

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

Liquorproteomanalyse von Patienten mit Multipler Sklerose

Dissertation

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

vorgelegt von

Gloria Tauscher
aus Biberach

2007

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Hayrettin Tumani

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Gierschik

Tag der Promotion: 19. Juni 2008

Inhaltsverzeichnis:

	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
1	EINLEITUNG	1
	1.1 Multiple Sklerose	1
	1.2 Schubförmig remittierende Multiple Sklerose (RRMS) und klinisch isoliertes Syndrom (CIS)	3
	1.3 Liquor cerebrospinalis	4
	1.4 Proteomics	6
	1.5 Aufgabenstellung und Zielsetzung	9
2	MATERIAL UND GERÄTE	10
	2.1 Chemikalien und Marker	10
	2.2 Kits	11
	2.3 Farbstoffe	11
	2.4 Puffer	12
	2.5 Geräte	14
	2.6 Verbrauchsmaterial	14
3	PATIENTEN UND METHODEN	15
	3.1 Patientenproben	15
	3.2 Aufkonzentrierung	17
	3.3 Aufreinigung	18
	3.4 Proteinbestimmung	19
	3.5 Protein-Präzipitierung	20
	3.6 Farbstoffmarkierung	21
	3.7 Rehydratisierung mit Probe	25
	3.8 Isoelektrische Fokussierung (IEF)	25
	3.9 Vertikale Gelelektrophorese	26
	3.10 Scannen und statistische Auswertung	29
	3.11 Silberfärbung (kompatibel mit Massenspektrometrie)	30
	3.12 Massenspektrometrische Auswertung	32

4	ERGEBNISSE	34
	4.1 Schubförmig remittierende Multiple Sklerose (RRMS)	35
	4.2 Klinisch isoliertes Syndrom (CIS)	39
5	DISSKUSION	43
	5.1 Allgemeines	43
	5.2 Schubförmig remittierende Multiple Sklerose (RRMS)	48
	5.3 Klinisch isoliertes Syndrom (CIS)	50
	5.4 Gemeinsame Proteine der schubförmig remittierenden Multiplen Sklerose (RRMS) und des klinisch isolierten Syndroms (CIS)	53
	5.5 Schlussfolgerung und Ausblick	55
6	ZUSAMMENFASSUNG	57
7	LITERATURVERZEICHNIS	59
8	DANKSAGUNG	74

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
pmol	Pikomol
°C	Grad Celsius
2D	zweidimensional
ApoE	Apolipoprotein E
APS	Ammoniumperoxidsulfat
BSA	Bovines Serum-Albumin
C3	Komplementfaktor 3
CHAPS	(3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propan-sulfonat)
CIS	klinisch isoliertes Syndrom
cm	Zentimeter
DBP	Vitamin D-binding Protein
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DIGE	Difference in-gel electrophoresis
DMF	Dimethylformamid
DTT	Dithiothreitol
EAE	entzündliche Autoimmunencephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
g	Gramm
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoff
IEF	Isoelektrische Fokussierung
Ig	Immunglobulin
IPG	Immobiline™ dry polyacrylamide gel strips (Isoelectric focussing gel)

IS	interner Standard
kDa	kiloDalton
l	Liter
MALDI-TOF-MS	Matrix-assisted laser desorption/ Ionisation time of flight mass- spectrometry
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol pro Liter
<i>Mr</i>	Molekülradius
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
Na	Natrium
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
Nr.	Nummer
OD	optische Dichte
pH	potentia Hydrogenii
<i>pI</i>	isoelektrischer Punkt
ppm	parts per million
PPMS	primär progrediente Multiple Sklerose
rpm	Umdrehungen pro Minute
RRMS	schubförmig remittierende Multiple Sklerose
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
s	Sekunde
Serpin	Serin Proteinase Inhibitor
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SPMS	sekundär progrediente Multiple Sklerose

Temed	N,N,N',N'- Tetramethylethylen-diamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
TTR	Transthyretin
V	Volt
W	Watt
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS), auch Encephalomyelitis disseminata genannt, ist eine chronisch entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS). Mit einer Prävalenz von 70/ 100 000 Einwohnern und einer Inzidenz von 4/ 100 000 Einwohnern ist sie eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen in Deutschland. Trotz der noch weitgehend unbekanntem Ätiologie wird sie allgemein als Autoimmunerkrankung angesehen, wobei autoaggressiven T-Zellen eine essentielle Rolle zukommt, da diese unter Triggerung einer komplexen, entzündlichen Kaskade zu einer Zerstörung der Myelinscheiden der Nerven [49] und im weiteren Verlauf zur neuroaxonalen Schädigung führen. Dabei kommt es zur charakteristischen Entmarkung vor allem des periventriculären Marklagers mit konsekutivem Ersatz durch Gliagewebe (Sklerose). Durch den Myelinverlust nimmt die Nervenleitgeschwindigkeit ab, was zu Funktionseinschränkung und –verlust der entsprechenden Erfolgsorgane führen kann. Daneben findet, neueren Erkenntnissen zufolge, aber auch eine primäre neuronale und axonale Schädigung statt [75]. So kommt es auch in Regionen, in denen keine entzündlichen Entmarkungsherde zu finden sind, zu einer progredienten neuro-axonalen Atrophie [66, 71]. Es wird vermutet, dass dies wiederum einen maßgeblichen Beitrag zur Progression der Erkrankung leistet [10, 11, 14, 24, 33, 53, 69].

Als ursächlich werden neben einer genetischen Prädisposition [21, 42] und äußeren Faktoren [7, 52], welche auch mit Exazerbationen in Verbindung gebracht werden [15, 63, 64], vor allem eine slow-virus-Genese diskutiert [6, 30, 34]. Die MS ist aber weder eine typische Erbkrankheit, noch konnte bisher ein auslösender Erreger gefunden werden [20, 31, 40]. Die Diagnose stützt sich zunächst auf Anamnese und charakteristische Symptome, die unterschiedlichen nervösen Funktionssystemen (optisches, motorisches, sensibles, cerebelläres oder vegetatives System) zugeordnet werden können. Die häufigsten klinischen Symptome sind Kraftlosigkeit, Sensibilitätsstörungen und Sehstörungen. Die Basis für die Diagnosestellung bildet der Nachweis einer zeitlichen und räumlichen Dissemination von MS-typischen Symptomen (Schubereignisse) und objektivierbaren Krankheitszeichen.

Als zusatzdiagnostische Hilfsmittel kommt sowohl dem Nachweis polytooper Entmarkungsherde in der Magnetresonanztomographie (MRT) des Gehirns und Rückenmarks, als auch dem Nachweis oligoklonaler Banden im Liquor cerebrospinalis (kurz Liquor genannt) als Ausdruck einer intrathekalen Antikörperproduktion eine besondere Bedeutung zu [60, 62, 72, 73].

Die Einteilung in unterschiedliche Verlaufsformen (siehe auch Abbildung 1) wird bisher in der Praxis rein klinisch vorgenommen. Man unterscheidet demnach gemäß der englischen Nomenklatur das klinisch isolierte Syndrom (*Clinically Isolated Syndrome*, im Folgenden kurz CIS genannt), die schubförmig remittierende Multiple Sklerose (*Relapsing Remitting Multiple Sclerosis*, im Folgenden kurz RRMS genannt) und den Übergang in eine sekundär chronisch progrediente Multiple Sklerose (*Secondary Progressive Multiple Sclerosis* kurz SPMS), sowie die primär progrediente Multiple Sklerose (*Primary Progressive Multiple Sclerosis*, kurz PPMS) [66]. Histopathologisch liegen der Erkrankung ebenfalls unterschiedliche entzündliche Muster zugrunde. Ein verlässlicher Biomarker oder paraklinischer Test für diese Erkrankung, sowohl was die Untergruppen, die aktuelle Krankheitsaktivität als auch die Prognose angeht, existiert jedoch bisher noch nicht.

Da somit trotz bedeutender therapeutischer Fortschritte in den letzten Jahren noch immer der Bedarf eines individuell zugeschnittenen Therapieangebots existiert, soll im Folgenden näher auf die häufigen (oder klassischen) Verlaufsformen eingegangen werden.

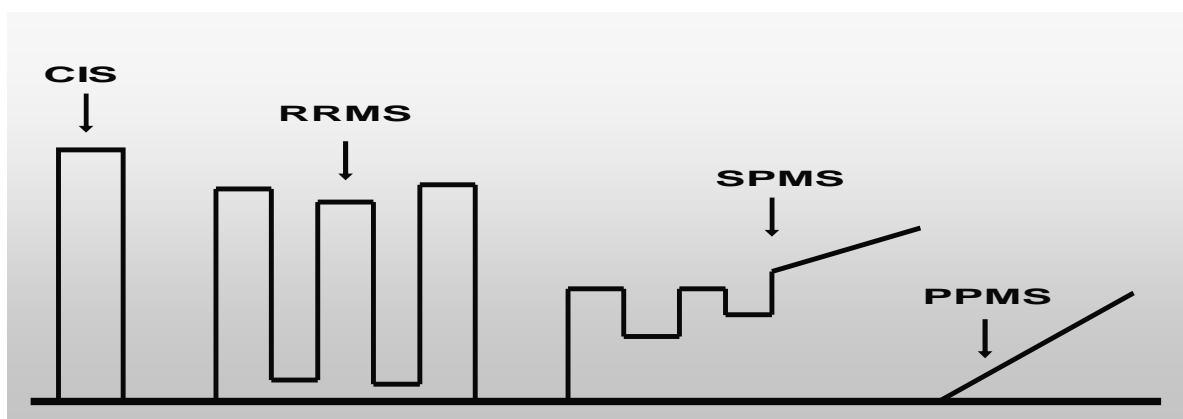


Abbildung 1:

Übersichtsdarstellung unterschiedlicher Verlaufsformen bei der Multiplen Sklerose.

Abkürzungen: CIS = klinisch isoliertes Syndrom, RRMS = schubförmig remittierende Multiple Sklerose, SPMS = sekundär chronisch progrediente Multiple Sklerose, PPMS = primär progrediente Multiple Sklerose

1.2 Schubförmig remittierende Multiple Sklerose (RRMS) und klinisch isoliertes Syndrom (CIS)

1.2.1 Schubförmig remittierende Multiple Sklerose (RRMS):

Mit einer Häufigkeit von 50-60 % ist die schubförmig remittierende MS (RRMS) eine häufige Form der Multiplen Sklerose. Nach zehn Jahren sind rund 50 %, und nach 25-30 Jahren bereits 90 % einer RRMS in eine SPMS übergegangen.

Ein Schub ist definiert als das Auftreten eines neuen Symptoms oder als ein Wiederauftreten alter Symptome ohne gleichzeitige Infektzeichen und Fieber. Um als Schub zu gelten, müssen die Beschwerden länger als 24 Stunden anhalten, im Mittelmaß zwischen vier bis sechs Wochen. Das Verschwinden dieses Symptoms wird als Remission bezeichnet. Eine Remission ist in ihrer Länge sehr variabel und kann über einen Zeitraum von Monaten bis hin zu mehreren Jahren variieren.

1.2.2 Klinisch isoliertes Syndrom (CIS):

Unter einem klinisch isolierten Syndrom (CIS) versteht man ein einzelnes Ereignis, das auf eine Demyelinisierung hinweist und nicht von anderen Zeichen begleitet wird. Ob und wann ein CIS in eine definitive MS übergeht, lässt sich nicht mit Sicherheit vorhersagen. Ein möglicher Prognosefaktor stellt die Bildgebung mittels MRT (Magnetresonanztomographie) dar. Es zeigte sich, dass ein CIS mit einer im MRT sichtbaren, und mit MS zu vereinbarenden, Hirnläsion eher in eine sichere MS übergeht als ohne MRT-Korrelat [13].

Von einer definitiven MS kann beim CIS allerdings deshalb noch nicht ausgegangen werden, da im MRT nicht die erforderliche Anzahl von Herden nachweisbar sein müssen (räumliche Dissemination) und nur ein Schub (und somit keine zeitliche Dissemination) vorliegt.

1.3 Liquor cerebrospinalis

1.3.1 Allgemeines:

Das menschliche Gehirn und Rückenmark ist vom so genannten *Liquor cerebrospinalis* (Liquor) umgeben, welcher sich als Ultrafiltrat des Blutes in seiner physiologischen Zusammensetzung deutlich von der des Blutplasmas unterscheidet. Die tägliche Produktion beträgt ca. 500 ml und findet zum größten Teil im Plexus choroideus statt, wobei die tatsächlich zirkulierende Liquormenge ca. 150 ml beträgt. Die Resorption erfolgt vor allem über die so genannten Arachnoidalzotten. Während der Liquor entlang des Rückenmarks in Richtung Lumbalsack strömt, wird der anfangs noch eiweißarme Primärliquor ständig mit Proteinen des eiweißreichen Meningealraumes sowie parenchymatösen Proteinen angereichert. Dieses Phänomen nennt man „ventrikulo-lumbaler Gradient“, der hinsichtlich der geltenden Normwerte für Liquorproteine eine bedeutende Rolle spielt. In der Regel wird der Liquor mittels Lumbalpunktion gewonnen. Dabei wird die Punktionsnadel streng median zwischen dem 4. und 5. Lendenwirbelkörper bis in den Duralraum vorgeschoben. Anschließend wird der Mandrin der Punktionskanüle zurückgezogen, so dass der Liquor langsam abtropfen kann [95].

1.3.2 Der Liquor als geeignetes Untersuchungsobjekt:

Da sich bei zahlreichen neurologischen Erkrankungen charakteristische Veränderungen in der Zusammensetzung des Liquors finden, kann der Liquor einen wichtigen Hinweis auf die Ursache eines Krankheitsbildes geben [88]. So bildet die Liquordiagnostik ein wertvolles Standbein für die Diagnosestellung gerade entzündlicher Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose [95].

1.3.3 Der entzündliche Liquor:

Der entzündliche Liquor allgemein ist gekennzeichnet durch:

- eine Zellzahlvermehrung auf über 4 Leukozyten/ μl ,
- eine oligoklonale Fraktionierung der γ -Globuline in der isoelektrischen Fokussierung,
- eine intrathekale Immunglobulinsynthese im Quotientendiagramm
- eine intrathekale Synthese von Antikörpern mit einem Spezifitätsindex $\geq 1,5$.

1.3.4 Liquorveränderungen bei der Multiplen Sklerose:

Beim typischen Liquorbefund der Multiplen Sklerose finden sich in der Regel folgende Befunde (Häufigkeit in %):

- Lokalsynthese von Antikörpern gegen Masern-, Zoster- oder Rötelnantigene (94 %)
- eine oligoklonale Fraktionierung der γ -Globuline in der isoelektrischen Fokussierung (98 %)
- Albuminquotient unter 7×10^{-3} (88 %)
- Leukozytenzahl normal bis leicht erhöht $< 50/\mu\text{l}$ (61 %)
- eine intrathekale Immunglobulinsynthese mit einer IgG-Prävalenz im Quotientendiagramm (73 %)
- Aktivierte B-Lymphozyten (79 %)

Ein akuter Schub der Multiplen Sklerose wird über einen komplexen Entzündungsmechanismus vor allem von Makrophagen, B-Lymphozyten, sowie von T-Lymphozyten initiiert [41, 79]. Diese sind dann im Liquor zu finden, wenn der entzündliche Herd in mittelbarer Nachbarschaft zum Liquorraum liegt. Zwar ist ein großer Teil der MS-Herde in diesem Bereich situiert, jedoch kann ein akuter Schub auch mit einer völlig unauffälligen Zellzahl einhergehen, wenn der Entmarkungsherd weit vom Liquorraum entfernt liegt [87].

Diagnostisch bedeutsamer sind deshalb die Plasmazellklone, die nicht nur mit dem Ausmaß der ZNS-Entzündung korrelieren [41], sondern auch zwischen den einzelnen Schüben Immunglobuline synthetisieren. Auch diese werden im Liquor sichtbar und bleiben dort über lange Zeit nachweisbar. Ein einmal gewonnener Liquorbefund bei MS muss deshalb nicht durch eine wiederholte Untersuchung gesichert werden.

Gewöhnlich ist der MS-Liquor bereits entzündlich verändert, wenn die ersten Krankheitssymptome auftreten. Dies ist vermutlich auf die stummen, jedoch charakteristischen periventrikulären Herde zurückzuführen, welche auch ohne eine Klinik hervorzurufen zu den typischen Veränderungen im Liquor führen. Es besteht jedoch, wie bei allen chronisch entzündlichen Prozessen, keine Beziehung zwischen Schwere und Verlauf der Multiplen Sklerose und dem Ausmaß der Liquorveränderungen [95].

1.4 Proteomics

1.4.1 Allgemeines:

Der Begriff „Proteom“ wurde von Marc L. Wilkins [91] in Analogie zum Begriff „Genom“ geprägt und bezeichnet die Gesamtheit aller Proteine innerhalb einer lebenden Einheit zu einem bestimmten Zeitpunkt, z.B. eines Lebewesens, einer Zelle, eines Gewebes oder eines Kompartiments wie dem Liquor. Proteine sind an der Bildung eines riesigen und komplexen Netzwerkes beteiligt, indem sie Moleküle auf- und abbauen, als Kommunikationssystem dienen, Befehle erteilen oder befolgen und das Leben eines Kompartiments erhalten oder zerstören können. Die Baupläne der Proteine befinden sich in den Erbanlagen, somit beschäftigt sich „Proteomics“ (in Analogie zum Begriff „Genomics“) bevorzugt mit den Ergebnissen sequenzierter Genome. Während das Genom allerdings eine sich wenig verändernde Entität darstellt, ist das Proteom von Zelle zu Zelle unterschiedlich. Es verändert sich beständig durch seine biochemischen Interaktionen sowohl mit dem Genom als auch mit Umweltfaktoren, z.B. durch alternatives Spleißen und posttranslationale Modifizierungen (siehe Abbildung 2). Das Proteom ist damit ein dynamischer, sich ständig anpassender Spiegel seiner Umwelt [57].

