

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

Liquorproteomanalyse von Patienten mit Amyotropher Lateralsklerose

Dissertation

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

vorgelegt von

Tino Ahlert
aus Weißwasser

2009

Amtierender Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hayrettin Tumani

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hans-Jürgen Groß

Tag der Promotion: 19.11.2010

Inhaltsverzeichnis:

	Abkürzungsverzeichnis	III
1	Einleitung	1
	1.1 Amyotrophe Lateralsklerose	1
	1.2 Liquor cerebrospinalis	4
	1.3 Proteomics	5
	1.4 Aufgabenstellung und Zielsetzung	6
2	Material und Methoden	8
	2.1 Chemikalien und Marker	8
	2.2 Kits und IPG-Streifen	9
	2.3 Farbstoffe	9
	2.4 Puffer	10
	2.5 Geräte	11
	2.6 Verbrauchsmaterial	12
	2.7 Patientenproben	12
	2.8 Aufkonzentrierung	13
	2.9 Aufreinigung	14
	2.10 Proteinbestimmung	16
	2.11 Präzipitation	17
	2.12 Labelling/ Farbstoffmarkierung	18
	2.13 Rehydratisierung	21
	2.14 Isoelektrische Fokussierung	21
	2.15 Gelelektrophorese	22
	2.16 Scannen und Auswertung	25
	2.17 Coomassie-Blue-Färbung	26
	2.18 Massenspektrometrische Auswertung	27
3	Ergebnisse	29
	3.1 Darstellung der gefunden Spots auf den Gelen	29
	3.2 Darstellung der gefundenen Proteine bei ALS	34
	3.3 Tabellarische Darstellung natürlicher Funktionen der gefundenen Proteine	39

Inhaltsverzeichnis	II	
4	Diskussion	40
	4.1 Einleitung	40
	4.2 Diskussion der Methodik	40
	4.3 Diskussion der Ergebnisse	43
5	Zusammenfassung	49
6	Literaturverzeichnis	51
7	Danksagung	58

Abkürzungsverzeichnis

AAT	Alpha-1-Antitrypsin
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ALS-LAUS	Amyotrophe Lateralsklerose mit Laborauffälligkeiten unbestimmter Signifikanz
ApoE	<u>A</u> polipoprotein <u>E</u>
APS	<u>A</u> mmoniumperoxid <u>s</u> ulfat
ASHG	<u>A</u> lpha 2- <u>H</u> eremans- <u>S</u> chmid- <u>G</u> lycoprotein
BSA	<u>B</u> ovines <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin
CHAPS	(3-[(3- <u>C</u> holamidopropyl)-dimethyl- <u>a</u> mmonio]-1-propane <u>s</u> ulfonate)
DBP	Vitamin <u>D</u> - <u>b</u> inding <u>P</u> rotein
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DIGE	<u>D</u> ifference <u>i</u> n- <u>g</u> el <u>e</u> lectrophoresis
DMF	<u>D</u> imethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (- <u>a</u> cid)
DTT	<u>D</u> ithiothreithol
EDTA	<u>E</u> thylendiamintetraessigsäure (- <u>a</u> cid)
EMG	Elektromyelographie
fALS	familäre Amyotrophe Lateralsklerose
HCl	<u>H</u> ydroch <u>l</u> oric acid (Chlorwasserstoff)
HDL	High-Density Lipoprotein
IEF	<u>I</u> soelektrische <u>F</u> okussierung
Ig	<u>I</u> mmunglobulin
IPG	<u>I</u> mmobiline™ dry polyacrylamide gel strips (Isoelectric focussing gel)
IS	<u>I</u> nterner <u>S</u> andard
K	Kontrolle
kDa	<u>K</u> ilo <u>D</u> alton

MALDI-TOF-MS	<u>M</u> atrix-assisted <u>l</u> aser <u>d</u> esorption/ <u>I</u> onisation <u>t</u> ime <u>o</u> f <u>f</u> light <u>m</u> ass- <u>s</u> pectrometry
MN	Motoneuro
MRT	<u>M</u> agnetresonanz <u>t</u> omographie
NB	<u>N</u> ormal <u>b</u> efund
NCBI	<u>N</u> ational <u>C</u> entre for <u>B</u> io <u>t</u> echnology <u>I</u> nformation
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NLG	Nervenleitgeschwindigkeit
pH	pontentia Hydrogenii
sALS	sporadische Amyotrophe Lateralsklerose
Serpin	Serine <u>p</u> roteinase <u>i</u> nhibitor
SDS	<u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulfate
SOD1	Kupfer/Zink-Superoxiddismutase
Temed	N,N,N',N' - <u>T</u> etramethylethylene- <u>d</u> iamine
Tris	<u>T</u> rihydroxymethylaminomethane
TTR	<u>T</u> ransthyretin
ZNS	<u>Z</u> entrales <u>N</u> ervensystem

1 Einleitung

1.1 Amyotrophe Lateralsklerose

Die auch als myotrophische Lateralsklerose oder Charcot-Krankheit bekannte ALS wird zu der Gruppe der chronischen degenerativen Motoneuronenerkrankungen gezählt. Bei der ALS kommt es zu einer Degeneration sowohl des ersten als auch des zweiten Motoneurons. Die Prävalenz der ALS beträgt 3-8/100000, während die Inzidenz bei etwa 0,4-2,6/100000 liegt.[63] Das Erkrankungsalter streut dabei vom jungen Erwachsenenalter bis ins hohe Alter, mit einer deutlichen Altersspitze im 6. Lebensjahrzehnt. Pathogenetisch unterscheidet man nach der Airlie-House-Konsensus-Konferenz eine sporadische Form (sALS), eine familiäre Form (fALS), das sogenannte ALS-Plus-Syndrom, sowie eine ALS mit Laborauffälligkeiten unbestimmter Signifikanz.[1] Etwa 85% der Erkrankung entfallen dabei auf die sporadische Form. Die Ätiologie für die sALS ist zur Zeit noch weitgehend ungeklärt. Bei der fALS weisen etwa 20% der Erkrankten Punktmutationen der Kupfer/Zink-Superoxiddismutase auf.[34] Der gängigen Theorie nach, führt der daraus resultierende oxidative Stress zur Exzitotoxizität, einer Form des neuronalen Zelltods, welcher durch den Transmitter Glutamat oder seine chemischen Analoga ausgelöst wird. Man geht zur Zeit davon aus, dass bei der sALS ähnliche Mechanismen wirken. Des Weiteren wurden in seltenen Fällen Mutationen im Dynactin-Gen[39] und im Alsin-Gen[12] gefunden.

