Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis. Arch Neurol. 53: 141-147 (1996).

140. Winter S, Ludolph AC: Motoneuronerkrankungen. In: Winkler J, Ludolph AC Neurodegenerative Erkrankungen des Alters, Bd 1, 1. Aufl, Georg Thieme Verlag, 213-231 (2004).

141. Yang R, Huang R, Chen D, Song W, Zeng Y, Zhao B, Zhou D, Shang HF: Causes and places of death of patients with amyotrophic lateral sclerosis in south-west China. Amyotroph Lateral Scler. 12: 206-209 (2011).

142. Zhang XJ, Piao YS, Chen L, Tang GC, Wei LF, Yang H, Lu DH: Multiple intracranial lesions: a clinicalpathologic study of 62 cases. Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi. 40: 599-603 (2011).

7. Danksagung

Hiermit möchte ich allen danken, die mich mit Rat und Tat bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

An erster Stelle danke ich recht herzlich meinem Doktorvater Prof. Dr. Albert C. Ludolph für seine beständige Unterstützung und die Förderung von Ideen, für seine fachliche Anleitung, seine Erreichbarkeit und nicht zuletzt für die stetige Motivation.

Weiter möchte ich mich bei allen beteiligten Neurologen der 4 neurologischen Zentren für ihre Investition von Mühe und Arbeit in dieses Projekt bedanken. Hier sind vor allem Frau Prof. Dr. S. Petri und Frau PD Dr. K. Kollewe aus Hannover, aus Dresden Dr. A. Hermann und Dr. F. Hanisch aus Halle zu nennen.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Prof. Dr. J. Brettschneider für die gute Betreuung des experimentellen Abschnitts. Bei dieser Gelegenheit möchte ich auch Frau Dr. V. Lehmensiek danken. Ohne sie wäre die Durchführung der Liquorproteomanalyse nicht möglich gewesen. Dank gilt auch dem ganzen Liquorlaborteam des RKU, das bei Fragen immer zur Stelle war.

Dank an Dr. H.-J. Gdynia, der besonders bei der Überwindung der ersten Hürden zur Stelle war, und an Frau A. Agrawal für die Hilfe bei Erstellung und Pflege der Datenbank.

Ein besonderer Dank gilt auch meinen Eltern und Geschwistern, die mich in jeder Hinsicht unterstützt haben.

Ein Dank geht schließlich an die Menschen, die mich diese Zeit über begleitet haben.