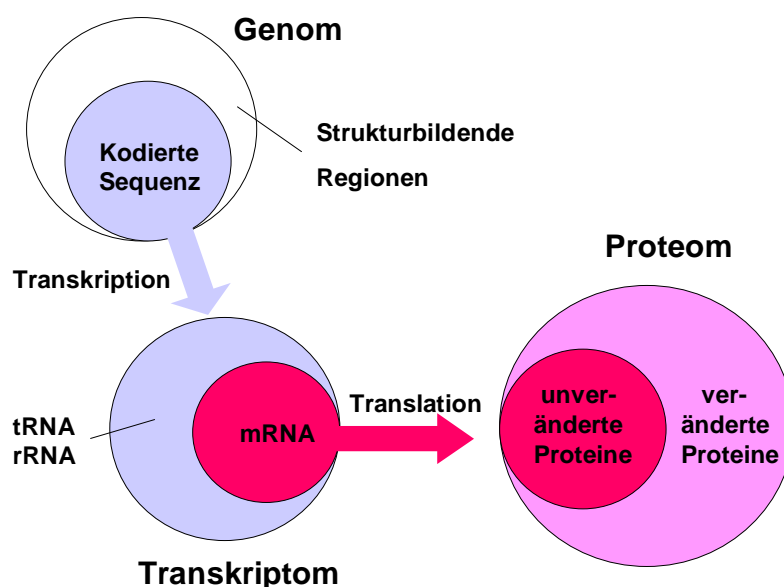


Abbildung 2:

Übersichtsdarstellung der Entwicklung vom Genom zum Proteom.

Abkürzungen: tRNA = Transfer-Ribonukleinsäure, rRNA = ribosomale Ribonukleinsäure, mRNA = Boten-Ribonukleinsäure

1.4.2 Proteomforschung:

Proteine bestimmen den Lebensablauf des Organismus und stellen somit den Dreh- und Angelpunkt für das Verständnis jeder Veränderung dar. Zum Beispiel zeigen sich die Auswirkungen genetischer Veränderungen oftmals erst auf Ebene des Proteoms. Daher können Proteine in vielen Fällen besser als Diagnosemarker von Krankheiten dienen als Gene. Bei der Proteomanalyse in der vorliegenden Arbeit wird das Proteom einer kranken Probe mit einer Kontrollprobe verglichen, und kann daher eine wertvolle Hilfe beim Finden von Ursache und Wirkung einer Krankheit und deren potentieller Therapien sein [44, 46, 48, 96]. Die Proteinidentifizierung der im Proteom enthaltenen Proteine geschieht mittels Massenspektrometrie. Als Ergebnis erhält man den individuellen Fingerabdruck des untersuchten Proteins in Form eines unverwechselbaren Peptidspektrums. Anhand dieses Spektrums kann man das gesuchte Protein durch einen Vergleich mit Proteinkatalogen, so genannten Datenbanken, identifizieren (siehe Abbildung 3). Da ein Gen ein bestimmtes Protein kodiert, kann man entsprechend auch jedem Protein umgekehrt sein jeweiliges Gen zuordnen [5]. Damit ist Proteomics quasi als Ergänzung der Genomics-Forschung aufzufassen, und kann deren Ergebnisse nicht nur überprüfen sondern auch erweitern.

Im Fall der MS stellt die konventionelle Liquordiagnostik zwar ein wichtiges Standbein sowohl bei der Diagnosesicherung als auch zum Ausschluss in Frage kommender Differentialdiagnosen dar, erlaubt aber keine Aussage über Krankheitsaktivität, Verlaufsform oder Prognose. Daher kommt der Liquorforschung besondere Bedeutung zu, um z.B. mittels Proteomics mögliche Biomarker bezüglich Phänotyp-Differenzierung, Therapieoptimierung und Therapiekontrolle zu identifizieren. Eine weitere Zielsetzung liegt in der Entdeckung krankheitsspezifischer pathophysiologischer Prozesse, was wiederum grundlegend zur Entwicklung neuer Therapiestrategien beitragen kann.

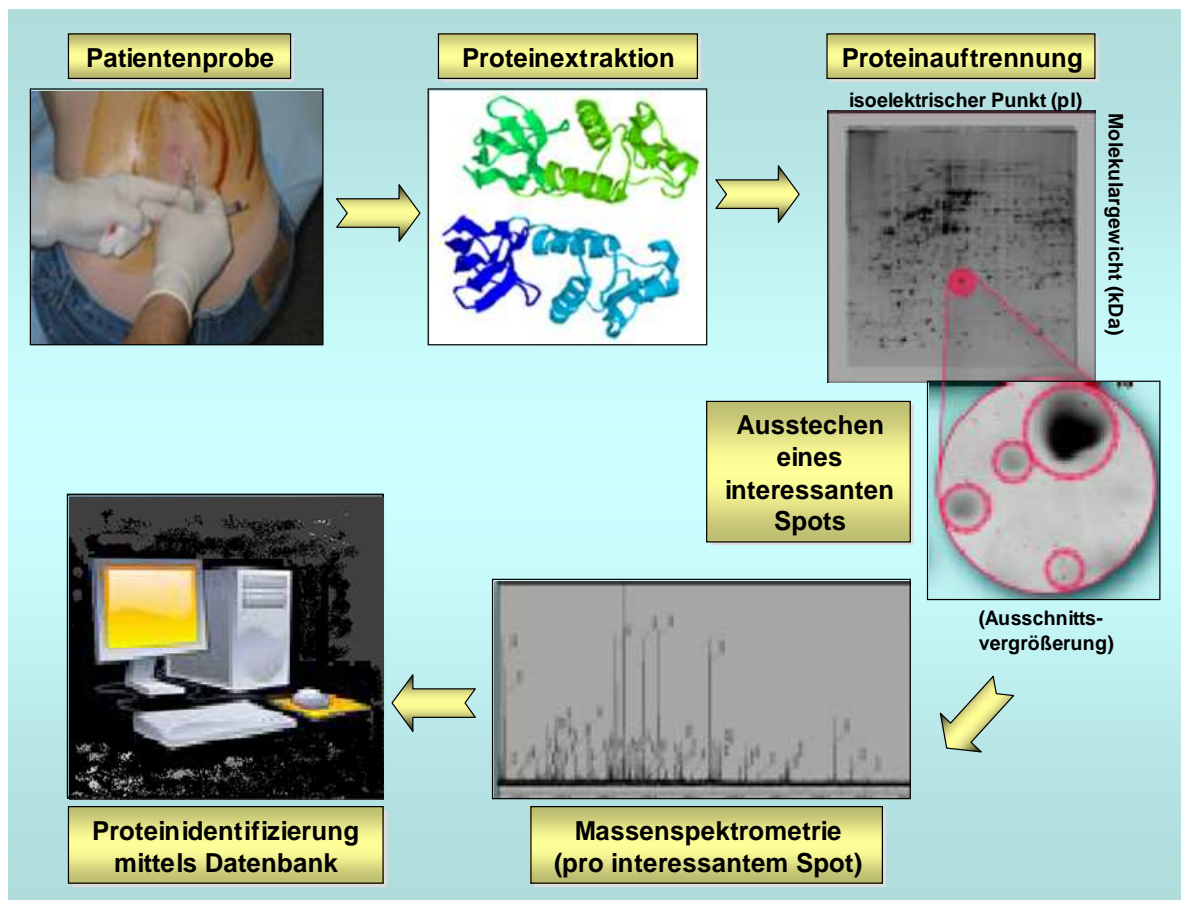


Abbildung 3:

Schematische Darstellung des Arbeitsablaufs einer Proteomanalyse mittels 2D (zweidimensionaler) - Gelelektrophorese und Massenspektrometrie: Nach der Probengewinnung mittels Lumbalpunktion erfolgt die Proteinextraktion und Depletion von Albumin und IgG (Immunglobulin G). Die Auftrennung der Proteine findet im 2D-Gel statt, anschließend werden interessante Proteinspots ausgestochen und massenspektrometrisch untersucht. Durch Vergleich der massenspektrometrisch gewonnenen Ergebnisse mit einer Referenzdatenbank erfolgt die letztendliche Proteinidentifizierung.

Abkürzungen: pI = isoelektrischer Punkt, kDa = kiloDalton, 2D = zweidimensional, IgG = Immunglobulin G

1.5 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Die Liquoranalyse hat sich als diagnostisches Routineverfahren etabliert, da für viele Krankheiten charakteristische Veränderungen der Proteinzusammensetzungen gefunden wurden. Auch bei der Multiplen Sklerose existieren bereits Diagnosekriterien, die sich auf die Anwesenheit bestimmter Befundmuster im Liquor stützen ohne eine Spezifität für die MS-Diagnose zu bieten. Daher kann die Proteomforschung wichtige Erkenntnisse über Pathomechanismen und mögliche Biomarker liefern.

Bisher konnte das gesamte Proteom, das bei der MS vorzufinden ist, noch nicht zufriedenstellend identifiziert werden. Verschiedene Studien erbrachten unterschiedliche Resultate bezüglich neu entdeckter Proteine, allerdings wurden dabei jeweils nur wenige Patienten untersucht und keine Unterteilung in verschiedene Verlaufsformen vorgenommen [34, 41]. Des Weiteren wurden konventionelle 2D-Gelelektrophorese-Verfahren eingesetzt, die bekanntlich schwer zu standardisieren und daher mit nur geringer Reproduzierbarkeit assoziiert sind. Demzufolge sind Aussagen über frühzeitige Differenzierungsmöglichkeiten der Verlaufsform und damit über eine individuell angepasste Therapie noch nicht möglich. Es ist deshalb unerlässlich, gut charakterisierte Unterformen mit normalen Proben zu vergleichen, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. In diesem Zusammenhang kann die Regulation dieser Proteomveränderungen bei unterschiedlichen Verlaufsformen besser verstanden und die Bedeutung der gefundenen Proteine im passenden Gesamtzusammenhang gesehen werden.

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es deshalb, neue und/ oder veränderte Proteine im Liquor von MS-Patienten im Vergleich zu neurologisch unauffälligen Patienten zu finden. Diese könnten zukünftig als Biomarker dienen, und damit neue Ansatzpunkte sowohl zur Diagnose als auch zur Pathogenese der MS liefern. Neben RRMS sollten auch CIS-Proben als mögliche Frühform einer MS untersucht werden. Die Feststellung, ob sich das Proteom der beiden Formen unterscheidet, könnte daher eine spezifische Therapieanpassung schon frühzeitig möglich machen und möglicherweise eine Vorhersage über die Schwere des Krankheitsverlaufs zulassen.

2 Material und Geräte

2.1 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 ₂ O)	Aldrich
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich
Ethanol, vergällt	Klinikumsapotheke Ulm
Essigsäure, 100% wasserfrei	Merck
Formaldehyd	Merck
Glycin	AppliChem
Glycerin	Roth
Harnstoff	Merck
HCl, 25 %ig (Salzsäure)	Merck
IPG Puffer, pH 3-10	Amersham
L-Lysin	Sigma
Na-Acetat	AppliChem
Na-Carbonat	Merck
N, N –Dimethylformamid	Sigma-Aldrich
Na-EDTA (Natrium-Ethylendiamintetraessigsäure)	AppliChem
Na-Thiosulfat	Sigma
Roti® -Quant	Roth
RPN 800	Amersham
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)	Serva

Silbernitrat	Fluka BioChemika
Temed (N,N,N',N' - Tetramethylethyldiamin)	Fluka BioChemika
Thioharnstoff	Merck
Tris (Trishydroxymethylaminomethan)	USB Corporation
Vaseline	Riedel-de Haën
Wasser, bidestilliert	Braun

2.2 Kits

2D Clean-Up Kit	Amersham
Aurum Serum Kit	Bio-Rad
Immobiline™ DryStrip, pH 3-10, 18cm	Amersham
Ultrafree-MC, Centrifugal Filter Devices	Millipore

2.3 Farbstoffe

<u>2.3.1 CyDye DIGE Fluor minimal dyes:</u>	Amersham
Cy 2 (5nmol)	
Cy 3 (5nmol)	
Cy 5 (5nmol)	

2.3.2 Farbstoff-Stocklösung (1 nmol/μl):

Die Gefäße mit den CyDye DIGE Fluor minimal dyes wurden aus der Gefriertruhe genommen und 5 min ungeöffnet bei Raumtemperatur stehen gelassen. Pro 5 nmol CyDye wurden 5 μl DMF (<0,005% H₂O) hinzugefügt, 30 s gevortext und anschließend für 30 s bei 12 000 x g zentrifugiert.

2.3.3 Farbstoff-Verdünnungslösung (200 pmol/μl):

Für unsere Versuche wurde die Farbstoff-Stocklösung verdünnt, indem zu 1 μl Farbstoff-Stocklösung 4 μl DMF pipettiert und anschließend gut gevortext wurde.

2.4 Puffer

2.4.1 10x SDS Elektrophoresepuffer:

Glycin 721 g

SDS 50 g

Tris 151 g

⇒ Mit ddH₂O auf 5 Liter aufgefüllt.

2.4.2 10% SDS-Lösung:

SDS 20 g

⇒ Mit ddH₂O auf 200 ml aufgefüllt.

2.4.3 1,5 M Tris-HCl Puffer, pH 8,8:

Tris 182 g

⇒ In etwa 850 ml ddH₂O gelöst, mit pH-Elektrode den pH-Wert bestimmt und langsam konzentrierte Salzsäure (25%ig) dazugegeben, bis pH 8,8 erreicht war. Anschließend mit ddH₂O auf 1 Liter aufgefüllt.

2.4.4 SDS Equilibrierungspuffer:

1,5 M Tris-HCl Puffer, pH 8,8 10 ml

Harnstoff 72 g

Glycerin 69 ml

SDS 4 g

Bromphenolblau 0,01% (w/v)

⇒ Mit ddH₂O auf 200 ml aufgefüllt, proportioniert und bei -30 °C gelagert.

2.4.5 IPG-/ Fokussierpuffer (pH 3-10):

Harnstoff	4,2 g
Thioharnstoff	1,5 g
CHAPS	0,2 g
Ampholyt (pH 3-10)	80 µl
Bromphenolblau	0,01% (w/v)

⇒ Mit ddH₂O auf 10 ml aufgefüllt, proportioniert und bei -30 °C gelagert.

2.4.6 Farbstoffmarkierungspuffer:

Harnstoff	2,4 g
Tris	18,2 g
CHAPS	0,2 g

⇒ Mit ddH₂O auf 5 ml aufgefüllt, anschließend mit 1 N HCl auf pH 8,5 titriert und der pH-Wert mit pH-Indikatorstäbchen kontrolliert.

2.5 Geräte

2.5.1 Geräte:

Electrophorese Power Supply	Amersham
Elektrophoresekammer (Ettan DALTsix)	Amersham
ELISA	Tecan
Feinwaage/ Analysewaage	Sartorius
Gelgießkammer	Amersham
Kühlanlage für Elektrophorese	Pharmacia Biotech
Kühlzentrifuge (Biofuge fresco)	Heraeus
Magnetrührer	Janke & Kunkel
Mikrowelle	Philips
pH-Indikatorstäbchen, pH 6,5-10	Merck
pH-Meter	WTW
Protean IEF Cell	Bio-Rad
Thermomixer comfort	Eppendorf
Thyphoon™ 9400 Variable Mode Imager	Amersham
Vortex MS2	IKA
Voyager DE-STR MALDI/TOF Massenspektrometer	Biosystems

2.5.2 EDV:

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

2.6 Verbrauchsmaterial

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

3 Patienten und Methoden

3.1 Patientenproben

3.1.1 Schubförmig remittierende Multiple Sklerose (RRMS):

Es wurden zwölf Patienten im Alter von 22-60 Jahren ausgewählt, von denen je sechs männlichen und sechs weiblichen Geschlechts waren. Das Durchschnittsalter betrug 36,6 Jahre. Die Diagnose dieser Form der Multiplen Sklerose wurde anhand der schubförmig verlaufenden Klinik, charakteristischer Liquorbefunde (oligoklonale Banden, intrathekale IgG-Bildung im Quotientendiagramm) und disseminierter Herde in der Magnetresonanztomographie (MRT) gestellt.

3.1.2 Klinisch isoliertes Syndrom (CIS):

Es wurden ebenfalls zwölf Patienten im Alter von 18-49 Jahren ausgewählt. Die Geschlechterverteilung lag hierbei bei sieben männlichen und fünf weiblichen Patienten, das Durchschnittsalter betrug 33,7 Jahre. Der Verdacht auf MS wurde anhand der klinischen Symptomatik (z.B. Retrobulbärneuritis, Paraesthesien und/ oder Paresen), des Liquorprofils (oligoklonale Banden, intrathekale IgG-Produktion im Quotientendiagramm) und Läsionen im MRT gestellt.