Um die Diagnostik zu vereinfachen und zu standardisieren, existieren seit 1998 die so genannten erweiterten El-Escorial Kriterien. In diesen werden unter anderem die Bedingungen festgelegt, welche die Diagnose ALS erlauben. Im konkreten sind dies:

A - das Vorhandensein von:

- (A:1) Beweise eines Untergangs (Degeneration) von Zellen des zweiten motorischen Neurons durch neurologische, neurophysiologische oder neuropathologische Untersuchung.
- (A:2) Beweise eines Untergangs (Degeneration) von Zellen des ersten motorischen Neurons durch klinische Untersuchung.
- (A:3) Ausbreitung der Symptome innerhalb einer Körperregion oder Ausbreitung auf andere Regionen.

B - dem Fehlen von

- (B:1) neurophysiologischen and pathologischen (= krankhaften) Hinweisen auf eine andere Erkrankungen, die die Symptome der Schädigung des ersten oder zweiten motorischen Neurons erklären können.
- (B:2) bildgebenden Hinweisen auf das Vorliegen einer anderen Erkrankung, die die klinischen und neurophysiologischen Zeichen erklären können.

Des Weiteren erfolgt eine Einteilung der Diagnosesicherheit (siehe Abbildung 1). Dabei werden 5 Grade der Diagnosesicherheit unterschieden:

- klinisch definitive ALS
- klinisch wahrscheinliche ALS
- klinisch wahrscheinliche, laborunterstützte ALS
- klinisch mögliche ALS
- klinisch vermutete ALS

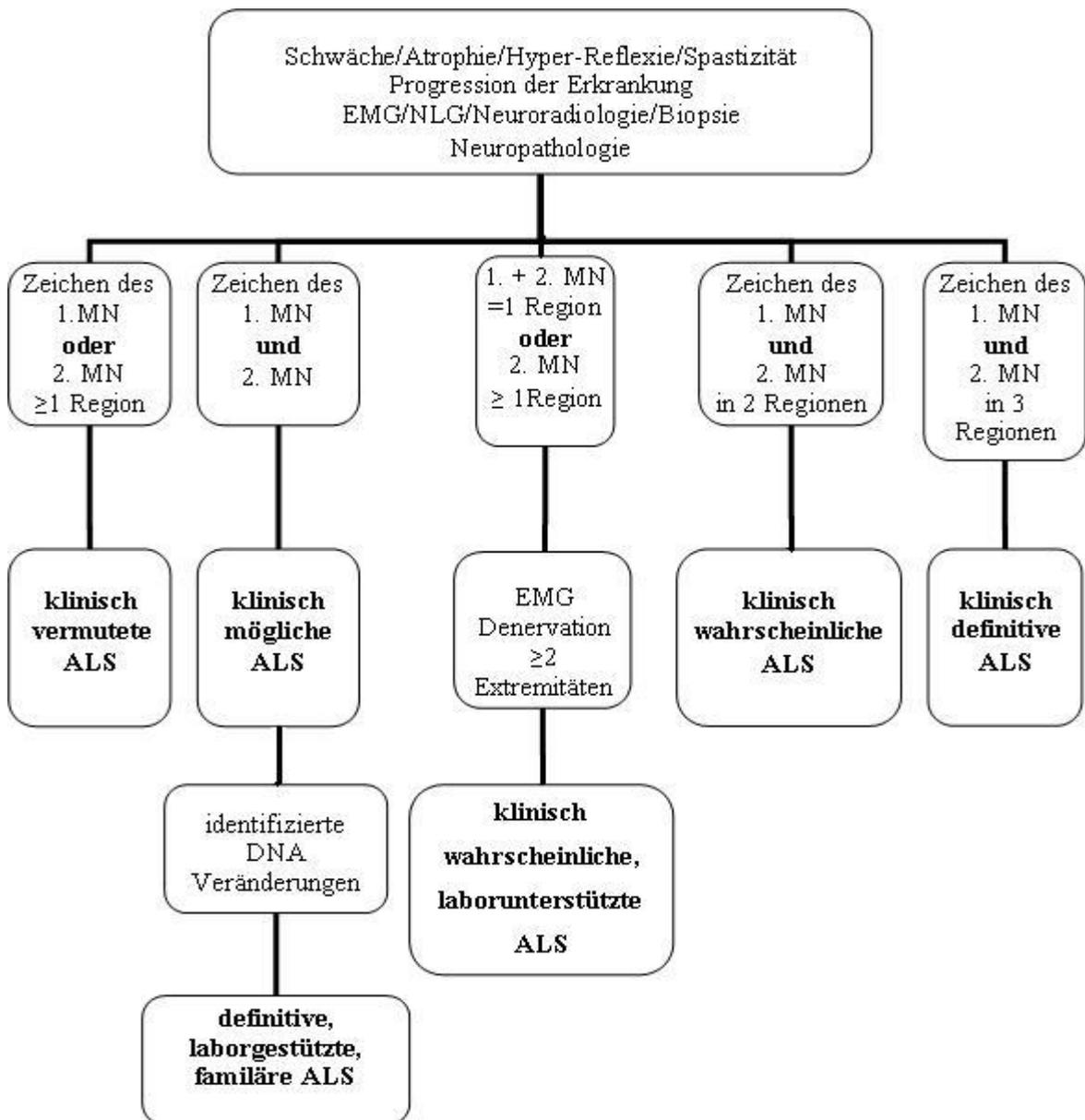


Abbildung 1: grafische Darstellung der Diagnosesicherheitsgrade nach El Escorial Revisited: Revised Criteria for the Diagnosis of Amyotrophic Lateral Sclerosis [8]
 [Abkürzungen: ALS = Amyotrophe Lateralsklerose, DNA = Desoxyribonukleinsäure (-acid), EMG = Elektromyographie, MN = Motoneuron, NLG = Nervenleitgeschwindigkeit]

Aufgrund der El-Escorial-Kriterien erhalten die diagnostischen Verfahren eine unterschiedliche Gewichtung.[8] Während die klinische Untersuchung und die Elektrophysiologie mit dem Aufzeigen von Degenerationszeichen des ersten und zweiten Motoneurons unmittelbar zur Diagnoseerstellung beitragen, dienen Blut- und Liquordiagnostik, sowie neuroradiologische Untersuchungen hauptsächlich dem Ausschluss von anderen Erkrankungen.

1.2 Liquor cerebrospinalis

1.2.1 Allgemeines:

Der Liquor cerebrospinalis ist ein Ultrafiltrat des Blutes, welches das Gehirn und Rückenmark umgibt. Der normale, gesunde Liquor ist eine wasserklare und farblose Flüssigkeit, die sich in seiner Zusammensetzung deutlich von der des Blutplasmas unterscheidet. Gebildet wird der Liquor in den Zellen des Plexus choroideus, die Resorption erfolgt hauptsächlich durch die Arachnoidalzotten. Es werden pro Tag ca. 650 ml Liquor gebildet, da die Gesamtlíquormenge aber konstant bei 100-200 ml liegt, sollte die Resorptionsmenge gleich der Bildungsmenge sein. Die Zusammensetzung des Liquors ändert sich im Verlauf seines Durchflusses durch die Liquorräume in Richtung des Lumbalsackes. So steigt der Anteil an Proteinen Richtung kaudal an, diese Zunahme des Proteinanteils entlang der Zirkulationsstrecke des Liquors wird als „ventrikulo-lumbaler Gradient“ bezeichnet. Der Liquor wird beim Erwachsenen normalerweise durch Punktion des Duralraumes in Höhe des Zwischenraumes zwischen dem 4. und 5. Lumbalwirbelkörper gewonnen.

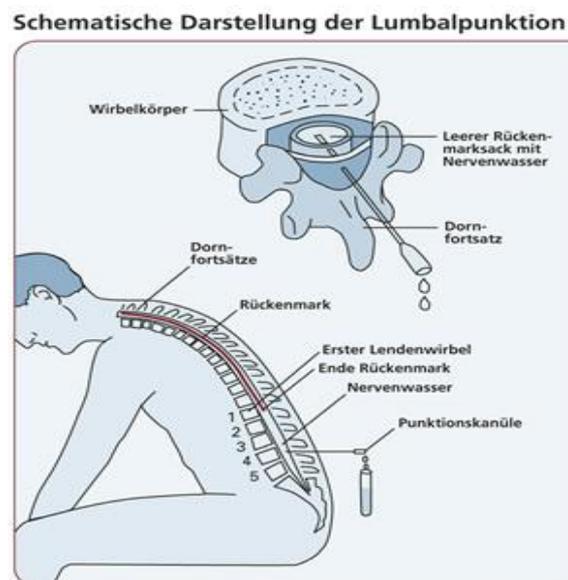


Abbildung 2: schematische Darstellung der Lumbalpunktion

1.2.2 Der Liquor in der ALS-Diagnostik

In der bisherigen ALS-Diagnostik diente die Liquoruntersuchung hauptsächlich dem differentialdiagnostischen Ausschluss der Neuroborreliose und der chronisch-inflammatorischen, demyelinisierenden Polyneuropathie. Bei der ALS selber findet sich häufig ein leicht erhöhter Albumin-Quotient, welcher auf eine Störung der Blut-Liquor-Schranke zurückzuführen ist. Häufig finden sich bei der ALS Laborauffälligkeiten wie gangliosidäre Antikörper und Virusinfektionen, denen bis zum jetzigen Zeitpunkt keine Signifikanz zugeordnet werden konnte. In diesen Fällen spricht man von der ALS-LAUS.

1.3 Proteomics

1.3.1 Allgemeines

Proteomics umfasst die Erforschung des Proteoms, das heißt der Gesamtheit aller in einer Zelle oder einem Lebewesen unter definierten Bedingungen und zu einem definierten Zeitpunkt vorliegenden Proteine. Das Proteom ist im Gegensatz zum eher statischen Genom dynamisch und kann sich daher in seiner qualitativen und quantitativen Proteinzusammensetzung aufgrund veränderter Bedingungen selbst verändern. Des Weiteren beschreibt der Begriff Proteom im Vergleich zum Genom eine komplexere Informationsebene, nämlich eine Ebene der funktionellen Information. Während das Genom die Möglichkeiten beschreibt, zeigt das Proteom die tatsächlich vorhandene Funktion an. Veränderungen des Proteoms können sehr schnell erfolgen, zum Beispiel durch Phosphorylierungen und Dephosphorylierung von Proteinen, die im Rahmen der Signaltransduktion eine sehr wichtige Rolle spielen. Die Bedeutung von Proteomics als analytisches Werkzeug besteht in dem Potential, aus dem Gemisch der mehr als 10000 Proteine eines typischen Zellproteoms einzelne Proteine zu identifizieren, die mit Änderungen im Erscheinungsbild von Zellen verknüpft sein können. Dadurch werden Folgeuntersuchungen ermöglicht, um zu ermitteln, ob aus der beobachteten Korrelation ein Kausalzusammenhang abgeleitet werden kann.

1.3.2 Proteomforschung

Die Entschlüsselung des in seinen Zellen verborgenen Bauplans des Menschen, das Genom, ist abgeschlossen. Der nächste Schritt besteht nun darin, die vom Genom kodierten Bauteile, die Proteine, systematisch zu entziffern. Damit ist die Proteomforschung heute ein unverzichtbarer, integraler Bestandteil von Grundlagenforschung und krankheitsbezogener Forschung.