3.1.3 Kontrollen (Kontrolle-RRMS und Kontrolle-CIS):

Für die beiden Krankheitsbilder wurde je ein eigener Kontroll-Pool angelegt (Kontrolle-RRMS und Kontrolle-CIS), bei welchem für jeden einzelnen Patienten ein sowohl alters- als auch geschlechtsgemachter Kontrollbefund ausgewählt wurde. Das Hauptaugenmerk der hierfür ausgewählten Kontrollen lag in einem komplett unauffälligen Liquorbefund, wobei der Liquor von Patienten mit anderen neurologischen/ psychiatrischen Erkrankungen (Sinusitiden, depressiven Episoden, Bandscheibenvorfall, Kopfschmerz- und Schwindelsymptomatik, bzw. Punktionen zum Ausschluss anderer organischer ZNS-Erkrankungen, z.B. Subarachnoidalblutung) herangezogen wurde.

In der folgenden Tabelle ist die Klassifizierung der untersuchten Patientenproben aufgeführt:

Tabelle 1: Klassifizierung der Probenart nach klinischen und liquorologischen Parametern

Abkürzungen: RRMS = schubförmig remittierende Multiple Sklerose, CIS = klinisch isoliertes Syndrom, μl = Mikroliter, mg = Milligramm, l = Liter, IgG = Immunglobulin G

	RRMS	Kontrolle- RRMS	CIS	Kontrolle- CIS
Anzahl (männlich/weiblich)	12 (6/6)	12 (6/6)	12 (7/5)	12 (7/5)
Alter in Jahren (Spannbreite)	36,6 (22-60)	36,8 (21-61)	33,7 (18-49)	33,4 (18-49)
Mittelwert der Krankheitsdauer (Spannbreite)	7,1 Jahre (0,1- 33 Jahre)	-	0,9 Monate (0,1- 3,0 Monate)	-
Zellzahl im Liquor in μl^{-1} (Spannbreite)	5 (0-17)	0,8 (0-3)	6,2 (1-32)	0,6 (0-2)
Protein im Liquor in mg/l (Spannbreite)	479,7 (298-737)	353,2 (244-462)	430,8 (246-621)	329,7 (257-465)
Nachweis von oligoklonalen IgG-Banden im Liquor	11/12	0/12	10/12	0/12

3.2 Aufkonzentrierung

3.2.1 Vorbereitung:

Während die bei -80 °C gelagerten Liquores auf Eis auftauten, wurde die Zentrifuge auf 4 °C vorgekühlt und die „Ultrafree-MC Konzentrator Biomax 5000“ Filtereinheiten aus dem Kühlschrank genommen. Jede Filtereinheit besteht aus einem 5000 Da Filter-Cup und einem passenden 1,5 ml Zentrifugengefäß. Um das Austrocknen des Filters während der Zentrifugation zu verhindern, wurde in das Zentrifugengefäß ddH₂O vorgelegt. Die Liquores wurden während der gesamten Konzentrierung auf Eis gelagert.

3.2.2 Aufkonzentrierung:

Zuerst wurden in das Zentrifugengefäß 300 µl ddH₂O pipettiert, dann das Filter-Cup aufgesetzt und dieses mit 450 µl Liquor befüllt. Anschließend wurde der Deckel fest verschlossen und die komplette Filtereinheit zur Aufkonzentrierung 15 min bei 6800 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die Flüssigkeit im unteren Teil des Eppendorfreaktionsgefäßes verworfen und wiederum mit 300 µl ddH₂O versetzt. Der obere Teil wurde ebenfalls mit frischem Liquor aufgefüllt und alles erneut 15 min bei 6800 rpm zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt bis die ganze Liquorprobe um das ca. 25-30 fache aufkonzentriert war. Um die Proteine vom Filter zu lösen wurde das Konzentrat vorsichtig auf- und abpipettiert und in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt.

3.2.3 Lagerung:

Bis zur weiteren Verwendung wurden die konzentrierten Liquores bei -80 °C gelagert.

3.3 Aufreinigung

Im menschlichen Liquor befindet sich eine Vielzahl verschiedener Proteine, wobei ein Großteil des Gesamtproteins aus Albumin und Immunglobulin G (IgG) besteht. Während der 2D-Gelelektrophorese können diese beiden, in großer Menge vorliegenden, Proteine andere Proteine mit dem identischen isoelektrischen Punkt und Molekulargewicht verdecken. Durch das Entfernen von Albumin und IgG wird die Darstellung dieser, in kleinerer Menge vorhandenen Proteine im Gel ermöglicht. Der „Aurum Serum Protein Mini Kit“ beinhaltet Mikro-Bio-Spin-Säulchen, die mit einer Mischung aus Affigel Blue und Affigel Protein A gefüllt sind, und das störende Albumin und IgG zu theoretisch 90 % binden und entfernen können.

3.3.1 Vorbereitung der Säule:

Der „Aurum Serum Protein Mini Kit“ wurde aus dem Kühlschrank genommen und alle Aktionen auf Eis ausgeführt.

Zuerst wurde die Säule für 5 min in ein Teströhrchen gestellt, damit sich das Säulenfüllmaterial absetzen konnte. Danach konnte der Deckel abgenommen und die Spitze der Säule abgebrochen werden, anschließend wurde die Säule wieder ins Teströhrchen zurück gestellt, um den *gravity flow* zu starten. Nachdem keine Flüssigkeit mehr sichtbar war, wurde die Säule zweimal mit 1 ml Binding Buffer gewaschen, indem nacheinander 1 ml auf die Säule gegeben wurde und der Puffer restlos mittels *gravity flow* die Säule passieren konnte. Nach dem letzten Waschen wurde die Säule in ein leeres 2,0 ml Sammelgefäß überführt, und für 20 s bei 10 000 x g zentrifugiert, um das Säulenfüllmaterial von restlicher Flüssigkeit zu befreien. Anschließend wurde die Säulenspitze wieder verschlossen und die Säule in ein frisches Sammelgefäß gestellt.

3.3.2 Bindung und Aufreinigung der Probe:

In einem separaten Eppendorfreaktionsgefäß wurden 60 µl der aufzureinigenden Liquorprobe mit 140 µl Binding Buffer gemischt. Anschließend wurde die gesamten 200 µl auf die Säule gegeben und die Säule selbst vorsichtig geschüttelt, um eine gute Verteilung der Probe zu erreichen. Die Säule wurde daraufhin 5 min stehen gelassen und noch zwei weitere Male (nach 5 und nach 10 min) vorsichtig geschüttelt, um eine möglichst vollständige Abtrennung von IgG und Albumin zu erzielen.

3.3.3 Sammeln der aufgereinigten Probe:

Nach Entfernen des Säulenspitzenverschlusses wurde die Säule in ein sauberes Eppendorfreaktionsgefäß gestellt und nochmals für 20 s bei 10 000 x g zentrifugiert. Die Albumin- und IgG-aufgereinigte Probe wurde im Eppendorfreaktionsgefäß gesammelt und gelagert.

3.3.4 Lagerung:

Bis zur weiteren Verwendung wurden die aufgereinigten Liquores bei -80 °C weggefroren.

3.4 Proteinbestimmung

3.4.1 BSA-Stammlösungen:

400 µg/ml Stammlösung: 4 mg BSA wurden in 10 ml ddH₂O gelöst

100 µg/ml Stammlösung: 1 ml aus der 400 µg/ml Stammlösung wurden in 3 ml ddH₂O gelöst

3.4.2 Pipettierschema für Standardverdünnungsreihe:

BSA-Konzentration (µg/ml)	µl aus BSA-Stammlösungen	ddH₂O (µl)
0 (µg/ml)	-	110 µl
20 (µg/ml)	40 µl aus 100 µg/ml	160 µl
30 (µg/ml)	45 µl aus 100 µg/ml	105 µl
40 (µg/ml)	80 µl aus 100 µg/ml	120 µl
50 (µg/ml)	60 µl aus 100 µg/ml	60 µl
60 (µg/ml)	120 µl aus 100 µg/ml	80 µl
80 (µg/ml)	160 µl aus 100 µg/ml	40 µl
100 (µg/ml)	200 µl aus 400 µg/ml	600 µl

3.4.3 Roti®-Quant-Verdünnung:

2 ml Roti®-Quant (5x) wurden mit 5,5 ml ddH₂O gemischt

3.4.4 Durchführung:

Es wurden in Doppelbestimmung je 50 µl der Standardverdünnungsreihe auf eine 96-well Mikrotiterplatte pipettiert, ebenso die Patientenproben in Einfachbestimmung. Danach wurden 200 µl der Roti®-Quant-Verdünnung zu den vorgelegten Standards und Proben gegeben und die Mikrotiterplatte für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die OD wurde anschließend mit folgenden Parametern mit Hilfe eines ELISA-Messgerätes bestimmt:

Messfilter: 620 nm

Referenzfilter: 405 nm

3.5 Protein-Präzipitierung

Die Löslichkeit eines Proteins kann aufgrund gebundener Komponenten verschlechtert sein. Ein Entfernen dieser Komponenten wiederum verbessert die Löslichkeit, was sich in einer besseren Darstellung des Proteins im Gel zeigt. Die Präzipitierung mittels 2D Clean-Up Kit trennt Proteine von Verunreinigungen wie Salzen, Lipiden, Nukleinsäuren und Detergenzien, wodurch auch die isoelektrische Fokussierung (IEF) und die Farbstoffmarkierungseffizienz verbessert werden.

Während der ganzen Präzipitierung wurden die Proben auf Eis gelagert und der Waschpuffer mindestens 60 min vor Beginn bei -20 °C gekühlt. Des Weiteren wurde das Eppendorfreaktionsgefäß, in dem die Probe präzipitiert wurde, immer nur mit dem Deckelscharnier nach außen in die Zentrifuge platziert, um das Proteinpellet besser sichtbar zu machen.

Zuerst wurden 100 µl der Liquorprobe in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß gegeben, 300 µl Präzipitant dazu pipettiert, durch kurzes Vortexen gut vermischt und anschließend 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurden 300 µl Co-Präzipitant dazugegeben, kurz gevortext und bei 10 000 x g zentrifugiert.

Die überstehende Flüssigkeit wurde vorsichtig, und ohne das entstandene Pellet zu beeinträchtigen, abpipettiert. Das Eppendorfreaktionsgefäß wurde dann ein zweites Mal kurz zentrifugiert und die restliche Flüssigkeit mittels Pipette entfernt.

Im nächsten Schritt erfolgte eine weitere Zugabe von 40 µl Co-Präzipitant. Nach 5 minütiger Inkubation auf Eis wurde das Eppendorfreaktionsgefäß erneut bei 10 000 x g für 5 min zentrifugiert und der Überstand sorgfältig beseitigt. Zum Waschen des Präzipitats wurden 25 µl ddH₂O auf das Pellet pipettiert, 15 s gevortext, anschließend 1 ml Waschpuffer und 5 µl Wash Additive dazu gegeben und nochmals so lange gevortext, bis das Pellet vollständig dispergiert war. Die Proben wurden nun 30 min bei -20°C inkubiert, wobei sie alle 10 min für 30 s gevortext wurden.

Vor der Farbstoffmarkierung wurden die Proben nochmals für 5 min bei 10 000 x g zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abpipettiert, das Proteinpellet kurz luftgetrocknet und anschließend direkt in Farbstoffmarkierungspuffer aufgenommen (s.u.).

Um genügend Proteinmenge für die 2-D DIGE zu erhalten, wurden die zwölf Einzelproben jeder Gruppe gepoolt, wodurch vier große Pools entstanden: RRMS, CIS, Kontrolle-RRMS und Kontrolle-CIS. Aus jedem dieser vier Probenpools konnten anschließend drei Gele gefertigt werden (drei Gele für RRMS und drei Gele für CIS).

3.6 Farbstoffmarkierung

Farbstoffmarkierungspuffer: siehe [2.4.6](#)

Farbstoff-Verdünnungslösung: siehe [2.3.3](#)

3.6.1 Aufnahmen der Proben in Farbstoffmarkierungspuffer:

Zu den jeweiligen Proben wurde auf 2 µg Protein je 1 µl Farbstoffmarkierungspuffer pipettiert (z.B. 14 µl Farbstoffmarkierungspuffer auf 28 µg Protein).

3.6.2 Bildung des Internen Standards (IS):

Der Interne Standard (IS) besteht jeweils zur einen Hälfte aus der Patientenprobe und zur anderen Hälfte aus der alters- und geschlechtsgematchten Kontrollprobe. Dementsprechend wurden je 7 µl aus dem RRMS- bzw. CIS-Pool und 7 µl aus dem Kontrolle-RRMS- bzw. Kontrolle-CIS-Pool zusammenpipettiert.

3.6.3 Farbstoffmarkierung der Probenpools:

Um ein bestmöglichstes Ergebnis zu erreichen, wurden im Experiment 400 µmol Fluoreszenzfarbstoff/ 50 µg Protein eingesetzt. Die Proben wurden mit der errechneten Menge der entsprechenden Farbstoff-Verdünnungslösung versetzt (1,2 µl Farbstoff-Verdünnungslösung auf 14 µl Probenpool), gevortext, kurz zentrifugiert und 30 min im Dunkeln im Rack auf Eis inkubiert. Dabei wurde jeweils ein Versuch wegen der genaueren Auswertung umgekehrt farbstoffmarkiert.

Probenart	Farbstoff - Verdünnungslösung
RRMS/ CIS	Cy 3
Kontrolle-RRMS/ Kontrolle-CIS	Cy 5
Interner Standard (IS)	Cy 2

Zum Stoppen der Reaktion wurden anschließend 3,5 µl Lysin (10 mM) dazupipettiert, gevortext, kurz zentrifugiert und weitere 15 min im Rack auf Eis inkubiert.

Abschließend wurden die Proben zusammenpipettiert (Endvolumen 18,7 µl).

Die Proben wurden entweder sofort weiterverwendet oder bei -20°C gelagert.

3.6.4 Pipettierschemen:

Tabelle 2: Pipettierschema für Proben von RRMS-Patienten (pro Gel)

Abkürzungen: μg = Mikrogramm, μl = Mikroliter, mM = Millimol/ L, RRMS = schubförmig remittierende Multiple Sklerose, IS = Interner Standard

	Proteinmenge [μg]	Proben- volumen [μl]	Farbstoff- Verdünnungs- lösung [μl]	10 mM Lysin [μl]	Endvolumen [μl]
RRMS	28 μg	14 μl	1,2 μl Cy 3	3,5 μl	18,7 μl
Kontrolle- RRMS	28 μg	14 μl	1,2 μl Cy 5	3,5 μl	18,7 μl
IS	14 μg RRMS 14 μg Kontrolle- RRMS	7 μl RRMS 7 μl Kontrolle- RRMS	1,2 μl Cy 2	3,5 μl	18,7 μl

Tabelle 3: Pipettierschema für Proben von CIS-Patienten (pro Gel)

Abkürzungen: μg = Mikrogramm, μl = Mikroliter, mM = Millimol/ L, CIS = klinisch isoliertes Syndrom, IS = Interner Standard

	Proteinmenge [μg]	Proben- volumen [μl]	Farbstoff- Verdünnungs- lösung [μl]	10 mM Lysin [μl]	Endvolumen [μl]
CIS	28 μg	14 μl	1,2 μl Cy 3	3,5 μl	18,7 μl
Kontrolle- CIS	28 μg	14 μl	1,2 μl Cy 5	3,5 μl	18,7 μl
IS	14 μg CIS 14 μg Kontrolle-CIS	7 μl CIS 7 μl Kontrolle- CIS	1,2 μl Cy 2	3,5 μl	18,7 μl

3.7 Rehydratisierung mit Probe

Der bei -20°C gelagerte Fokussierpuffer (Lysepuffer) wurde aufgetaut und mit 2 mg DTT pro 500 μl Fokussierpuffer versetzt. Für einen 18 cm langen IPG-Streifen wurden die farbstoffmarkierten Proben mit diesem Puffer auf ein Gesamtvolumen von 340 μl aufgefüllt.

Die Rehydratisierung erfolgte mit der Protean IEF Cell von Bio-Rad. Es wurden 340 μl Probe in einen entsprechenden Tray pipettiert und der IPG-Streifen mit der Gelseite nach unten aufgelegt. Durch vorsichtiges Hin- und Herbewegen wurde die Gelseite vollständig und luftblasenfrei mit Flüssigkeit benetzt, und der Streifen zuletzt vollständig mit 1,5 ml Dry Strip Cover Fluid überschichtet. Zum besseren Eintreten, auch größerer Proteine, erfolgte die Rehydratisierung aktiv für ca. 20 h bei 50 V.

3.8 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die IEF dient der Auftrennung der Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt. Um den Salzgehalt in den Proben während der IEF nochmals zu minimieren, wurden nach Beendigung der Rehydratisierung pro IPG-Streifen je 2 Filterpapiere mit ddH₂O befeuchtet und an jedem Pol zwischen Streifen und Elektrodendraht geschoben (Streifen – Filterpapier – Draht). Nach Einsetzen des Trays in die Protean IEF Cell wurde das Fokussierprotokoll gestartet. Die IEF erfolgte bei einer konstanten Temperatur von 20°C .

Fokussierprotokoll:

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

3.9 Vertikale Gelelektrophorese

Die vertikale Gelelektrophorese dient der Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht.

3.9.1 Herstellung der Gele:

Um Verunreinigungen zu vermeiden, wurden die Glasplattensätze, zwischen die die Gele gegossen wurden, vor jeder Verwendung mit Baktolin gewaschen, mit ddH₂O gründlich abgespült und luftgetrocknet.