Ein wichtiges Werkzeug zur Identifikation der im Proteom enthaltenen Proteine ist die Massenspektrometrie. Im vorliegenden Versuch wurde dafür das MALDI-TOF-(Matrix-assisted laser-desorption ionization time of flight) Massenspektrometrieverfahren verwendet. Bei dieser Methode werden die zunächst zu Peptiden verdauten Proteine auf einem metallischen Träger zusammen mit UV-absorbierenden Molekülen kokristallisiert. Diese sogenannte Matrix schiebt man dann ins Hochvakuum des Massenspektrometers und bestrahlt sie mit einem UV-Laser Puls, wobei die eingebauten Peptidionen explosionsartig freigesetzt werden. Nach deren Beschleunigung in einem elektrischen Feld und nach Durchfliegen einer Vakuum-Flugröhre treffen die Peptide je nach ihrer Molekülgröße und Gesamtladung zu unterschiedlichen Zeiten auf den Flugzeitanalysator (TOF-Detektor) auf. Als TOF-Analysator verwendet man einen Ionendetektor, welcher die ankommenden Ionen in elektrische Energie umwandelt. Durch die Kombination der zwei Verfahren, erhält man schließlich den individuellen Fingerabdruck des untersuchten Proteins in Form eines unverwechselbaren Peptidspektrums. Mit Hilfe von bekannten Peptidspektren aus Datenbanken kann das zugehörige Protein dann identifiziert werden.

1.4 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Für viele neurologische Erkrankungen ist die Liquoranalyse heute ein wichtiges diagnostisches Routineverfahren. Bei der ALS selbst liegt ihre Bedeutung aktuell eher im Bereich der Differential- und Ausschlussdiagnostik. Zwar finden sich bei vielen ALS-Patienten Laborauffälligkeiten, diesen konnte bisher aber keine weitergehende Signifikanz zugeordnet werden. In den wenigen bisher veröffentlichten Proteomstudien zur ALS finden sich unterschiedliche Resultate für neu entdeckte Proteine. Dabei wurde jedoch oftmals nur mit sehr kleinen Patientenkollektiven gearbeitet, was die Aussagekraft der Ergebnisse zusätzlich einschränkt. Aufgrund dessen ist es bisher nicht möglich, die

Diagnose ALS mittels Liquoranalyse ausreichend zu stützen, eine Verlaufsprognose aufgrund der Liquorveränderungen zu erstellen und/oder eine nachhaltige, eventuell sogar individuell angepasste Therapie durchzuführen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, neue und/ oder veränderte Proteine im Liquor von ALS-Patienten im Vergleich zu neurologisch unauffälligen Patienten zu finden. Diese Proteine könnten dann in Zukunft als Biomarker dienen, um nicht nur eine bessere und sicherere Diagnosestellung, Prognose und Therapie zu ermöglichen, sondern auch um den Pathomechanismus der Erkrankung besser verstehen zu können.

2 Material und Methoden

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
Methanol reinst	Merck
Na-Acetat	AppliChem
Na-Carbonat	Merck
N, N –Dimethylformamid	Sigma-Aldrich
Na-EDTA (Natrium-Ethylendiamintetraessigsäure)	AppliChem
Na-Thiosulfat	Sigma
Roti® -Quant	Carl Roth GmbH

Roti®-Blue	Carl Roth Gmb
RPN 800	Amersham
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)	Serva
Silbernitrat	Fluka BioChemika
Temed (N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin)	Fluka BioChemika
Thioharnstoff	Merck
Tris (Trishydroxymethylaminomethane)	USB Corporation
Vaseline	Riedel-de Haën
Wasser, bidestilliert	Braun

2.2 Kits und IPG-Streifen

2-D 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

2.3.1 CyDye DIGE Fluor minimal dyes

Cy 2 (5nmol)

Cy 3 (5nmol)

Cy 5 (5nmol)

Amersham

2.3.2 Dye Stock Solution (1 nmol/μl):

Die Eppendorfreaktionsgefäße mit den CyDye DIGE Fluor minimal dyes wurden aus der Gefriertruhe genommen und 5 min lang ungeöffnet bei Raumtemperatur aufgetaut. 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 Dye Working solution (400 pmol/ μ l):

Zu jeweils 5 μ l Dye Stock Solution wurden je 7,5 μ l DMF pipettiert, anschließend kurz gevortext und zentrifugiert.

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

⇒ Der Puffer wurde in 850 ml ddH₂O gelöst. Danach wurde mittels pH-Elektrode der pH-Wert bestimmt und bis zum Erreichen des pH von 8,8 langsam konzentrierte Salzsäure (25%ig) dazugegeben, 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 Labellingpuffer:

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 Geräte2.5.1 Geräte:

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

2.5.2 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 (Eppendorfgefäß)	Eppendorf

2.7 Patientenproben

2.7.1: sALS-Proben

Es wurden 38 Patienten im Alter zwischen 29 bis 84 Jahren ausgewählt, wobei das Durchschnittsalter 61,2 Jahre betrug. Von den 38 Patienten waren 24 männlichen und 14 weiblichen Geschlechts. Verwendet wurden nur Proben von Patienten, bei denen die Diagnosesicherheit nach den El-Escorial-Kriterien (lit.) eine klinisch wahrscheinliche ALS (29 Patienten) oder eine klinisch definitive ALS (9 Patienten) ergab.

2.7.2: Kontrollen (K)

Verwendet wurden hierbei die Proben von 25 Patienten, wobei davon 13 männlichen und 12 weiblichen Geschlechts waren. Das Durchschnittsalter betrug 58,2 Jahre bei einer Gesamtspanne von 29-76 Jahren. Ausgewählt wurden hierfür Proben von Patienten mit unauffälligem Liquorbefund und keiner nachgewiesenen Erkrankung des zentralen oder peripheren Nervensystems.

Tabelle 1: Übersicht über die Klassifizierung der Liquorproben nach Alter, Geschlecht, sowie nach klinischen (entsprechend den Diagnosesicherheitsgraden der El Escorial Kriterien) und liquorologischen Parametern.

Bei den Kontrollproben erfolgte keine Angabe der Diagnosesicherheitsgrade nach den El Escorial Kriterien da sie für gesunde Patienten keine Relevanz haben.

[Abkürzungen: ALS = Amyotrophe Lateralsklerose, K = Kontrolle, l = Liter, mg = Milligramm]

	ALS-Proben	K-Proben
Anzahl (männlich/weiblich)	38 (24/14)	25 (13/12)
Alter (Jahre)	61,2 (29-84)	58,2 (29-76)
Gesamtprotein im Liquor (mg/l)	495,4 (184-1310)	429,2 (146-1050)
Diagnosesicherheit		
klinisch vermutete ALS	/	
klinisch mögliche ALS	/	
klinisch wahrscheinliche ALS	29	
klinisch definitive ALS	9	

2.8 Aufkonzentrierung

2.8.1 Vorbereitung:

Die bei -80°C gelagerten Liquorproben wurden aus dem Gefrierschrank genommen und während der gesamten Aufkonzentration auf Eis gelagert. Währenddessen wurde die Kühlzentrifuge auf 4°C vorgekühlt und die aus einem 5000 Da Filter-Cup und einem passenden 1,5 ml Zentrifugengefäß bestehenden „Ultrafree-MC Konzentrador Biomax 5000“ Filtereinheiten aus dem Kühlschrank entnommen. In das Zentrifugengefäß wurde ddH₂O vorgelegt, um ein Austrocknen des Filters während des Zentrifugationsvorganges zu verhindern.

2.8.2 Aufkonzentrierung:

Initial wurde jedes Zentrifugengefäß mit 300 µl ddH₂O befüllt, danach das Filter-Cup aufgesetzt und mit 450 µl Liquor befüllt. Im Anschluss wurde die Filtereinheit fest verschlossen und für 15 min bei 6800 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach jedem Zentrifugationsvorgang wurde die im Zentrifugengefäß gesammelte Flüssigkeit verworfen und erneut durch 300 µl ddH₂O aufgefüllt. Der Filter-Cup wurde wieder mit Liquor auf 450 µl aufgefüllt, anschließend wurde wieder für 15 min bei 6800 rpm zentrifugiert.

Die ganze Prozedur wurde so lange wiederholt, bis die Liquorprobe um den Faktor 30-35 aufkonzentriert war. Zum Abschluss der Aufkonzentrierung wurde das Konzentrat vorsichtig auf- und abpipettiert, um die Proteine vom Filter zu lösen, und in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt.

2.8.2 Lagerung:

Die aufkonzentrierten Liquorproben wurden bis zur weiteren Verwendung erneut bei -80°C gelagert.

2.9 Aufreinigung

Der menschliche Liquor enthält eine Vielzahl verschiedener Proteine, von denen Albumin und Immunglobulin G (IgG) dabei den Großteil des Gesamtproteins darstellen. Um während der 2-D-Gelelektrophorese eine Überlagerung dieser beiden Hauptproteine mit anderen Proteinen mit sehr ähnlichem isoelektrischen Punkt und Molekulargewicht zu vermeiden, und um im Gegenzug dazu die verbleibenden, potentiell interessanteren Proteine in höherer Konzentration auf das Gel auftragen zu können, wurden Albumin und IgG im folgenden Schritt aus dem Liquor entfernt.

2.9.1 Vorbereitung der Säule:

In einem ersten Schritt wurden zunächst die für die Abreicherung von IgG und Albumin verwendeten Säulen vorbereitet. Dazu wurde der „Aurum Serum Protein Mini Kit“ aus dem Kühlschrank entnommen und die darin enthaltenen Säulen für 5 Minuten in ein Teströhrchen gestellt, damit sich das Säulenmaterial absetzen konnte. Anschließend wurden sowohl der Deckel, als auch die Spitze der Säule entfernt, so dass sich der Inhalt durch den *gravity flow* in das darunter befindliche Teströhrchen entleeren konnte. Sobald die in Säule befindliche Flüssigkeit vollständig abgelaufen war, wurde die Säule zweimal mit je 1 ml Binding Buffer gespült. Der letzte Schritt der Vorbereitung bestand darin, die Säule in ein 2,0 ml Eppendorfreaktionsgefäß zu überführen und für 20 Sekunden bei 10000 g zu zentrifugieren, um die Säule vollständig von eventueller Restflüssigkeit zu befreien. Die Säulenspitze wurde dann wieder verschlossen und die Säule in ein frisches Eppendorfreaktionsgefäß überführt.

2.9.2 Bindung und Aufreinigung der Probe:

Die zwei wichtigsten Komponenten der Säule sind das Affi-Gel Blue und das Affi-Gel Protein A. Während Affi-Gel Blue die Kapazität besitzt bis zu 11 mg/ml Albumin zu binden, hat das vom *Staphylococcus aureus* stammende Affi-Gel Protein A die Fähigkeit, hochspezifisch die Fc Region der IgG Moleküle zu binden.

In dem nun folgenden zweiten Schritt wurden nun mit Hilfe der vorbereiteten Säulen, IgG und Albumin entfernt. Dazu wurden 60µl der aufkonzentrierten Liquorprobe mit 140µl Binding Puffer vermischt und anschließend auf die Säule gegeben. Um eine gute Verteilung der Probe zu erreichen, wurde die Säule kurz gevortext. Danach wurde die Säule für 5 Minuten ruhig stehen gelassen und anschließend erneut kurz gevortext. Dieser Vorgang wurde 3x wiederholt.

2.9.3 Sammeln der aufgereinigten Probe:

Die Spitze der Säule wurde nun entfernt und die Säule in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß gestellt und für 20 Sekunden bei 10000 g zentrifugiert. Das nun Albumin- und IgG-aufgereinigte Zentrifugat wurde im Eppendorfreaktionsgefäß gesammelt.

2.9.4 Lagerung:

Die aufkonzentrierten Liquorproben wurden bis zur weiteren Verwendung erneut bei -80°C gelagert.