APS-Lösung: 1 g APS wurde mit ddH₂O auf 10 ml aufgefüllt

Temed-Lösung: 100 µl Temed wurden mit 900 µl ddH₂O gemischt

Ansatz für sechs 10%ige Acrylamidgele:

1,5 M Tris-HCl Puffer, pH 8,8	150 ml
ddH ₂ O	237 ml
10% SDS	6 ml
Bis-Acrylamid (30%ig)	200 ml

⇒ gut gemischt, anschließend dazugegeben:

APS-Lösung 6ml

Temed-Lösung 1ml

Die Gele wurden mit Hilfe eines Trichters in die vorbereitete Plattengießeinheit gegossen, mit einer dünnen Lage Butanol überschichtet und 60 min zum Auspolymerisieren bei Raumtemperatur unter einem Abzug stengelassen. Anschließend wurde das Butanol abgegossen und die Gele (in den Glasplatten) mit ddH₂O gut abgewaschen. Um die Gele vor Austrocknung zu schützen wurden sie bis zur weiteren Verwendung in feuchte Papiertücher eingeschlagen und bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

3.9.2 Verdünnung des 10x SDS Elektrophoresepuffers:

1x SDS Elektrophoresepuffer: 500 ml 10x SDS-Elektrophoresepuffer wurden mit ddH₂O auf 5 l aufgefüllt

2x SDS Elektrophoresepuffer: 200 ml 10x SDS-Elektrophoresepuffer wurden mit ddH₂O auf 1 l aufgefüllt

3.9.3 Herstellung von Marker und Agaroselösung:

Agarose: 125 mg Agarose wurden in 25 ml 1x SDS Elektrophoresepuffer gelöst, anschließend 10 µl Bromphenolblau (0,25% (w/v) in Tris/HCl) dazugegeben und in der Mikrowelle aufgeköcht.

Marker: 10 µl des RPN 800 wurden auf ein Filterpapier pipettiert und bei Raumtemperatur zur Trocknung liegen gelassen.

3.9.4 Äquibrierung des IPG-Streifens:

Für die zweite Dimension ist es sehr wichtig, die IPG-Streifen zu äquibrieren. Dabei handelt es sich um eine Reduktions- und Alkylierungsreaktion der Proteine, die in zwei Schritten durchgeführt wird.

DTT-Puffer: 100 mg DTT wurden in 10 ml SDS Äquibrierungspuffer gelöst

Iodacetamid-Puffer: 250 mg Iodacetamid wurden in 10 ml SDS Äquibrierungspuffer gelöst

Jeder IPG-Streifen wurde nach der IEF zuerst in 2x SDS Elektrophoresepuffer gereinigt, danach in einem Röhrchen erst in 10 ml DTT-Puffer, danach in 10 ml Iodacetamid-Puffer für je 15 min geschwenkt.

3.9.5 Aufbringen und Fixierung von IPG-Streifen und Marker:

Nach der Äquilibrierung wurde der IPG-Streifen zur Reinigung kurz in 1x SDS Elektrophoresepuffer geschwenkt und mit einem Spatel mittig auf Gelkontakt geschoben. Nach dem Aufbringen des IPG-Streifens wurde das mit Marker getränkte Filterpapier direkt am Pluspol des Streifens, ebenfalls mit dem Spatel, auf das Gel geschoben. Abschließend wurde die auf ca. 60°C erkaltete Agaroselösung vorsichtig und luftblasenfrei über Streifen und Marker geschichtet, und zur Aushärtung stehengelassen.

3.9.6 Elektrophorese und anschließende Fixierung der Gele:

Das Ettan DALT Elektrophoresesystem besteht aus der Ettan DALT_{six} Elektrophoresis Unit, einem Stromversorgungsgerät und einer zirkulierenden Kühlanlage. Es erlaubt den Lauf mit bis zu sechs Gelen gleichzeitig. Wird ein Lauf mit weniger als sechs Gelen gestartet, so werden die unbesetzten Plätze der Kammer mit Kunststoffplatten aufgefüllt.

Nach Einbau der Gele, Auffüllen der unteren Kammer mit 1x SDS Elektrophoresepuffer und der oberen Kammer mit 2x SDS Elektrophoresepuffer sowie Anschließen des Kühlaggregates (20°C), wurde der Lauf bei einer Leistung von 38 W gestartet. Der Lauf wurde ca. 1 cm vor Gelende gestoppt, die Gele aus den Plattensätzen befreit und für 60 min fixiert.

<u>Fixierlösung:</u>	Essigsäure	100 ml
	Ethanol	300 ml
	ddH ₂ O	600 ml

Bis zum Scannen wurden die Gele anschließend in 1%iger Essigsäurelösung in Folie eingeschweißt und bei 4°C aufbewahrt.

3.10 Scannen und statistische Auswertung

3.10.1 Scannen:

Die fixierten Gele wurden mit dem Typhoon™ 9400 Variable Mode Imager mit drei verschiedenen Lasern (Anregungswellenlänge/ Emmissionsfilter) gescannt:

Cy 2 (RRMS bzw. CIS):	488/ 520 nm
Cy 3 (Kontrolle-RRMS bzw. Kontrolle-CIS):	532/ 580 nm
Cy 5 (IS):	633/ 670 nm

3.10.2 Statistische Auswertung:

Die Auswertung erfolgte mittels der DeCyder Differential Analysis Software Version 5.0 (DeCyder DIA), welche die gleichzeitige Detektierung der verschiedenen, mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Proben im selben Gel erlaubt.

Diese Software nutzt eine *log transformation* der gemessenen Volumenverhältnisse einzelner Spots, um daraus ein Häufigkeitshistogramm zu erstellen. Ausgehend von seinem Hochpunkt wird diesem Histogramm eine Normalverteilung so zugeordnet, dass der Hochpunkt dieser normalverteilten Modelkurve auf der Nullstelle der x-Achse liegt. Durch die entstandene Kurve werden Proteinspots mit unverändertem Volumen dargestellt. Im nächsten Schritt wird, basierend auf dieser normalverteilten Modelkurve, die zweifache Standardabweichung abgeleitet. Liegt eine Normalverteilung vor, fallen 95 % der erhaltenen Werte in diesen definierten Bereich. Für die von der Modelkurve abweichenden Werte liefert die Software letztendlich, ab einer mindestens 1,5-fachen Volumendifferenz (Regulationsfaktor), einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Spots aus kranker Probe und Kontrolle. Da es sich hierbei allerdings um einen semiquantitativen Ansatz handelt, können keine absoluten Werte angeführt werden.

Der Interne Standard (IS) wurde zum einen benutzt, um die Unterschiede zwischen kranken Proben und Kontrollproben innerhalb eines Gels möglichst exakt herauszuarbeiten, indem jeweils Cy 2 und Cy 3 bzw. Cy 2 und Cy 5 miteinander verglichen wurden. Des Weiteren konnten bei dem Vergleich zwischen den drei Gelen derselben Gruppe mit Hilfe des Internen Standards (IS) die zwischen den einzelnen Gelen bestehenden Varianzen, bedingt durch die Gel-zu-Gel Variationen, minimiert werden. Dies ermöglicht die Messung selbst sehr kleiner Proteinmengendifferenzen mit großer Zuverlässigkeit.

3.11 Silberfärbung (kompatibel mit Massenspektrometrie)

3.11.1 Fixierung:

Ethanol 400 ml

Essigsäure 100 ml

⇒ mit ddH₂O auf 1 Liter aufgefüllt

Die Gele wurden in einer Wanne für 60 min geschwenkt, danach in frischer Lösung noch ein zweites Mal für 60 min.

3.11.2 Sensitivierung:

Ethanol 300 ml

Na-Thiosulfat 2 g

Na-Acetat 68 g

⇒ mit ddH₂O auf 1 Liter aufgefüllt

Die Gele wurden in einer Wanne wiederum für 60 min geschwenkt.

3.11.3 Waschen:

Die Gele wurden 5 x 8 min lang in je 1 Liter frischem ddH₂O geschwenkt.

3.11.4 Silberreaktion:

Silbernitrat 2,5 g

Formaldehyd (37%) 400 µl

ddH₂O 1 l

Erst wurden Silbernitrat und Wasser gut gemischt, dann das Formaldehyd zugegeben und die Gele für 60 min geschwenkt.

3.11.5 Waschen:

Die Gele wurden 4 x 1 min lang in je 1 Liter frischem ddH₂O geschwenkt.

3.11.6 Entwickeln:

Na-Carbonat	25 g
Formaldehyd	700 µl
ddH ₂ O	1 l

Erst wurden Na-Carbonat und H₂O gut gemischt, dann Formaldehyd dazu zugegeben und die Gele so lange in der Entwicklerlösung geschwenkt bis die gewünschte Farbintensität erreicht war.

Zum Stoppen der Entwicklungsreaktion wurden die Gele anschließend für mind. 45 min in der Stopplösung geschwenkt.

Na-EDTA	16 g
ddH ₂ O	1 l

3.11.7 Lagerung:

Zur Lagerung wurden die Gele in 10 ml einer 10 % Glycerol/ H₂O-Lösung eingeschweißt und bei 4°C bis zum Spot-Verdau aufbewahrt.

3.12 Massenspektrometrische Auswertung

Die Massenspektrometrische Auswertung wurde von der Firma TOPLAB GmbH, Martinsried vorgenommen.

3.12.1 Trypsin-Verdauung:

Die für interessant befundenen Proteine wurden manuell aus dem Gel gepickt, die Gelstücke in verschiedene Eppendorfreaktionsgefäße verbracht und dreimal mit 100 µl einer 50 mM $(\text{NH}_4)_2\text{HCO}_3$ Lösung gewaschen. Danach wurden sie 5 min in 50 µl 100%igem Acetonitril dehydratisiert und die Eppendorfreaktionsgefäße nach anschließender Entfernung des Überstands für 10 min offen stehen gelassen. Im nächsten Schritt wurde 1 µl einer Protease-Lösung (0,05 µl/µg Trypsin in 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{HCO}_3$) hinzugefügt. Nach einer Zugabe von 5 µl NH_4HCO_3 – Puffer (10 mM in 30% Acetonitril) für 30 min wurden die Gelstücke bei einer Temperatur von 37°C über Nacht verdaut.

3.12.2 Matrix-assisted laser desorption/ Ionisation time-of-flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS):

Für die MALDI-TOF-MS Analyse wurden 0,1-0,5 ml Trypsin-Peptidlösungen auf die, aus rostfreiem Stahl bestehenden, MALDI Probenplatten gegeben und nach 5 min mit DHBS-Matrix (einer Mischung aus 20 mg 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHBS) mit 1 ml 20% acetonitril/ 0,1% TFA und 20 mg 2-hydroxy-5-methoxybenzoic acid (HMB) in 1 ml acetonitril/ 0,1% TFA im Verhältnis 9:1) im Verhältnis 1:1 gemischt.

Die Peptidmischungen wurden mit einem Voyager DE-STR MALDI-TOF-Massenspektrometer gemessen. Jedes Spektrum wurde mittels der monoisotopisch protonierten Massen der durch Trypsin verdauten Peptide, als Eichreihe für die zu messenden Probenmassen, intern kalibriert.

3.12.3 Proteinidentifizierung:

Die gemessenen m/z Werte zwischen 700 und 4200 wurden an ProFound, Version 2004.01.26 zur Spektrenanalyse (Peptide Mass Fingerprinting) übermittelt. Die ermittelten Spektren wurden anhand der unabhängigen Proteindatenbank National Centre for Biotechnology Information (NCBI) durch ProFound analysiert. Zur Datenbanksuche wurde ein Massenbereich von 5-200 kDa und ein Bereich für den isoelektrischen Punkt von pH 2-14 angegeben. Als Spezies wurde Homo sapiens und als Massentoleranz 100 ppm gewählt.

4 Ergebnisse

Es wurden pro Probenpool je drei 2D-DIGE-Gele angefertigt, um Unterschiede im Liquorproteom zwischen altersgematchten Kontrollproben und an RRMS und CIS erkrankten Patienten zu untersuchen.

Dabei wurden die Liquores der verschiedenen Unterformen und der dazugehörigen Kontrollproben zuerst aufbereitet, farbstoffmarkiert und anschließend mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Interessante Spots, die mindestens einen zweifachen Volumenunterschied im Vergleich zu den Kontrollproben zeigten, wurden nach Silberfärbung aus den Gelen isoliert, einer Trypsin-Verdauung unterzogen, sowie mittels Massenspektrometrie und anschließendem Vergleich mit einer Referenzdatenbank identifiziert (im Detail siehe auch Tabelle 4 und 5).

Es zeigten sich bei beiden Gruppen deutliche Unterschiede im Liquorproteomprofil von RRMS und CIS im Vergleich zu altersgematchten Kontrollproben, auf welche im Folgenden näher eingegangen werden soll.

4.1 Schubförmig remittierende Multiple Sklerose (RRMS)

4.1.1 Ergebnis nach Einscannen durch den Thyphoon™ Variable Mode Imager:



Abbildung 4:

Original 2D-DIGE (zweidimensionale „difference in-gel electrophoresis“) Gel in einer Image Overlay-Darstellung von gepoolten RRMS- (schubförmig remittierende Multiple Sklerose) und alters- sowie geschlechtsgematchten Kontrollproben, sowie dem Internen Standard. Farblich zur Darstellung kommen die gefundenen, mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Proteine.

Die weißen Spots demonstrieren in vermutlich gleichen oder sehr eng beisammen liegenden Volumina vorhandene Proteine in allen drei Pools. Abweichende Farben deuten auf Volumenunterschiede zwischen den Pools hin. Um diese objektivieren und zuordnen zu können, muss die weitere Auswertung erfolgen.

Abkürzungen: 2D-DIGE = zweidimensionale difference in-gel electrophoresis, RRMS = schubförmig remittierende Multiple Sklerose

4.1.2 RRMS (schubförmig remittierende Multiple Sklerose)-Gel-Auswertung mittels DeCyder Differential Analysis Software:

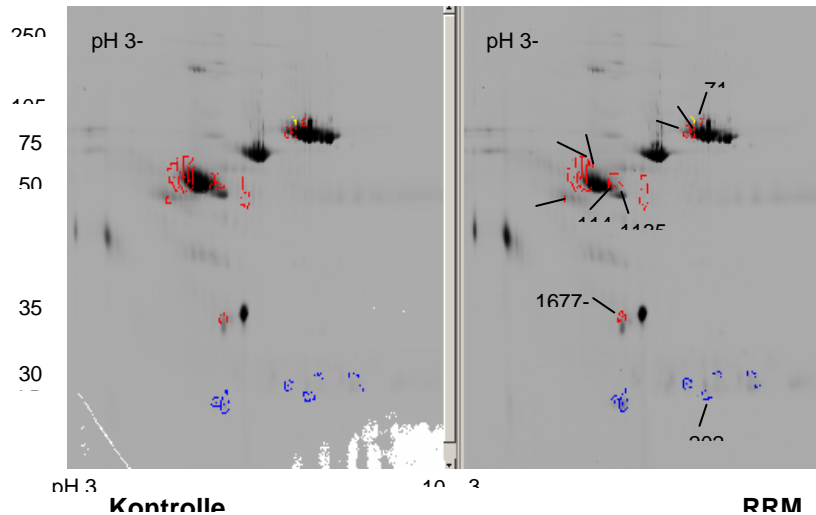


Abbildung 5:

Ausgewertetes 2D-DIGE (zweidimensionale „difference-in-gel-electrophoresis“) Gel aus Liquorproben von an RRMS (schubförmig remittierende Multiple Sklerose) erkrankten und alters- sowie geschlechtsgematchten Kontrollen. Nur Spots mit mehr als zweifachem Volumenunterschied werden dargestellt. Hochregulierte Spots sind blau, herabregulierte Spots rot umkreist.

Umkreiste Spots ohne Ziffer zeigten zwar eine Hoch- bzw. Herabregulation, konnten jedoch massenspektrometrisch aufgrund zu geringer Proteinmenge nicht identifiziert werden. Gelb umkreiste Spots sind softwarebedingt, hervorgerufen durch das automatische Auswählen eines beliebigen Spots im Darstellungsmodus.

Abkürzungen: 2D-DIGE = zweidimensionale difference in-gel electrophoresis, RRMS = schubförmig remittierende Multiple Sklerose, kDa = KiloDalton, pH = potentia Hydrogenii

In drei Gelen aus gepoolten Liquores von Patienten mit RRMS und alters- sowie geschlechtsgemachten Kontrollproben wurden insgesamt 1894 Proteinspots gefunden. Abgesehen von 1074 Proteinspots mit gleichen Volumina in RRMS und gemachten Kontrollproben, waren im RRMS-Pool 104 Proteinspots herunter- und 716 Spots hochreguliert. Von diesen wiesen elf Proteinspots einen mindestens zweifachen Volumenunterschied auf. Diese elf Spots konnten mit Hilfe der Referenzdatenbank identifiziert und sechs verschiedenen Proteinen zugeordnet werden. Das Immunglobulin kappa chain NIG 93 precursor protein wurde als hochreguliert identifiziert, wohingegen Transferrin-Isoformen, Serine proteinase Inhibitor-Isoformen, Alpha 2-Heremans-Schmid Glycoprotein (Fetuin), Apolipoprotein E und Transthyretin herunterreguliert waren.