2.10 Proteinbestimmung2.10.1 BSA-Stammlösung:

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

Tabelle 2: Pipettierschema für Standardverdünnungsreihe:

[Abkürzungen: µg = Mikrogramm; BSA = Bovines Serum Albumin; ddH₂O = bidestilliertes Wasser; ml = Milliliter]

BSA-Konzentration (µg/ml)	µl aus BSA-Stammlösungen	ddH ₂ O (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

2.10.2 Roti®-Quant-Verdünnung:

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

2.10.3 Durchführung:

Die Standardverdünnungsreihe wurde in Doppelbestimmung durchgeführt, die Patientenproben in Anbetracht des geringen Liquormaterials in Einzelbestimmung. Dazu wurden jeweils 50 µl auf eine 96-well Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurden 200 µl der Roti®-Quant-Verdünnung zu den vorgelegten Standards und Proben pipettiert und die Mikrotiterplatte für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wurde mit Hilfe eines ELISA-Messgerätes, das auf die folgenden Parameter eingestellt war, die OD bestimmt:

Messfilter: 595 nm

Referenzfilter: 405 nm

2.11 Protein-Präzipitierung

Bevor die 2-D-Gelelektrophorese begonnen werden konnte, war es notwendig, die Proteine auszufällen und danach in einem speziellen Fokussierpuffer aufzunehmen. Für die Proteinausfällung (Präzipitierung) wurde ein spezieller 2-D Clean-Up Kit verwendet, um gleichzeitig noch restliche Salze und andere, insbesondere die Isolelektrische Fokussierung störende Bestandteile wie Lipide, Nukleinsäuren und Detergenzien zu entfernen.

2.11.1 Vorbereitung

Wie in der 2-D Clean-Up Kit-Vorschrift empfohlen, wurde der Waschpuffer für 1 Stunde auf -20°C vorgekühlt und währenddessen die Proben auf Eis aufgetaut.

2.11.2 Durchführung

Jeweils 100 µl Liquorprobe wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben und anschließend 300 µl Präzipitant dazu pipettiert. Das ganze wurde dann kurz gevortext, für 15 Minuten auf Eis inkubiert und danach bei 13000 g zentrifugiert. Nach Beendigung des Zentrifugationsdurchgangs, wurde die überstehende Flüssigkeit, ohne das Pellet zu berühren, vorsichtig abpipettiert. Die Zentrifugation wurde wiederholt und erneut die überstehende Flüssigkeit abpipettiert. Anschließend wurden weitere 40 µl Co-Präzipitant auf das Proteinpellet pipettiert und der Ansatz für 5 Minuten auf Eis inkubiert, danach erneut für 5 Minuten bei 13000 g zentrifugiert und zum Schluss der Überstand abpipettiert. Es erfolgte nun eine Zugabe von 25 µl ddH₂O auf das Pellet, das Eppendorfgefäß wurde für 15 Sekunden gevortext. Es wurden 1 ml Waschpuffer und 5 µl Wash Additive dazu gegeben, und das Eppendorfgefäß so lange gevortext, bis das Pellet vollständig redispergierte. Danach wurden die Proben für 30 min bei -20°C inkubiert, wobei sie alle 10 min für 30 s gevortext wurden, anschließend nochmals zentrifugiert und in Labellingpuffer (s. 2.12.1) aufgenommen.

2.12 Labelling/ Farbstoffmarkierung

Labellingpuffer: siehe 2.4.6

Dye Working Solution: siehe 2.3.3

Als Vorbereitung wurde die Zentrifuge auf 4°C gekühlt.

Die Farbstoffmarkierung der Liquorpools erfolgte im Dunkeln und auf Eis.

2.12.1 Aufnehmen der Proben in Labellingpuffer:

Der Labellingpuffer wurde im Verhältnis 1:6 den Proben zugesetzt, das heißt auf je 6µg Protein wurde 1µg Labellingpuffer pipettiert.

Für die 2-D DIGE Versuche wurden anschließend jeweils alle ALS-Einzelproben zu 1 ALS-Probenpool und alle Normalbefundproben zu 1 NB-Probenpool vereint. Diese Pools lieferten genügend Material für insgesamt 3 Gele.

2.12.2 Bildung des Internen Standarts (IS):

Der Interne Standard (IS) besteht zu jeweils der Hälfte aus Material des ALS-Pools und des Normalbefund-Pools.

2.12.3 Labelling/ Farbstoffmarkierung der Probenpools:

Die verwendeten CyDye-Farbstoffe werden mit ihrer N-Hydroxysuccinimid (NHS) reaktiven Gruppe über eine Amidverbindung an die Lysinreste des Proteins gebunden. Die erreichbare Sensitivität der Farbstoffmarkierung ist abhängig vom Verhältnis Protein- zu Farbstoffmenge. So ist es möglich, einen einzelnen Lysinrest pro Protein zu markieren. Dies wird dann auch als „minimal labelling“ bezeichnet.

Für den vorliegenden Versuch wurden jeweils 400 pmol Farbstoff für 50µg Protein verwendet. Die Proben wurden mit der errechneten Menge Dye Working Solution versetzt Materialien und Methoden, gevortext, kurz zentrifugiert und 30 min auf Eis gelabelt. Bei einem der drei Gele wurden die Proben zur Kontrolle in anderer Farbstoffreihenfolge markiert (K mit Cy5; ALS mit Cy3).

Tabelle 3: Zuordnung der Farbstoffe zu den Proben

Cy2, Cy3, Cy5 sind die verwendeten CyDye-Farbstoffe.

[Abkürzungen: ALS = Amyotrophe Lateralsklerose]

Probenart	Farbstoff/ Dye Working Solution
Kontrolle	Cy3
ALS	Cy5
Interner Standart (IS)	Cy2

Die Reaktion wurde anschließend gestoppt durch Zugabe von 2,4 µl einer 10 mM Lysin-stocklösung, das ganze anschließend gevortext, kurz zentrifugiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Proben wurden entweder sofort weiterverwendet oder erneut bei -20°C gelagert.

2.12.4 Pipettierschema:Tabelle 4: Pipettierschema (pro Gel):

Cy2, Cy3, Cy5 sind die verwendeten CyDye-Farbstoffe.