4.1.3 Dreidimensionale Spotdarstellung am Beispiel eines Serin Proteinase Inhibitors:

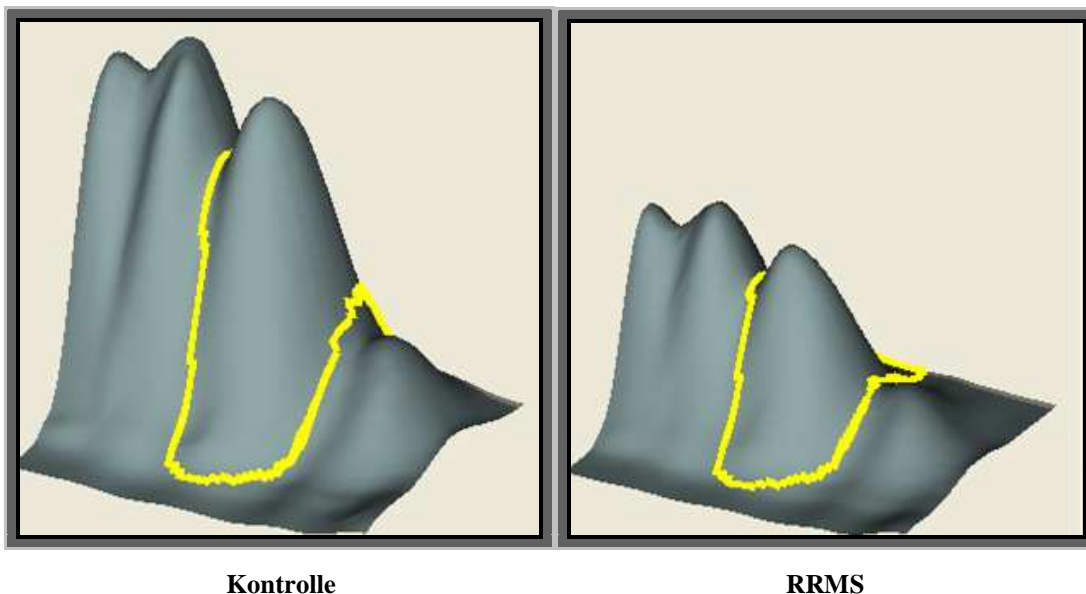


Abbildung 6:

Dreidimensionale Darstellung der unterschiedlichen Spotvolumina eines Serin Proteinase Inhibitors in alters- sowie geschlechtsgemachter Kontrolle (links) und RRMS (schubförmig remittierende Multiple Sklerose, rechts). Die Gel-Auswertung ergab eine 2,17-fache Herabregulation des Proteinspots, der hier durch die gelbe Markierung umkreist wird.

Abkürzungen: RRMS = schubförmig remittierende Multiple Sklerose

4.1.4 Identifizierte Proteine bei schubförmig remittierender Multipler Sklerose (RRMS):

Tabelle 4: Massenspektrometrisch identifizierte Proteine bei RRMS

Abkürzungen: Nr. = Nummer, pH = potentia Hydrogenii, ID = Identity, RRMS = schubförmig remittierende Multiple Sklerose

Spot-Nr.	Protein	GenBank ID	Regulations-Faktor
715	Transferrin	4557871	- 2,22
815	Transferrin	31415705	- 2,32
816	Transferrin	31415705	- 2,25
1105	Serin Proteinase Inhibitor	54965780	- 2,45
1131	Serin Proteinase Inhibitor	50363219	- 2,17
1135	Serin Proteinase Inhibitor	15080499	- 2,19
1145	Serin Proteinase Inhibitor	54695780	- 2,73
1200	Alpha 2-Heremans-Schmid Glycoprotein (Fetuin)	4502005	- 2,04
1677-1	Apolipoprotein E	178853	- 2,2
1677-2	Transthyrethin	387000	- 2,2
2028	Ig kappa chain NIG 93 precursor	7438712	+ 2,32

4.2 Klinisch isoliertes Syndrom (CIS)

4.2.1 Ergebnis nach Einscannen durch den Thyphoon™ Variable Mode Imager:



Abbildung 7:

Original 2D-DIGE (zweidimensionale „difference-in-gel-electrophoresis“) Gel in einer Image Overlay- Darstellung von gepoolten CIS- (klinisch isoliertes Syndrom) und alters- sowie geschlechtsgematchten Kontrollproben, sowie dem Internen Standard. Farblich zur Darstellung kommen die gefundenen, mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Proteine.

Die weißen Spots demonstrieren in vermutlich gleichen oder sehr eng beisammen liegenden Volumina vorhandene Proteine in allen drei Pools. Abweichende Farben deuten auf Volumenunterschiede zwischen den Pools hin. Um diese objektivieren und zuordnen zu können, muss die weitere Auswertung erfolgen.

Abkürzungen: 2D-DIGE = zweidimensionale difference in-gel electrophoresis,
CIS = klinisch isoliertes Syndrom

4.2.2 CIS (klinisch isoliertes Syndrom)-Gel-Auswertung mittels DeCyder Differential Analysis Software:

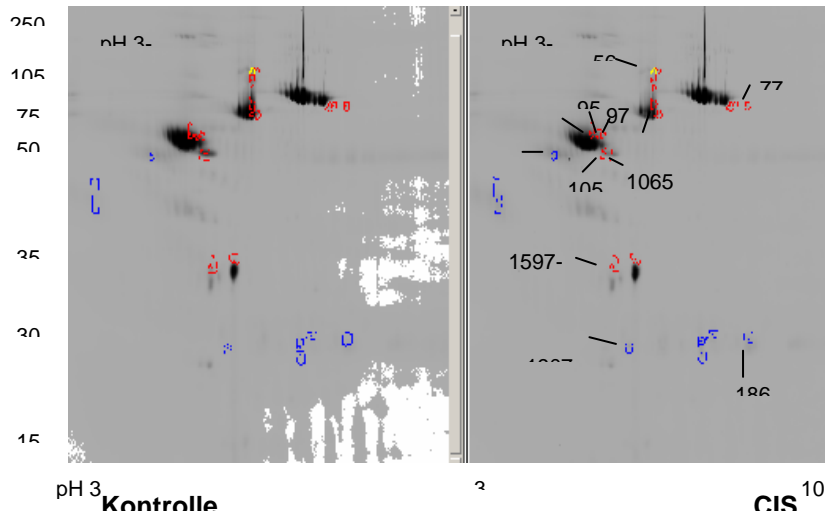


Abbildung 8:

Ausgewertetes 2D-DIGE (zweidimensionale „difference-in-gel-electrophoresis“) Gel aus Liquorproben von an CIS (klinisch isoliertes Syndrom) erkrankten und alters- sowie geschlechtsgematchten Kontrollen. Nur Spots mit mehr als zweifachem Volumenunterschied werden dargestellt. Hochregulierte Spots sind blau, herabregulierte Spots rot umkreist.

Umkreiste Spots ohne Ziffer zeigten zwar eine Hoch- bzw. Herabregulation, konnten jedoch massenspektrometrisch aufgrund zu geringer Proteinmenge nicht identifiziert werden. Gelb umkreiste Spots sind softwarebedingt, hervorgerufen durch das automatische Auswählen eines beliebigen Spots im Darstellungsmodus.

Abkürzungen: 2D-DIGE = zweidimensionale difference in-gel electrophoresis, CIS = klinisch isoliertes Syndrom, kDa = kiloDalton, pH = potentia Hydrogenii

In drei Gelen mit gepoolten Liquorproben von CIS-Patienten und Kontrollen wurden insgesamt 2148 Proteinspots gefunden. Abgesehen von 1353 Proteinspots mit gleichen Volumina bei CIS und den gematchten Kontrollproben, waren im CIS-Pool 127 Proteinspots herunter- und 668 Spots hochreguliert. Betrachtet man nur die Spots mit einem mindestens zweifachen Volumenunterschied, blieben noch dreizehn Proteinspots übrig. Diese dreizehn Spots konnten neun verschiedenen Proteinen zugeordnet werden. IgG kappa chain und Proapo-A1 waren hochreguliert. Im Gegensatz dazu waren elf andere Proteine herunterreguliert, die als Serumalbumin precursor, Komplementfaktor 3, Serine proteinase inhibitor-Isoformen, Vitamin D-binding Protein-Isoformen, Translation initiation factor eIF-4-gamma, Apolipoprotein E precursor und Transthyretin identifiziert werden konnten.

4.2.3 Dreidimensionale Spotdarstellung am Beispiel von Proapo-A1:

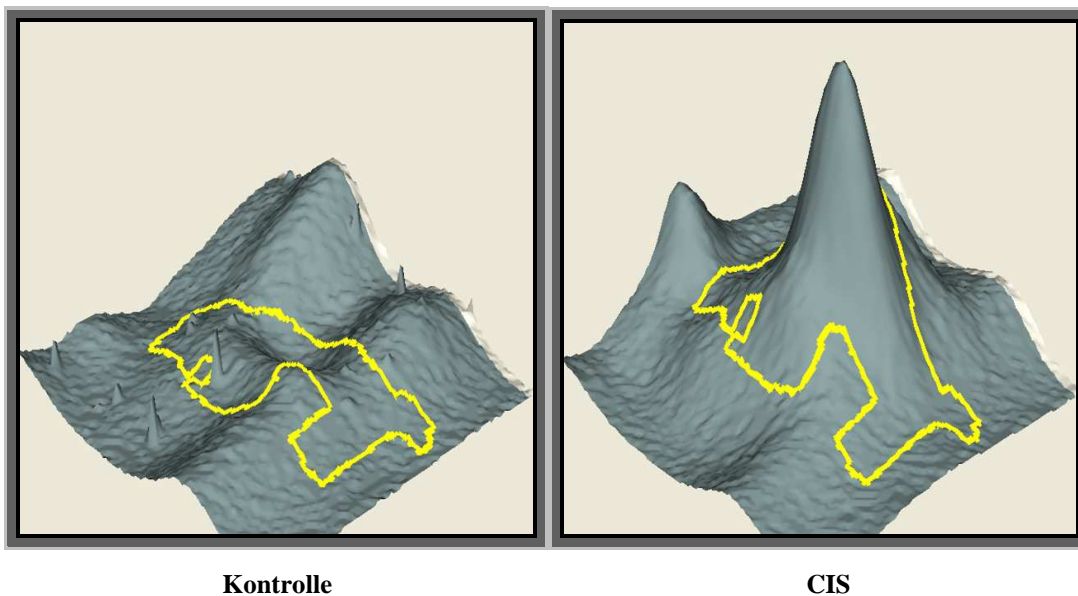


Abbildung 9:

Dreidimensionale Darstellung der unterschiedlichen Spotvolumina von Proapo-A1 in alters- und geschlechtsgemachter Kontrolle (links) und CIS (klinisch isoliertes Syndrom, rechts dargestellt). Die Gel-Auswertung ergab eine 8,93-fache Hochregulation des Proteinspots, der hier durch die gelbe Markierung umkreist wird.

Abkürzungen: CIS = klinisch isoliertes Syndrom

4.2.4 Identifizierte Proteine beim klinisch isolierten Syndrom (CIS):

Tabelle 5: Massenspektrometrisch identifizierte Proteine bei CIS

Abkürzungen: Nr. = Nummer, pH = potentia Hydrogenii, ID = Identität, CIS = klinisch isoliertes Syndrom

Spot-Nr.	Protein	GenBank ID	Regulations-Faktor
564	Serum albumin precursor	6013427	- 2,11
778	Komplementfaktor 3	40786791	- 2,16
842	Albumin precursor	4502027	- 2,36
918	Serin Proteinase Inhibitor	15080499	- 2,07
956	Serin Proteinase Inhibitor	54965780	- 2,07
976	Serin Proteinase Inhibitor	50363217	- 2,29
1058	Vitamin D-binding Protein	34785355	- 2,12
1065	Vitamin D-binding Protein	34785355	- 2,12
1079	Translation initiation factor eIF-4-gamma	510307	- 2,07
1597-1	Apolipoprotein E precursor	4557325	- 2,35
1597-2	Transthyretin	4507725	- 2,35
1867	IgG kappa chain	4176418	+ 2,26
1907	Proapo-A1	178777	+ 8,93

5 Diskussion

5.1 Allgemeines

5.1.1 Biomarkerentwicklung:

Die Entdeckung und Entwicklung von Biomarkern bei der Multiplen Sklerose ist von großer Bedeutung, da diese Surrogat-Marker sowohl die Krankheitsaktivität als auch den Krankheitsverlauf darstellen können. Dabei liegt das Hauptaugenmerk weniger auf der Diagnosestellung, vielmehr ist die Notwendigkeit von Biomarkern, welche die krankheitsspezifische Pathophysiologie reflektieren, z.B. für die Erforschung von individuellen Behandlungsmethoden essentiell.

Einige prozessspezifische Marker, z.B. für axonalen Schaden und Demyelinisierung, konnten bereits gefunden werden [32, 51, 61, 87]. Diese Prozessmarker allerdings sind jedoch weder krankheitsspezifisch, noch lassen sie Rückschlüsse auf die Pathogenese der Erkrankung zu. Es existiert also bislang noch kein pathognomonischer Biomarker für die MS, der mit den bisher zur Verfügung stehenden Methoden gefunden werden konnte, oder der für den Routinegebrauch geeignet ist. Deshalb kann die Suche und Entdeckung von Biomarkern durch den Gebrauch von unvoreingenommenen Methoden wie Proteomics unterstützt werden [9].

5.1.2 Aktueller Wissensstand und Innovation durch 2D-DIGE:

Über eine kleine Anzahl von 2D-Liquorproteomanalysen von Patienten mit Multipler Sklerose und nichtentzündlichen Erkrankungen, bei denen LC MS/MS (Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry) und ESI MS/MS (Elektrospray-Ionisation/ Mass Spectrometry) zur Anwendung kamen, wurde bereits in der Vergangenheit berichtet [25, 38, 94]. Die Resultate bezüglich identifizierter, spezifischer Proteine sind jedoch unbeständig. Dies hängt höchstwahrscheinlich mit Reproduzierbarkeitsproblemen der klassischen 2D-Gel-Analyse zusammen, bei der alle angefertigten Gele miteinander verglichen werden. Mögliche Fehlerquellen könnten dabei in der Durchführung mit unterschiedlichen Rahmenbedingungen liegen, wie z.B. Elektrophorese oder Färbung der verschiedenen Gele zu unterschiedlichen Zeitpunkten, Durchführung mit Gelen aus unterschiedlicher Produktion, oder Abweichungen im Umgang mit den Proben bei einem oder mehreren Gelen [46, 85].

Zur Überwindung dieser Probleme wurde die „2D difference in-gel electrophoresis“ (2D-DIGE) Technologie benutzt, welche eine simultane Auftrennung mehrerer Proben gleichzeitig in einem Gel erlaubt. Dadurch treten Spot-Variationen zwischen den unterschiedlichen Gelen (z.B. verursacht durch Probenverlust bei der Rehydratisierung) nicht nur für einen einzelnen Spot, sondern immer für alle Spots eines ganzen Gels gleichzeitig auf. Ein weiterer Vorteil liegt in einer Reduktion der Anzahl benötigter Gele. Um ferner die Reproduzierbarkeit zu erhöhen, wurden in unserem 2D-DIGE-Ansatz pro Krankheit drei Gele aus denselben Probenpools (Krankheit, Kontrolle und Interner Standard) angefertigt, und anschließend der daraus resultierende Mittelwert verwendet.

Zusätzlich wurde ein Interner Standard (IS) benutzt, bestehend aus gleicher Menge an kranker Probe und Kontrollprobe. Er repräsentiert folglich den Durchschnitt aller untersuchten Proben und stellt dadurch sicher, dass alle in den Proben vorkommenden Proteine im Gel präsent sind. Konsequenterweise wird sich in jedem Gel ein Bild mit einem äußerst ähnlichen Spotmuster zeigen. Dies erhöht die Einfachheit und Sicherheit des gelübergreifenden Spotvergleichs, wodurch zuverlässige Vergleichsmessungen von Spotvolumina über verschiedene Gele hinweg erleichtert werden. Darüber hinaus ermöglicht der IS eine gelinterne Kontrolle bei der Bestimmung der Spotvolumina [4].

Zusammenfassend betrachtet liegt die Schlüsselfunktion der 2D-DIGE Technologie in der Nutzung eines ähnlichen Spotmusters (gebildet aus dem IS) für den gelübergreifenden Spotvergleich, während bei konventionellen Methoden mehrere Gele aus unterschiedlichen Proben miteinander verglichen werden, welche darüber hinaus unterschiedliche Spotmuster zeigen können. Auf diese Weise können leicht mehr als zwei Proben miteinander verglichen werden und experimentell verursachte Unterschiede vermindert werden [4]. Des Weiteren ermöglicht sie die Erkennung feinerer Unterschiede als konventionelle 2D-Gelelektrophorese-Verfahren.

5.1.3 Spezielle Methodenkritik:

Eine grundlegende Einschränkung bei der 2D-Liquorproteomanalyse dieser Arbeit ist nach wie vor die geringe Konzentration der hirnspezifischen Proteine im Liquor, sowie die im Gegensatz dazu reichlich vorhandenen Liquorproteine, welche ganz überwiegend aus dem Blut stammen. Aus diesem Grund wurden Albumin und IgG aus den Proben entfernt und der restliche Liquor aufkonzentriert. Die Proben wurden dabei gleichzeitig entsalzt, da eine zu hohe Salzkonzentration bei der späteren isoelektrischen Fokussierung stören würde. Dies stellt eine potentielle Fehlerquelle dar, da Albumin im menschlichen Körper als Trägerprotein für sehr viele andere Proteine dient. Durch die Entfernung von Albumin kann es daher unbeabsichtigter Weise zu einer Mitentfernung dieser, an Albumin gebundener Proteine kommen [26, 97]. Da kleinere Proteine durch die Anwesenheit von Albumin und IgG jedoch andererseits leicht verdeckt werden, ist eine Entfernung dennoch vorteilhaft [19, 97]. Dies liegt vor allem an den sich gegenüberstehenden Proteinmengen, da die verdeckten Proteine dem Anteil entfernter, Albumin-gebundener Proteine zahlenmäßig überlegen sind [19]. Aufgrund der resultierenden, stark verringerten Proteinmenge im Liquor, und um außerdem möglichst viele interindividuelle Unterschiede (Heterogenität) im Liquorproteom von MS-Patienten zu minimieren [93], wurden die Liquorproben der Krankheitsgruppen sowie der Kontrollgruppen gepoolt.

Trotz der zweidimensionalen Auftrennung können des Weiteren zwei Spots mit annähernd gleichem Molekulargewicht und isoelektrischem Punkt übereinander liegen. Dies resultiert in einer Volumenzunahme des Spots, wobei jedoch gewöhnlich eines der Proteine dominiert. Die Massenspektrometrie kann dieses Problem heutzutage zwar bereits gut erkennen und die verschiedenen Spots differenzieren, Fehler dieser Art können allerdings trotzdem nicht ausgeschlossen werden [19, 85]. An dieser Stelle könnte eine weitere Auftrennung im betroffenen pH-Bereich weiteren Aufschluss geben [85].

Ein zusätzliches Problem stellt das Liquorprofil an sich dar, das sich bei jedem Menschen interindividuell merklich unterscheidet. Aber auch das intraindividuelle Profil (z.B. beim Vergleich zweier Messungen, bei denen Proben des gleichen Patienten im Abstand von zwei Wochen gewonnen wurden) zeigt trotz des kurzen Zeitfensters deutliche Veränderungen.

Dies tritt bei einigen Proteinen (z.B. Apolipoprotein E und Transthyretin, siehe [5.2.2](#) und [5.4.3](#)) deutlicher zu Tage als bei anderen [43], und ist am ehesten auf die intrinsische Aktivität dieser Proteine zurückzuführen. Eine Präselektionierung der zu untersuchenden Patientenproben könnte helfen, allzu großen Variationen vorzubeugen, z.B. die standardisierte Durchführung der Lumbalpunktion innerhalb weniger Tage nach Auftreten der ersten Symptome. Darüber hinaus würden Folgeuntersuchungen dazu beitragen, die Veränderung der Proteine über eine bestimmte Zeitspanne zu objektivieren. Aufgrund der ethischen Bedenken bezüglich wiederholter Lumbalpunktionen bei bereits gesicherter Diagnose ist dies allerdings nur schwer realisierbar.

Liquorproteine stammen zum großen Teil aus dem Blut (z.B. Albumin), indem sie die Blut-Liquor-Schranke entweder über Diffusion oder über aktiven, carriervermittelten Transport passieren. Bei Schrankenfunktionsstörungen kommt es auf dem Boden einer Reduktion des Liquorflusses oder einer gesteigerten Kapillarpermeabilität zu einem vermehrten Einstrom von Proteinen, einhergehend mit einem Anstieg des Albuminquotienten [95]. Bei den Ergebnissen dieser Arbeit konnten Einflussfaktoren wie die Blut-Liquor-Schranke auf die Konzentration von Liquorproteinen nicht berücksichtigt werden, da Proteomanalysen nur einen semiquantitativen Ansatz darstellen. Um dieser Fehlerquelle gerecht zu werden, ist daher eine weitere, quantitative Validierung eines jeden gefundenen Kandidatenproteins unter Berücksichtigung der Blutkonzentration und Schrankenfunktion unabdingbar (im Detail siehe [5.5](#)), um nicht zu vorschnellen und fehlerhaften Interpretationen zu führen. Dies ist insbesondere deshalb von Bedeutung, da bereits über Schrankenfunktionsstörungen infolge Kapillarpermeabilitätserhöhung bei MS-Patienten berichtet wurde [68].

5.1.4 Bisherige Erkenntnisse und Neuentdeckungen der vorliegenden Arbeit:

Die Anzahl aller detektierten Proteinspots betrug bei RRMS 1894 und bei CIS 2148 Einzelspots. Bei allen Spots mit mehr als zweifachem Volumenunterschied zwischen Patientenproben und Kontrollen wurden mittels Massenspektrometrie die dazugehörigen Proteine bestimmt. Die meisten der bestimmten Proteine (Transthyretin, Komplementfaktor 3, Vitamin D-binding Protein, Apolipoprotein E und Transferrin) wurden bereits in vorhergehenden Liquorproteomstudien bei MS-Patienten beschrieben [25, 38].

Darüber hinaus konnten aber auch zwei Proteine identifiziert werden, von denen bislang im Zusammenhang mit MS noch nicht berichtet wurde: Alpha 2-Heremans-Schmid Glycoprotein (Fetuin) und Translation initiation factor eIF-4-gamma. In einigen Fällen wurden Spotgruppen detektiert, in denen die Spots die gleiche Masse und den gleichen isoelektrischen Punkt besitzen, und somit am ehesten Isoformen oder posttranslationale Modifikationen der entsprechenden Proteine darstellen.

5.2 Schubförmig remittierende Multiple Sklerose (RRMS)

Einige Proteine waren nur in RRMS-Proben herunterreguliert, wie Alpha 2-Heremans-Schmid Glycoprotein (Fetuin), Apolipoprotein E und Transferrin-Isoformen.

5.2.1 Alpha 2-Heremans-Schmid Glycoprotein:

Das Alpha 2-Heremans-Schmid Glycoprotein (im Folgenden kurz Fetuin genannt) ist ein hochglykosyliertes Protein, das am Knochenwachstum und -remodelling beteiligt ist [84]. Glycoproteine spielen eine wichtige Rolle bei Zell-Zell-Interaktionen, der Gewebemorphogenese, Immunreaktionen und Entzündungen. Kürzlich wurde von einer Erniedrigung dieses Proteins im Liquor von Alzheimer-Patienten berichtet, aber es existiert bislang keine Veröffentlichung über Fetuin-Konzentrationen bei MS-Patienten [29, 74]. Beide Erkrankungen haben allerdings gemein, dass sie entzündliche Vorgänge aufweisen, daher könnte das Fetuin ein unspezifischer Entzündungsmarker im Liquor sein. Es werden zusätzliche Studien benötigt werden, um über die biologische Relevanz von Fetuin im pathophysiologischen Kontext von Demyelinisierung und axonaler Degeneration Aufschluss zu geben.

5.2.2 Apolipoprotein E:

Das Transportprotein Apolipoprotein E (im Folgenden kurz ApoE genannt) wurde bereits mit klinischen Merkmalen der MS [70] sowie anderen neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert [56, 70, 74]. Da ApoE als neurotropher Faktor angesehen wird, würde jegliche Erniedrigung einer intrathekalen ApoE-Synthese daher bei RRMS (im Gegensatz zu CIS-Patienten mit kurzer Krankheitsdauer) zum Fortschreiten der Erkrankung beitragen. Dies stimmt mit Funden von erniedrigten ApoE-Konzentrationen im Liquor bei MS-Patienten, unabhängig vom ApoE-Genotyp, überein [28]. Des Weiteren sind erhöhte ApoE-Konzentrationen vielmehr mit Remyelinisierungsprozessen assoziiert, während im Gegensatz dazu niedrige ApoE-Konzentrationen mit Schüben in Verbindung gebracht werden [76].

5.2.3 Transferrin:

Transferrin ist ein eisenbindendes Protein, das sowohl im Serum als auch im Liquor vorkommt. Mittels spezieller Transferrinrezeptoren kann das Protein leicht per Pinozytose in die Zellen gelangen. In der Vergangenheit wurden bereits signifikant erniedrigte Transferrin-Konzentrationen im Liquor von MS-Patienten gefunden [18]. Es wurde dabei von der Hypothese ausgegangen, dass bei der Multiplen Sklerose diese Rezeptoren über Monate oder Jahre herunterreguliert worden sein könnten, und demzufolge niedrigere Mengen Transferrin in den Liquorraum eintreten.

Dies untermauert die mittels 2D-DIGE gewonnenen Ergebnisse, da in der RRMS-Gruppe mit einer durchschnittlichen Krankheitsdauer von einigen Jahren erniedrigte Transferrin-Konzentrationen gefunden wurden (im Gegensatz zur CIS-Gruppe).

5.3 Klinisch isoliertes Syndrom (CIS)

Komplementfaktor 3, Vitamin D-binding Protein und Translation initiation factor eIF-4-gamma sind Proteine, die nur bei CIS-Patienten herunterreguliert waren. Des Weiteren fanden wir lediglich bei CIS-Patienten Proapo-A1 erhöht.

5.3.1 Proapo-A1:

Proapo-A1 ist als Propeptid von Apolipoprotein A1 ein Bestandteil der Apolipoprotein-Familie, und kommt als Hauptbestandteil von HDL (*high density lipoprotein*), als Bestandteil anderer Lipoproteinklassen, sowie auch in freier Form vor. Die Synthese von Proapo-A1 konnte sowohl in der Leber als auch im Dünndarmepithel nachgewiesen werden. Des Weiteren wird es als „negatives“ Akute-Phase-Protein bezeichnet, da es die spezifische Aktivierung von Monozyten durch stimulierte T-Zellen, und dadurch die Freisetzung von Zytokinen (TNF-alpha, Interleukine) verhindert [16, 47].

Das vermehrte Vorhandensein vom Proapo-A1 nur bei CIS aber nicht bei RRMS reflektiert möglicherweise eine spezifische Aktivierung des Immunsystem zur Verhinderung einer, mit Zytokinfreisetzung assoziierten, Entzündungsreaktion in sehr frühen Stadien der MS mit dem Ziel, so früh wie möglich in Remission zu gehen.

Darüber hinaus ist Proapo-A1 an der Entfernung überflüssigen Cholesterins aus den Zellen der Peripherie, sowie dessen Transport zur Leber beteiligt. Auch im ZNS wird ihm diese Funktion zugesprochen [12]. Das im ZNS vorhandene Cholesterin liegt zu ca. 70 % in Myelin-assoziiierter Form vor, des Weiteren bildet es einen wichtigen Bestandteil von Membranen. Da es bei der MS wahrscheinlich zu einer vermehrten Cholesterinfreisetzung durch Zerstörung der Myelinscheiden kommt, könnte die Hochregulation von Proapo-A1 einem Kompensationsmechanismus im Frühstadium der MS zur Aufrechterhaltung der Homöostase des Cholesterinhaushalts entsprechen.

5.3.2 Komplementfaktor 3:

Dem Komplementfaktor 3 (im Folgenden kurz C3 genannt) wird eine essentielle Rolle in der Vermittlung und Aufrechterhaltung von Entzündung und Demyelinisierung im Nervensystem zugesprochen [27, 50, 55, 65, 89]. Im künstlich induzierten Mausmodell der Multiplen Sklerose, der experimentellen Autoimmunencephalomyelitis (EAE), hat die Entfernung von Komplementfaktoren zu signifikant weniger Entzündung und Demyelinisierung [90], sowie vor allem in frühen Krankheitsstadien zur Suppression der klinischen Krankheit geführt [55].

Nimmt man ähnliche Mechanismen in sehr frühen Stadien der MS an (z.B. repräsentiert als CIS), könnten reduzierte C3-Konzentrationen möglicherweise ein Regulationsmechanismus zur Minimierung akuter Entzündung sein, wohingegen diese Regulation in der chronischen Phase der RRMS gestört sein könnte. Wenn man von den histopathologischen Charakteristika der Plaqueläsionen bei MS ausgeht, sind die Mechanismen und Ziele der Demyelinisierung bei den verschiedenen Untergruppen und Krankheitsverläufen grundsätzlich verschieden [58, 83].

Bei der RRMS wurde das häufigste histopathologische Muster anhand von Ablagerungen aus Immunglobulin (Ig) und aktiviertem Komplement als Zeichen der aktiven Myelinzerstörung charakterisiert [58, 83]. In der Tat bildeten Patienten mit sehr kurzer Krankheitsdauer jedoch sowohl Plaques mit oder ohne Ig- und Komplementablagerungen aus. Im Zusammenhang mit einer bislang unbekanntem klinischen und subklinischen Progression in sehr frühen Krankheitsstadien ist dies allerdings nicht erstaunlich. Da Serpine (Serin Proteinase Inhibitoren, als eigener Unterpunkt unter 5.4.2 noch genauer beschrieben) ebenfalls in die Komplementaktivierungskaskaden involviert sind, könnte die C3-Reduktion, als eine Schlüsselkomponente der Komplementaktivierung, durch erniedrigte Serpin-Konzentrationen reguliert werden. Die Bedeutung von C3 muss jedoch hinsichtlich verschiedener Krankheitsstadien zukünftig noch weiter untersucht werden.

5.3.3 Vitamin D-binding Protein:

Das Vitamin D-binding Protein (im Folgenden kurz DBP genannt) bindet Vitamin D und monomeres Aktin. Da ein Mangel an Vitamin D, einem wichtigem Immunsystemmodulator, das Risiko von Autoimmunerkrankungen erhöht, wirkt auch das DBP als immunmodulierender Faktor. Obwohl mehrere Gruppen die Beteiligung eines DBP-Genpolymorphismus bei der MS-Entwicklung untersucht haben [67, 82], fand nur eine Gruppe einen Zusammenhang zwischen verschiedenen Allelen des DBP und einer, möglicherweise in Abhängigkeit von diesen unterschiedlichen Allelen auftretenden, Multiplen Sklerose [24].

Wahrscheinlicher ist, dass eher posttranslationale Modifikationen des Proteins auf den Vitamin D-Metabolismus einwirken, und somit autoimmune Entzündungen beeinflussen.

5.3.4 Translation initiation factor eIF-4-gamma:

Der Translation initiation factor eIF-4-gamma, eine Komponente des Proteinkomplexes eIF-4 (eukaryotic initiation factor-4), welcher in die Erkennung von m-RNA *caps* und an der Rekrutierung von m-RNA zum Ribosom beteiligt ist, wurde ebenfalls nur in CIS Proben herabreguliert gefunden. Jedoch ist die Bedeutung im Zusammenhang mit der MS völlig unklar, somit bleibt die Relevanz reduzierter Translation initiation factor eIF-4-gamma-Konzentrationen bei entzündlichen Prozessen bei CIS-Patienten noch zu erforschen.

5.4 Gemeinsame Proteine der schubförmig remittierenden Multiplen Sklerose (RRMS) und des klinisch isolierten Syndroms (CIS)

5.4.1 IgG und IgG Precursor Proteine:

Obwohl der Großteil des Gesamtproteins im Liquor bereits vor der Elektrophorese entfernt wurde, wurden in beiden Krankheitsgruppen IgG oder IgG Precursor Proteine in deutlich erhöhter Menge gefunden. Dies ist einerseits dadurch bedingt, dass durch die erfolgte Probenaufreinigung nicht alles vorhandene Albumin und IgG entfernt werden konnte, da die Kapazität des verwendeten Kits beschränkt ist. Andererseits passt diese Konstellation natürlich zu einer intrathekalen Immunantwort im Sinne einer Antikörpersynthese im Rahmen der chronischen Entzündung.

5.4.2 Serin Proteinase Inhibitoren:

Sowohl bei RRMS als auch bei CIS wurden erniedrigte Mengen an Serin Proteinase Inhibitoren (im Folgenden kurz Serpine genannt) gefunden. Diese sind in viele physiologische Prozesse wie etwa Modulation von Entzündungsprozessen, Fibrinolyse und Komplementaktivierung involviert [81]. Bei der MS wird die Aktivierung der Serpine als essentiell für den Leukozyteneintritt in, und die Demyelinisierung von entzündlichen ZNS-Läsionen gesehen [1, 22, 35].

Zum Beispiel wurde beim *Tissue plasminogen activator*, einem fibrinolytischen Enzym welches auch an der Regulation neuraler Aktivität und synaptischem Remodelling im ZNS beteiligt ist [17], bei neurodegenerativen Erkrankungen eine Assoziation mit axonalem Schaden festgestellt [86]. Im Liquor von MS-Patienten ist seine Konzentration und Aktivität erhöht [3]. Des Weiteren wurde bei der MS eine Erhöhung von Plasminogen-Aktivatoren in der weißen Substanz als eines der ersten Entzündungszeichen betrachtet [22]. Neuroserpin, ein hirnspezifischer Protein Inhibitor, ist in erster Linie in Neuronen lokalisiert [39] und könnte eine Rolle als neuronaler Überlebensfaktor spielen [92]. MS-Läsionen wurden durch die Abwesenheit von nativem Neuroserpin charakterisiert. Außerdem ist es in normal erscheinender weißer Substanz von MS-Patienten reduziert [36]. Verminderte Neuroserpin-Konzentrationen lassen daher vermuten, dass eine Entzündungsaktivität in beiden MS-Gruppen möglicherweise mit erniedrigten Serpin-Konzentrationen einhergeht.