[Abkürzungen: μg = Mikrogramm, μl = Mikroliter; ALS = Amyotrophe Lateralsklerose, IS = Interner Standard, K = Kontrolle, mM = MilliMol]

Probenpool	Protein/Probe [μg]	Probenpool [μl]	(400 μmol) Dye Working Solution [μl]	(10 mM) Lysin [μl]	Endvolume n [μl]
K	50 μg	8,33 μl	1 μl Cy3	2,4 μl	11,73 μl
ALS	50 μg	8,33 μl	1 μl Cy5	2,4 μl	11,73 μl
IS	25 μg K 25 μg ALS	4,17 μl K 4,17 μl ALS	1 μl Cy2	2,4 μl	11,73 μl

2.13 Rehydratisierung mit Probe

Zuerst wurde der bei -20°C gelagerte Fokussierpuffer (Lysepuffer) aufgetaut und mit 2 mg DTT, zur Reduktion der Disulfidbrücken, pro 500 μl Fokussierpuffer versetzt. Die farbstoffmarkierten Proben wurden dann im Anschluss mit dem Puffer auf ein Gesamtvolumen von 340 μl je 18 cm langen IPG-Streifen aufgefüllt. Für die Rehydratisierung wurde der Protean IEF Cell von Bio-Rad verwendet. Die 340 μl Gesamtvolumen (Puffer + Probe) wurden in das jeweilige Tray pipettiert und der IPG-Streifen mit der Gelseite nach unten in das entsprechende Tray eingebracht. Als nächstes wurde durch gleichmäßiges Hin- und Herbewegen die Gelschicht des IPG-Streifens vollständig und luftblasenfrei mit der Flüssigkeit bedeckt.

Abschließend wurde der IPG-Streifen mit 1,5 ml Dry Strip Cover Fluid überschichtet, um ein Austrocknen der IPG-Streifen mitsamt Probenmaterial zu verhindern und gleichzeitig eine gleichmäßige Temperaturverteilung zu gewährleisten.

Die Rehydratisierung erfolgte dann aktiv bei 50 V für 20 Stunden, um ein mögliches vollständiges Eindringen auch größerer Proteine ins Gel zu gewährleisten.

2.14 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die IEF dient, wie der Name es schon nahe legt, der Auftrennung der Proteine nach ihrem isoelektrischem Punkt. Vor dem eigentlichen Starten der IEF wurden pro IPG-Streifen je 2 mit ddH_2O befeuchtete Filterpapiere an die Pole zwischen Streifen und Elektrodendraht geschoben. Dies diente der Entfernung noch restlicher Salzmengen in den Proben. Anschließend folgte das Einsetzen des Trays in die Protean IEF Cell und der Start des Fokussierprotokolls. Die IEF erfolgte bei einer konstanten Temperatur von 20°C .

Tabelle 5: Fokussierprotokoll:

[Abkürzungen: h = Stunde, IEF = Isoelektrische Fokussierung, V = Volt]

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

2.15 Vertikale (2D-)Gelelektrophorese

Mittels der vertikalen Gelelektrophorese wurden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

2.15.1 Herstellung der Gele:

Zu Beginn wurde die Glasplattensätze welche zur Herstellung der Gele verwendet wurden, mit Baktolin gewaschen und mit ddH₂O gründlich abgespült und luftgetrocknet. Dies sollte die Verunreinigung der Gele durch Rückstände auf den Glasplattensätzen vermeiden.

APS-Lösung: 1 g APS wurde mit ddH₂O auf 10 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzt.

Temed-Lösung: 100 µl Temed wurden mit 900 µl ddH₂O gemischt. Die Lösung wurde unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzt.

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 dazugeben:

APS	6ml
Temed	1ml

Die Gele wurden mit Hilfe eines Trichters in die vorbereitete Glasplattensätze gegossen, mit einer dünnen Schicht Butanol überschichtet und 60 min zum Auspolymerisieren bei Raumtemperatur unter einem Abzug stengelassen. Anschließend wurde das Butanol vorsichtig abgegossen und die offene Gelseite gut mit ddH₂O gespült. Die Gele wurden bis zu ihrer Verwendung in feuchte Tücher eingeschlagen und im Kühlschrank aufbewahrt.

2.15.2 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.

2.15.3 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) hinzugefügt und kurz in der Mikrowelle aufgeköcht.

Marker: 10 µl des RPN 800 wurden auf ein Filterpapier pipettiert und bei RT luftgetrocknet.

2.15.4 Äquilibrierung des IPG-Streifens:

Für die Darstellung der zweiten Dimension ist es unerlässlich, die IPG-Streifen zu äquilibrieren. 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 Äquilibrierungspuffer gelöst.

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

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

2.15.5 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 möglichst mittig auf Gelkontakt geschoben. Nach dem Aufbringen des IPG-Streifens wurde das mit dem Marker getränkte Filterpapier direkt am Pluspol des Streifens ebenfalls mit einem Spatel auf das Gel geschoben. Abschließend wurde die auf ca. 60°C erkaltete Agaroselösung vorsichtig und luftblasenfrei mittels Pipette über Streifen und Marker geschichtet, und zur Aushärtung stehengelassen.

2.15.6 Elektrophorese und anschließende Fixierung der Gele:

Das Ettan DALT Elektrophoresesystem besteht aus der Ettan DALTsix Elektrophoresis Unit, einem Transformator und einer zirkulierenden Kühlanlage. Es ermöglicht es maximal 6 Gele gleichzeitig laufen zu lassen. Wird ein Lauf mit weniger als 6 Gelen durchgeführt, werden die unbesetzten Plätze der Kammer mit speziellen Kunststoffplatten aufgefüllt. Nach Einbau der Gele erfolgt das Auffüllen der unteren Kammer mit 1x SDS Elektrophoresepuffer und der oberen Kammer mit 2x SDS Elektrophoresepuffer.

Nach Anschließen des Kühlaggregats (20°C) wurde der Lauf bei einer Leistung von 38 W gestartet. Die Elektrophorese wurde etwa 4 Stunden laufen gelassen, bis die Lauffront nur noch etwa 1 cm vom unteren Ende des Geles entfernt war. Nach Beendigung der

Elektrophorese wurden die Gele in den Glasplatten mit dest. H₂O gewaschen, fuselfrei getrocknet, gescannt und ausgewertet.

2.16 Scannen und Auswerten

2.16.1 Scannen:

Die fixierten Gele wurden mit dem Ettan DIGE Imager von Amersham gescannt.