Andererseits gibt es Hinweise darauf, dass die künstlich induzierte experimentelle Autoimmunencephalomyelitis (EAE) bei Mäusen mit einer (um insgesamt 32%) erhöhten Konzentration der Serpine einhergeht [8].

Da dies ein Tiermodell der Multiplen Sklerose ist, müssen die Ergebnisse aber mit Vorsicht betrachtet werden. Berichte der Vergangenheit über normale Serpin-Konzentrationen im Liquor bei MS-Patienten bleiben jedoch umstritten, da verschiedene Ansätze verfolgt wurden: Zum einen wurden jeweils unterschiedliche Serpine oder die Serpinkonzentration bzw. -aktivität als Gesamtheit aller Serpine gemessen, zum anderen wurden nur selektiv einzelne Serpine untersucht [2, 3]. Weiteren Studien über die Regulation der verschiedenen Serpine kommt daher, unter Berücksichtigung der Entwicklung von MS-Läsionen, eine besondere Bedeutung zu.

5.4.3 Transthyretin:

Transthyretin (im Folgenden kurz TTR genannt), welches in dieser Arbeit ebenfalls im Liquor beider MS-Gruppen erniedrigt war, wird in erster Linie im Plexus choroideus als lösliches Monomer synthetisiert und verhindert eine Amyloidfibrillogenese [37, 59]. Es wurde den TTR-Isoformen daher nachgesagt, an verschiedenen Amyloidstörungen beteiligt zu sein [45, 77]. Die im Liquor von Alzheimer-Patienten gefundenen, reduzierten TTR-Konzentrationen führen möglicherweise zur Formation unlöslicher Plaques [78, 80]. Erniedrigte TTR-Konzentrationen bei normalem Liquorproteingehalt müssen bei der Alzheimerdemenz daher zur Hypothese führen, dass diese Entdeckung vermutlich auf eine reduzierte TTR-Sekretion im Plexus choroideus zurückzuführen ist [80].

Diese Hypothese stimmt gut mit den hier beschriebenen Resultaten überein, die beinahe keine Änderung der Blut-Liquor-Schranke bei der MS ergaben, und eine potentielle Rolle von TTR auch in inflammatorischen Prozessen nahe legen. In früheren Untersuchungen über TTR im Liquor von MS-Patienten wurden erhöhte, ebenso wie normale oder erniedrigte TTR-Konzentrationen gefunden [54]. Diese Diskrepanzen könnten mit einer Veränderung der Pathogenese und klinischen Phänotypen der Multiplen Sklerose während der letzten Dekade zusammenhängen.

5.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit liefert einen weiteren Beitrag zur Erforschung möglicher Biomarker der Multiplen Sklerose. Es konnte gezeigt werden, dass 2D-DIGE eine effektive Methode zur vergleichenden Liquorproteomanalyse bei MS-Patienten sein kann. Die Resultate zeigen ein deutlich unterschiedliches Liquorproteomprofil von RRMS und CIS im Vergleich zu alters- und geschlechtsgematchten Kontrollproben. Die Koexistenz erniedrigter Konzentrationen einiger Transportproteine, Serin Proteinase Inhibitoren, Glycoproteine und der Schlüsselkomponente Komplementfaktor 3, neben einer Aufregulation von IgG und Proapo-A1 als Indikatoren einer humoralen Immunantwort, passt gut zu den bereits bei der MS bekannten Entzündungsprozessen.

Die Proteomforschung bei der MS nimmt bei der Diagnosestellung nur einen geringfügigen Stellenwert ein, da diese bereits mittels Klinik, Bildgebung und routinemäßig durchgeführtem Liquorbefund gestellt werden kann.

Obwohl die pathophysiologische Rolle der gefundenen Proteine noch im Detail zu erforschen bleibt, liegt die Bedeutung der Proteomforschung vielmehr im Beitrag zum tieferen Verständnis pathophysiologischer Prozesse der Erkrankung, insbesondere der Prognose des weiteren Krankheitsverlaufs, der aktuellen Krankheitsaktivität, einer möglichen Therapiekontrolle (responder oder non-responder), sowie möglicher Ansatzpunkte für diagnostische und therapeutische Maßnahmen. Ungeachtet dessen, dass die potentiellen Biomarker nicht MS-spezifisch sein könnten, und der Tatsache, dass sie nicht unbedingt das metabolische Geschehen des Hirngewebes wiedergeben (da Proteine des tiefen Hirnparenchyms kaum in den freien Liquorraum gelangen), könnte das gefundene Proteinprofil oder eines der gefundenen Proteine darüber hinaus in Zukunft zur Unterscheidung zwischen MS und anderen entzündlichen Erkrankungen nützlich sein.

Eine zukünftige Perspektive könnte letztendlich darin liegen, anhand der potentiellen Biomarker im Liquor auch eine Serumtestung zu etablieren. Dazu müsste zunächst ein möglichst spezifischer Marker im Liquor identifiziert, und anschließend die Frage der Sensitivität des Tests für die Blutanalyse geklärt werden.

Aufgrund der klinischen und pathophysiologischen Komplexität der Multiplen Sklerose sollten die nächsten Untersuchungen eine größere Kohorte an MS-Patienten, sowie entzündlichen und normalen Kontrollen beinhalten, um die diagnostische Sensitivität und Spezifität der potentiellen Biomarker zu bestimmen.

Darüber hinaus darf nicht außer Acht gelassen werden, dass Proteomanalysen nur semiquantitative Ansätze darstellen. Liquorphysiologische Einflussfaktoren, wie z.B. eine Funktionsstörung der Blut-Liquor-Schranke, können hierbei nicht berücksichtigt werden. Das Ziel nachfolgender Arbeiten muss deshalb eine weitere Validierung der Resultate mittels quantitativer Immunoassays sein. Einen möglichen Versuchsansatz könnte zuerst der Nachweis eines Kandidatenproteins mittels Western Blot, und anschließend dessen quantitative Konzentrationsbestimmung mittels ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) darstellen.

Doch auch diese Ergebnisse dürfen noch nicht als endgültige Ergebnisse betrachtet werden. Neben dem Vergleich mit alters- und geschlechtsgematchten Kontrollen sind vielmehr weitere Schritte notwendig, um den Einfluss der Schrankenfunktion zu eliminieren. Unabdingbar ist die gleichzeitige Konzentrationsbestimmung (ELISA) des Proteins in Liquor und Serum, da letztendlich nur die Bildung des Liquor-Serum-Quotienten per Definition den Einfluss der Proteinkonzentration im Blut beseitigt. Darüber hinaus eliminiert erst die Bildung eines weiteren Quotienten (Liquor-Serum-Quotient/ Albuminquotient) den Einfluss der Schrankenfunktion. Dieser Quotient kann letztendlich mit den entsprechenden Quotienten für andere entzündliche Erkrankungen und Kontrollen verglichen werden, um die Ergebnisse dieser Arbeit zu validieren.

6 Zusammenfassung

Die Multiple Sklerose (im folgenden kurz MS genannt) ist eine chronisch entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems, bei der es einerseits durch Zerstörung der Myelinscheiden zu einer Demyelinisierung der Nerven und konsekutiver Abnahme der Nervenleitgeschwindigkeit kommt, andererseits ebenfalls zu einer direkten Schädigung der Axone. Ihre Unterteilung in mehrere Untergruppen konnte in der Praxis bisher nur rein klinisch, und seit Neuem neuropathologisch vorgenommen werden. Da sich bei der MS typische, wenn auch nicht pathognomonische Liquorveränderungen finden, kann der Liquor wichtige Hinweise auf die Ätiologie und Pathogenese geben. Ein verlässlicher Biomarker oder Test für diese Erkrankung, sowohl was die Untergruppen als auch Krankheitsverlauf und Prognose, sowie das Ansprechen der Therapie mit Immunmodulatoren angeht, existiert jedoch bisher noch nicht. Demzufolge sind Aussagen über frühzeitige Differenzierungsmöglichkeiten der Verlaufsform und damit über eine individuell angepasste Therapie noch nicht möglich.

Die vorliegende Arbeit wurde deshalb mit dem Ziel durchgeführt, mittels Proteomanalyse neue oder veränderte Proteine im Liquorproteom von MS-Patienten im Vergleich zu neurologisch unauffälligen Patienten zu finden, welche zukünftig als Biomarker dienen könnten. Neben RRMS- (schubförmig remittierende Multiple Sklerose) wurden auch CIS- (klinisch isoliertes Syndrom) Proben als mögliche Frühform einer MS untersucht.

Die in dieser Arbeit verwendete, zweidimensionale „difference in-gel electrophoresis“ (2D-DIGE) Technologie erlaubt eine simultane Auftrennung mehrerer Proben im gleichen Gel. Als problematisch erweist sich im Allgemeinen bei Liquoruntersuchungen, dass im Liquor nur geringe Konzentrationen der hirspezifischen, jedoch viele hirnunspezifische, vorwiegend aus dem Blut stammende Proteine (z.B. Albumin) vorkommen. Deshalb wurden Albumin und Immunglobulin G chromatographisch entfernt und der verbliebene Liquor mehrerer Patienten gepoolt, um die hirspezifischen Proteine anzureichern und die intraindividuellen Unterschiede zu minimieren (Gruppeneffekt). Es zeigten sich zunächst bei beiden Gruppen deutliche Unterschiede im Liquorproteomprofil von RRMS und CIS im Vergleich zu alters- und geschlechts-gematchten Kontrollproben.

Auf der Suche nach spezifischen Liquorproteomprofilen wurden viele der bestimmten Proteine (Transthyretin, Komplementfaktor 3, Vitamin D-binding Protein, Apolipoprotein E und Transferrin) bereits in früheren Arbeiten nachgewiesen. Darüber hinaus konnten in der vorliegenden Arbeit zwei Proteine identifiziert werden, von denen bislang noch nicht berichtet wurde (Alpha 2-Heremans-Schmid Glycoprotein (Fetuin) und Translation initiation factor eIF-4-gamma).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass 2D-DIGE eine gut funktionierende und reproduzierbare Methode zur vergleichenden Liquorproteomanalyse ist. Die identifizierten Proteine wurden in allen drei angefertigten Gelen aufgefunden und stimmen gut mit bereits bei der MS bekannten Entzündungsprozessen überein. Das ermittelte Proteinprofil könnte fortan zum besseren Verständnis der Erkrankung und zu potentiellen Ansätzen für diagnostische und therapeutische Maßnahmen beitragen, sowie zukünftig zur Unterscheidung zwischen der MS, ihrer Unterformen untereinander, und anderen entzündlichen Erkrankungen nützlich sein. Zum vollständigen Verständnis der pathophysiologischen Rolle der gefundenen Proteine müssen weitere Untersuchungen folgen.

Um der klinischen und pathophysiologischen Komplexität der MS gerecht zu werden, sollten nachfolgende Untersuchungen darüber hinaus eine größere Kohorte an MS-Patienten, andere entzündliche Erkrankungen, sowie alters- und geschlechtsgematchte Kontrollen beinhalten, um dadurch Aussagen über die diagnostische Sensitivität und Spezifität der potentiellen Biomarker zu ermöglichen. Zur weiteren Etablierung der Ergebnisse müssen ferner Arbeiten zur Validierung der Resultate erfolgen, z.B. unter Zuhilfenahme von Western Blot und quantitativer Konzentrationsbestimmungen mittels ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Des Weiteren dürfen liquorphysiologische Aspekte wie die Blut-Liquor-Schranke nicht außer Acht gelassen werden. Hier könnte die Bildung des Liquor-Serum-Quotienten und dessen Verhältnis zum Albuminquotienten weiterhelfen, da dies definitionsgemäß den Einfluss der Schrankenfunktion eliminiert.

7 Literaturverzeichnis

1. **Akenami FO, Siren V, Koskiniemi M, Siimes MA, Teravainen H, Vaheri A.**
Cerebrospinal fluid activity of tissue plasminogen activator in patients with neurological diseases.
J Clin Pathol **49**: 577-580 (1996)
2. **Akenami FO, Koskiniemi M, Farkilla M, Vaheri A.**
Cerebrospinal fluid plasminogen activator inhibitor-1 in patients with neurological disease.
J Clin Pathol **50**: 157-160 (1997)
3. **Akenami FO, Siren V, Wessman M, Koskiniemi M, Vaheri A.**
Tissue plasminogen activator gene expression in multiple sclerosis brain tissue.
J Neurol Sci **165**: 71-76 (1999)
4. **Alban A, David SO, Bjorkesten L, Andersson C, Sloge E, Lewis S, Currie I.**
A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: Two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard.
Proteomics **3**: 36-44 (2003)
5. **Anderson NL, Anderson NG.**
Proteome and proteomics: New technologies, new concepts, and new words.
Electrophoresis **19**: 1853-1861 (1998)
6. **Ascherio A, Munger KL.**
Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: The role of infection.
Ann Neurol **61**: 288-299 (2007)
7. **Ascherio A, Munger KL.**
Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious causes.
Ann Neurol **61**: 505-511 (2007)

8. **Beilin O, Karussis DM, Korczyn AD, Gurwitz D, Aronovich R, Hantai D, Grigoriadis N, Mizrachi-Kol R, Chapman J.**
Increased thrombin inhibition in experimental autoimmune encephalomyelitis.
J Neurosci Res **79**: 351-359 (2005)
9. **Bielekova B, Martin R.**
Development of biomarkers in multiple sclerosis.
Brain **127**: 1463-1478 (2004)
10. **Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, Bruck W.**
Acute axonal injury in multiple sclerosis: Correlation with demyelination and inflammation.
Brain **123**: 1174-1183 (2000)
11. **Bjartmar C, Kidd G, Mörk S, Rudick R, Trapp BD.**
Neurological disability correlates with spinal cord axonal loss and reduced N-acetyl-aspartate in chronic multiple sclerosis patients.
Ann Neurol **48**: 893-901 (2000)
12. **Björkhem I, Meaney S.**
Brain cholesterol: long secret life behind a barrier.
Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**: 806-15 (2004)
13. **Brex PA, Miskiel KA, O’Riordan JI, Plant GT, Moseley IF, Thompson AJ, Miller DH.**
Assessing the risk of early multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndromes: the role of a follow up MRI.
J Neurol Neurosurg Psychiatry **70**: 390-393 (2001)
14. **Bruck W.**
Inflammatory demyelination is not central to the pathogenesis of multiple sclerosis.
J Neurol **252 Suppl 5**: 10-15 (2005)

- 15. Buljevac D, Flach HZ, Hop WC, Hijdra D, Laman JD, Savelkoul HF, van der Meche FG, van Doorn PA, Hintzen RQ.**
Prospective study on the relationship between infections and multiple sclerosis exacerbations.
Brain **125**: 952-960 (2002)
- 16. Burger D, Dayer JM.**
High-density lipoprotein-associated apolipoprotein A-I: the missing link between infection and chronic inflammation?
Autoimmun Rev **1**: 111-117 (2002)
- 17. Calabresi P, Napolitano M, Centonze D, Marfia GA, Gubellini P, Teule MA, Berretta N, Bernardi G, Frati L, Tolu M, Gulino A.**
Tissue plasminogen activator controls multiple forms of synaptic plasticity and memory.
Eur J Neurosci **12**: 1002-1012 (2000)
- 18. Chopra B, Abraham R, Abraham A.**
CSF beta-1 Globulin--a potential marker in differentiating multiple sclerosis and acute disseminated encephalomyelitis: a preliminary study.
Neurol India **50**: 41-44 (2002)
- 19. Chromy BA, Gonzales AD, Perkins J, Choi MW, Corzett MH, Chang BC, Corzett CH, McCutchen-Maloney SL.**
Proteomic analysis of human serum by two-dimensional differential gel electrophoresis after depletion of high-abundant proteins
J Proteome Res **3**: 1120-1127 (2004)
- 20. Compston A, Coles A.**
Multiple Sclerosis.
Lancet **359** : 1221-1231 (2002)

- 21. Criswell LA, Pfeiffer KA, Lum RF, Gonzales B, Novitzke J, Kern M, Moser KL, Begovich AB, Carlton VE, Li W, Lee AT, Ortmann W, Behrens TW, Gregersen PK.**
Analysis of families in the multiple autoimmune disease consortium (MADGS) collection: the PTPN22 620W allele associates with multiple autoimmune phenotypes.
Am J Hum Genet **76**: 561-571 (2005)
- 22. Cuzner ML, Gveric D, Strand C, Loughlin AJ, Paemen L, Opdenakker G, Newcombe J.**
The expression of tissue-type plasminogen activator, matrix metalloproteases and endogenous inhibitors in the central nervous system in multiple sclerosis: comparison of stages in lesion evolution.
J Neuropathol Exp Neurol **55**: 1194-1204 (1996)
- 23. De Stefano N, Guidi L, Stromillo ML, Bartolozzi ML, Federico A.**
Imaging neuronal and axonal degeneration in multiple sclerosis.
Neurol Sci **24 Suppl 5**: 283-286 (2003)
- 24. Di Bacco M, Luiselli D, Manca ML, Siciliano G.**
Bayesian approach to searching for susceptibility genes: Gc2 and EsD1 alleles and multiple sclerosis.
Coll Antropol **26**: 77-84 (2002)
- 25. Dumont D, Noben JP, Raus J, Stinissen P, Robben J.**
Proteomic analysis of cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients.
Proteomics **4**: 2117- 2124 (2004)
- 26. Echan LA, Tang HY, Ali-Khan N, Lee K, Speicher DW.**
Depletion of multiple high-abundance proteins improves protein profiling capacities of human serum and plasma.
Proteomics **5**: 3292-3303 (2005)

- 27. Feasby TE, Gilbert JJ, Hahn AF, Neilson M.**
Complement depletion suppresses Lewis rat experimental allergic neuritis.
Brain Res **419**: 97-103 (1987)
- 28. Gaillard O, Gervais A, Meillet D, Plassart E, Fontaine B, Lyon-Caen O, Delattre J, Schuller E.**
Apolipoprotein E and multiple sclerosis: a biochemical and genetic investigation.
J Neurol Sci **158**: 180-186 (1998)
- 29. Geroldi D, Minoretti P, Bianchi M, Di Vito C, Reino M, Bertona M, Emanuele E.**
Genetic association of alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein polymorphism with late onset Alzheimer's disease in Italians.
Neurosci Lett **386**: 176-178 (2005)
- 30. Gilden DH.**
Infectious causes of multiple sclerosis.
Lancet Neurol **4**: 195-202 (2005)
- 31. Giovannoni G, Ebers G.**
Multiple Sclerosis: The environment and causation.
Curr Opin Neurol **20**: 261-268 (2007)
- 32. Giovannoni G.**
Multiple Sclerosis cerebrospinal fluid biomarkers.
Dis Markers **22**: 187-196 (2006)
- 33. Grigoriadis N, Ben-Hur T, Karussis D, Milonas I.**
Axonal damage in multiple sclerosis: a complex issue in a complex disease.
Clin Neurol Neurosurg **106**: 211-217 (2004)

- 34. Grigoriadis N, Hadjigeorgiou GM.**
Virus-mediated autoimmunity in multiple Sclerosis.
J Autoimmune Dis **19**: 3:1 (2006)
- 35. Gveric D, Hanemaaijer R, Newcombe J, van Lent NA, Sier CF, Cuzner ML.**
Plasminogen activators in multiple sclerosis lesions: implications for the inflammatory response and axonal damage.
Brain **124**: 1978-1988 (2001)
- 36. Gveric D, Herrera B, Petzold A, Lawrence DA, Cuzner ML.**
Impaired fibrinolysis in multiple sclerosis: a role for tissue plasminogen activator inhibitors.
Brain **126**: 1590-1598 (2003)
- 37. Hamilton JA, Benson MD.**
Transthyretin: a review from a structural perspective.
Cell Mol Life Sci **58**: 1491-1521 (2001)
- 38. Hammack BN, Fung KY, Hunsucker SW, Duncan MW, Burgoon MP, Owens GP, Gilden DH.**
Proteomic analysis of multiple sclerosis cerebrospinal fluid.
Mult Scler **10**: 245-260 (2004)
- 39. Hastings GA, Coleman TA, Haudenschild CC, Stefansson S, Smith EP, Barthlow R, Cherry S, Sandkvist M, Lawrence DA.**
Neuroserpin, a brain-associated inhibitor of tissue plasminogen activator is localized primarily in neurons. Implications for the regulation of motor learning and neuronal survival.
J Biol Chem **272**: 33062-33067 (1997)

- 40. Hauser SL, Oksenberg JR.**
The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration.
Neuron **52**: 61-76 (2006)
- 41. Hemmer B, Nessler S, Zhou D, Kieseier B, Hartung HP.**
Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis.
Nat Clin Pract Neurol **2**: 201-211 (2006)
- 42. Holmes S, Siebold C, Jones EY, Friese MA, Fugger L, Bell J.**
Multiple Sclerosis: MHC associations and therapeutic implications.
Expert Rev Mol Med **7**: 1-17 (2005)
- 43. Hu Y, Malone JP, Fagan AM, Townsend RR, Holtzman DM.**
Comparative proteomic analysis of intra- and interindividual variation in human cerebrospinal fluid.
Mol Cell Proteomics **4**: 2000-2009 (2005)
- 44. Hueber W, Robinson WH.**
Proteomic biomarkers for autoimmune disease.
Proteomics **6**: 4100-4105 (2006)
- 45. Hund E, Linke RP, Willig F, Grau A.**
Transthyretin-associated neuropathic amyloidosis. Pathogenesis and treatment.
Neurology **56**: 431-435 (2001)
- 46. Hunt SM, Thomas MR, Sebastian LT, Pedersen SK, Harcourt RL, Sloane AJ, Wilkins MR.**
Optimal replication and the importance of experimental design for gel-based quantitative proteomics.
J Proteome Res **4**: 809-819 (2005)

- 47. Hyka N, Dayer JM, Modoux C, Kohno T, Edwards CK 3rd, Roux-Lombard P, Burger D.**
Apolipoprotein A-I inhibits the production of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha by blocking contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes.
Blood **97**: 2381-2389 (2001)
- 48. Ibrahim SM, Gold R.**
Genomics, proteomics, metabolomics: what is in a word for multiple sclerosis?
Curr Opin Neurol **18**: 231-235 (2005)
- 49. Inglese M.**
Multiple Sclerosis: new insights and trends.
ANJR Am J Neuroradiol **27**: 954-957 (2006)
- 50. Janssen BJ, Huizinga EG, Raaijmakers HC, Roos A, Daha MR, Nilsson - Ekdahl K, Nilsson B, Gros P.**
Structures of complement component C3 provide insights into the function and evolution of immunity.
Nature **437**: 505-511 (2005)
- 51. Jasperse B, Jakobs C, Eikelenboom MJ, Dijkstra CD, Uitdehaag BM, Barkhof F, Polman CH, Teunissen CE.**
N-acetylaspartic acid in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients determined by gas-chromatography-mass-spectrometry.
J Neurol **254**: 631-637 (2007)
- 52. Kantarci O, Wingerchuk D.**
Epidemiology and natural history of multiple sclerosis: New insights.
Curr Opin Neurol **19**: 248-254 (2006)

- 53. Kuhlmann T, Lingfeld G, Bitsch A, Schuchardt J, Bruck W.**
Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time.
Brain **125**: 2202-2212 (2002)
- 54. Larsen PD, DeLallo LJ.**
Cerebrospinal fluid transthyretin in multiple sclerosis.
Neurology **37**: 1262-1263 (1987)
- 55. Linington C, Morgan BP, Scolding NJ, Wilkins P, Piddlesden S, Compston DA.**
The role of complement in the pathogenesis of experimental allergic encephalomyelitis.
Brain **112**: 895-911 (1989)
- 56. Li YJ, Pericak-Vance MA, Haines JL, Siddique N, McKenna-Yasek D, Hung WY, Sapp P, Allen CI, Chen W, Hosler B, Saunders AM, Dellefave LM, Brown RH, Siddique T.**
Apolipoprotein E is associated with age at onset of amyotrophic lateral sclerosis.
Neurogenetics **5**: 209-213 (2004)
- 57. Lottspeich F.**
Proteome Analysis: A pathway to the functional analysis of proteins.
Angew Chem Int Ed Engl **38**: 2476-2492 (1999)
- 58. Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H.**
Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination.
Ann Neurol **47**: 707-717 (2000)

- 59. Marchi N, Fazio V, Cucullo L, Kight K, Masaryk T, Barnett G, Vogelbaum M, Kinter M, Rasmussen P, Mayberg MR, Janigro D.**
Serum transthyretin monomer as a possible marker of blood-to-CSF barrier disruption.
J Neurosci **23**: 1949-1955 (2003)
- 60. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den Noort S, Weinshenker BY, Wolinsky JS.**
Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis.
Ann Neurol **50**: 121-127 (2001)
- 61. Miller DH.**
Biomarkers and surrogate outcomes in neurodegenerative disease: lessons from multiple sclerosis.
NeuroRx **1**: 284-94 (2004)
- 62. Miller DH, Filippi M, Fazekas F, Frederiksen JL, Matthews PM, Montalban X, Polman CH.**
Role of magnetic resonance imaging within diagnostic criteria for multiple sclerosis.
Ann Neurol **56**: 273-278 (2004)
- 63. Mohr DC, Hart SL, Julian L, Cox D, Pelletier D.**
Association between stressful life events and exacerbation in multiple sclerosis: a meta-analysis.
Br Med J **328**: 731-735 (2004)
- 64. Mohr DC.**
Stress and multiple sclerosis.
J Neurol **254 Suppl 2**: II65-II68 (2007)

- 65. Morgan BP.**
Clinical complementology: recent progress and future trends.
Eur J Clin Invest **24**: 219-228 (1994)
- 66. Murray TJ.**
Diagnosis and treatment of multiple sclerosis.
Br Med J **332**: 525-527 (2006)
- 67. Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, Yabe I, Tashiro K.**
No association of vitamin D-binding protein gene polymorphisms in Japanese patients with MS.
J Neuroimmunol **127**: 177-179 (2002)
- 68. Noben JP, Dumont D, Kwasnikowska N, Verhaert P, Somers V, Hupperts R, Stinissen P, Robben J.**
Lumbar cerebrospinal fluid proteome in multiple sclerosis: characterization by ultrafiltration, liquid chromatography, and mass spectrometry.
J Proteome Res **5**: 1647-1657 (2006)
- 69. Petzold A, Eikelenboom MJ, Keir G, Grant D, Lazeron RH, Polman CH, Uitdehaag BM, Thompson EJ, Giovannoni G.**
Axonal damage accumulates in the progressive phase of multiple sclerosis: Three year follow up study.
J Neurol Neurosurg Psychiatry **76**: 206-211 (2005)
- 70. Pinholt M, Frederiksen JL, Andersen PS, Christiansen M.**
Apo E in multiple sclerosis and optic neuritis: The apo E-epsilon4 allele is associated with progression of multiple sclerosis.
Mult Scler **11**: 511-515 (2005)
- 71. Pirko I, Lucchinetti CF, Sriram S, Bakshi R.**
Gray matter involvement in multiple sclerosis.
Neurology **68**: 634-642 (2007)

72. **Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Metz LM, McFarland HF, O'Connor PW, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Weinshenker BG, Wolinsky JS.**
Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria".
Ann Neurol **58**: 840-846 (2005)
73. **Poser CM, Brinar VV.**
Diagnostic criteria for multiple sclerosis.
Clin Neurol Neurosurg **103**: 1-11 (2001)
74. **Puchades M, Hansson SF, Nilsson CL, Andreassen N, Blennow K, Davidsson P.**
Proteomic studies of potential cerebrospinal fluid protein markers for Alzheimer's disease.
Brain Res Mol Brain Res **118**: 140-146 (2003)
75. **Rammohan KW.**
Axonal injury in multiple sclerosis.
Curr Neurol Neurosci Rep **3**: 231-237 (2003)
76. **Rifai N, Christenson RH, Gelman BB, Silverman LM.**
Changes in cerebrospinal fluid IgG and apolipoprotein E indices in patients with multiple sclerosis during demyelination and remyelination.
Clin Chem **33**: 1155-1157 (1987)
77. **Saraiva MJ.**
Transthyretin mutations in hyperthyroxinemia and amyloid diseases.
Hum Mutat **17**: 493-503 (2001)
78. **Schwarzman AL, Goldgaber D.**
Interaction of transthyretin with amyloid beta-protein: binding and inhibition of amyloid formation.
Ciba Found Symp **199**: 146-160 (1996)

- 79. Seidi OA, Semra YK, Sharief MK.**
Expression of CD5 on B lymphocytes correlates with disease activity in patients with multiple sclerosis.
J Neuroimmunol **133**: 205-210 (2002)
- 80. Serot JM, Christmann D, Dubost T, Couturier M.**
Cerebrospinal fluid transthyretin: aging and late onset Alzheimer's disease.
J Neurol Neurosurg Psychiatry **63**: 506-508 (1997)
- 81. Silverman GA, Bird PI, Carrell RW, Church FC, Coughlin PB, Gettins PG, Irving JA, Lomas DA, Luke CJ, Moyer RW, Pemberton PA, Remold-O'Donnell E, Salvesen GS, Travis J, Whisstock JC.**
The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature.
J Biol Chem **276**: 33293-33296 (2001)
- 82. Steckley JL, Dymant DA, Sadovnick AD, Risch N, Hayes C, Ebers GC.**
Genetic analysis of vitamin D related genes in Canadian multiple sclerosis patients. Canadian Collaborative Study Group.
Neurology **54**: 729-732 (2000)
- 83. Storch MK, Piddlesden S, Haltia M, Iivanainen M, Morgan P, Lassmann H.**
Multiple sclerosis: in situ evidence for antibody- and complement-mediated demyelination.
Ann Neurol **43**: 465-471 (1998)
- 84. Szveras M, Liu D, Partridge EA, Pawling J, Sukhu B, Clokie C, Jahnchen-Dechent W, Tenenbaum HC, Swallow CJ, Grypnas MD, Dennis JW.**
Alpha 2-HS glycoprotein/ fetuin, a transforming growth factor-beta/ bone morphogenetic protein antagonist, regulates postnatal bone growth and remodeling.
J Biol Chem **277**: 19991-19997 (2002)

- 85. Terry DE, Desiderio DM.**
Between-gel reproducibility of the human cerebrospinal fluid proteome.
Proteomics **3**: 1962-1979 (2003)
- 86. Tsirka SE.**
Clinical implications of the involvement of tPA in neuronal cell death.
J Mol Med **75**: 341-347 (1997)
- 87. Tumani H, Brettschneider J.**
ZNS-Proteine im Liquor: Einflussfaktoren auf die Konzentration im Liquor und klinische Relevanz.
J Lab Med **29**: 241-248 (2005)
- 88. Turck CW, Maccarrone G, Sayan-Ayata E, Jacob AM, Ditzen C, Kronsbein H, Birg I, Doertbudak CC, Haegler K, LEbar M, Teplytska L, Kolb N, Uwaje N, Zollinger R.**
The quest for brain disorder biomarkers.
J Med Invest **52 Suppl**: 231-235 (2005)
- 89. Vriesendorp FJ, Flynn RE, Pappolla MA, Koski CL.**
Complement depletion affects demyelination and inflammation in experimental allergic neuritis.
J Neuroimmunol **58**: 157-165 (1995)
- 90. Vriesendorp FJ, Flynn RE, Malone MR, Pappolla MA.**
Systemic complement depletion reduces inflammation and demyelination in adoptive transfer experimental allergic neuritis.
Acta Neuropathol (Berl) **95**: 297-301 (1998)

- 91. Wilkins MR, Williams KL, Appel RD, Hochstrasser DF.**
Introduction to the proteome. In: Proteome research: New frontiers in functional genomics.
Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, S. 1-11 (1997)
- 92. Yepes M, Sandkvist M, Wong MK, Coleman TA, Smith E, Cohan SL, Lawrence DA.**
Neuroserpin reduces cerebral infarct volume and protects neurons from ischemia-induced apoptosis.
Blood **96**: 569-576 (2000)
- 93. Yuan X, Russell T, Wood G, Desiderio DM.**
Analysis of the human lumbar cerebrospinal fluid proteome.
Electrophoresis **23**: 1185-1196 (2002)
- 94. Yuan X, Desiderio DM.**
Proteomics analysis of human cerebrospinal fluid.
J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **815**: 179-189 (2005)
- 95. Zettl UK, Tumani H.**
Liquor cerebrospinalis. In: Multiple Sklerose und Liquordiagnostik.
Blackwell Publishing Ltd, Malden, Massachusetts, S.26-60 (2006)
- 96. Zhou M, Conrads TP, Veenstra TD.**
Proteomics approaches to biomarker detection.
Brief Funct Genomic Proteomic **4**: 69-75 (2005)
- 97. Zolotarjova N, Martosella, J, Nicol G, Bailey J, Boyes BE, Barrett WC.**
Differences among techniques for high-abundant protein depletion.
Proteomics **5**: 3304-3313 (2005)

8 Danksagung

Diese Arbeit wäre ohne die Unterstützung vieler Personen nicht möglich gewesen. An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

An erster Stelle danke ich Herrn **Prof. Dr. Hayrettin Tumani**, ohne den mir der Einblick in das faszinierende Arbeitsgebiet Liquor verwehrt geblieben wäre, für die Überlassung des spannenden Themas, sowie sein beständiges Interesse am Fortgang der Arbeit. Nicht zuletzt möchte ich ihm für das schnelle und produktive Korrekturlesen in der Endphase meinen Dank aussprechen.

Mein besonderer Dank gilt Frau **Dr. Vera Lehmsiek** für die Weitergabe Ihrer Erfahrung, Ihre unermüdliche Geduld bei der Einarbeitung, sowie Ihre unschätzbare Ermutigung in Phasen erhöhter Frustration.

Darüber hinaus danke ich im Besonderen Herrn **Dr. Sigurd Süßmuth** für das Engagement bei der Durchsicht des Manuskripts, sowie für seine vielen hilfreichen Ideen und konstruktiven Anregungen.

Der Firma **Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG**, insbesondere Frau Sandra Felk und Herrn Frank Gillardon, für die Bereitstellung von Scanner und Software, sowie zahlreiche nützliche Tipps und Ratschläge.

Herrn Dr. Michael Kersten von der Firma **TOPLAB**, für die Durchführung und die hilfreiche Diskussion bei der Massenspektrometrie und Proteinidentifizierung.

Allen **Mitarbeitern des Liquorlabors** für die freundliche und selbstverständliche Aufnahme ins Team, das gute Arbeitsklima, sowie viele aufmunternde Worte.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich in irgendeiner Weise bei der Entstehung und Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben.