Dabei wurden folgende Emissionsfilter verwendet:

Cy2 (IS):	488/ 520 nm
Cy3 (Kontrolle):	532/ 580 nm
Cy5 (ALS):	633/ 670 nm

2.16.2 Auswertung:

Für die Auswertung der Gele wurde die DeCyder™ Differential Analysis Software (Version 5.0) verwendet, welche die gleichzeitige Detektierung der verschiedenen farbstoffmarkierten Proben im selben Gel erlaubt. Dabei werden von der Software aus den gemessenen Volumenverhältnissen der einzelnen Spots Histogramme erstellt.

Zur Darstellung der Unterschiede zwischen den kranken Proben und den Kontrollproben in einem Gel wurden jeweils Cy2 und Cy3 bzw. Cy2 und Cy5 miteinander verglichen. Die Vergleichbarkeit der 3 Gele wurde durch die Verwendung des internen Standards gesichert.

Dies war notwendig, um eventuell falsch positive Varianzen zwischen den kranken und K-Proben im selben Gel auszuschließen. Dadurch wurde die Messung selbst sehr kleiner Proteinhemgendifferenzen mit großer Zuverlässigkeit ermöglicht.

2.16.3 Statistik

Um die Signifikanz der Ergebnisse zu bestimmen, wurde der Student-T-Test verwendet. Beim t-Test wird die Gleichheit bzw. Unterschiedlichkeit der zu vergleichenden Gruppen an einem Parameter gemessen, und zwar an dem Erwartungswert. Dazu wurde als erstes die Nullhypothese aufgestellt das sich die Proteinkonzentrationen zwischen Normalbefund- und ALS-Gruppe nicht unterscheiden. Das Ziel ist es dann, diese Nullhypothese verwerfen zu können. Voraussetzung für die Verwendung des T-Tests ist das Vorliegen von

mindestens 2 Datenpunkte je Gruppe, wobei die Validität des Ergebnisses umso größer wird, je mehr Datenpunkte pro Gruppe vorhanden sind. Bei der Bestimmung von Proteinkonzentrationsveränderungen geht man im allgemeinen davon aus, dass sie signifikant sind wenn der P-Wert $\leq 0,05$ ist.[29]

2.17 Coomassie-Blue-Färbung

Nach dem Scannen der Gele erfolgte die Visualisierung der Proteine mittels colloidalen Coomassie-Blue-Färbung. Dazu wurde als erstes die Färbelösung hergestellt. Pro Gel wurden 300 ml ddH₂O, 100 ml Methanol und 100 ml gut aufgeschüttelte Roti®-Blue Lösung vermischt.

Die Gele wurden dazu aus den Glasplatten entnommen, einzeln in eine Glaswanne gelegt und die 500 ml Färbelösung über Nacht auf dem Schüttler gefärbt. Am nächsten Morgen wurde die Färbelösung vorsichtig aus der Glaswanne abgeschüttet und die Gele mit einer Lösung bestehend aus 100 ml Methanol und 300 ml ddH₂O für 10 Minuten gewaschen. Abschließend wurden die Gele in einer 10%igen Glycerol/H₂O-Lösung, um ein Austrocknen zu vermeiden, in Folie eingeschweißt und zur massenspektrometrischen Analyse an die Firma TOPLAB GmbH, Martinsried, verschickt.

2.18 Massenspektrometrische Auswertung

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

2.18.1 Trypsin-Verdauung:

Die mittels Decyder Software ausgewählten mindestens 1,3-fach hoch- oder herunterregulierten Proteinspots wurden manuell aus den DIGE-Gelen gepickt, in verschiedene Eppendorfgefäße gefüllt und anschließend je 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 folgenden Schritt wurde 1 µl einer Protease-Lösung (0,05 µl/µg Trypsin in 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{HCO}_3$) hinzugefügt. Abschließend wurde für weitere 30 Minuten 5 µl NH_4HCO_3 – Puffer (10 mM in 30% Acetonitril) hinzugefügt. Die gepickten Gelspots wurden dann bei einer Temperatur von 37°C über Nacht verdaut.

2.18.2 MALDI-time-of-flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS):

Für die MALDI-TOF-MS Analyse wurden 0,1-0,5 ml Trypsin-Peptidlösungen auf die MALDI Probenplatten gegeben und nach 5 min mit DHBS-Matrix (einer Mischung aus 20 mg 2,5-Dihydroxybenzolsäure (DHBS) mit 1 ml 20% Acetonitril/ 0,1% TFA und 20 mg 2-Hydroxy-5-Methoxybenzolsäure (HMB) in 1 ml Acetonitril/ 0,1% TFA im Verhältnis 9:1) im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Peptidmischungen wurden mit einem MALDI TOF 4800 Analyser-Massenspektrometer von Applied Biosystems gemessen. Jedes Spektrum wurde mittels der monoisotopisch protonierten Massen der durch Trypsin verdauten Peptide, als Eichreihe für die zu messenden Probenmassen, intern kalibriert.

2.18.3 Protein-Identifizierung:

Die gemessenen m/z Werte zwischen 700 und 4200 wurden an ProFound, Version 2004.01.26 zur Spektralanalyse (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.

3 Ergebnisse

Für den Versuch wurden insgesamt drei 2D-DIGE-Gele angefertigt, um Unterschiede im Liquor zwischen der Kontrollgruppe und der ALS-Patienten-Gruppe nachweisen zu können. Die Liquorproben wurden nach den oben beschriebenen Verfahren auf- und vorbereitet. Auffällige Spots mit Abweichungen zwischen der Kontroll- und ALS-Gruppe wurden nach der Coomassie-Blue-Färbung gepickt und mittels Massenspektrometrie und Referenzdatenbankabgleich identifiziert.

3.1 Darstellung der gefundenen Spots auf den Gelen

3.1.1 Ergebnis nach Einscannen durch den Typhoon™ Variable Mode Imager:



Abbildung 3: Original 2D-DIGE-Gel von gepoolten ALS- und normalen Kontrollproben
[Abkürzungen: ALS = Amyotrophe Lateralsklerose, 2D-DIGE = Zweidimensionale „difference-in-gel-electrophoresis“]

3.1.2 Mittels DeCyder Differential Analysis Software ausgewertetes ALS-Gel:

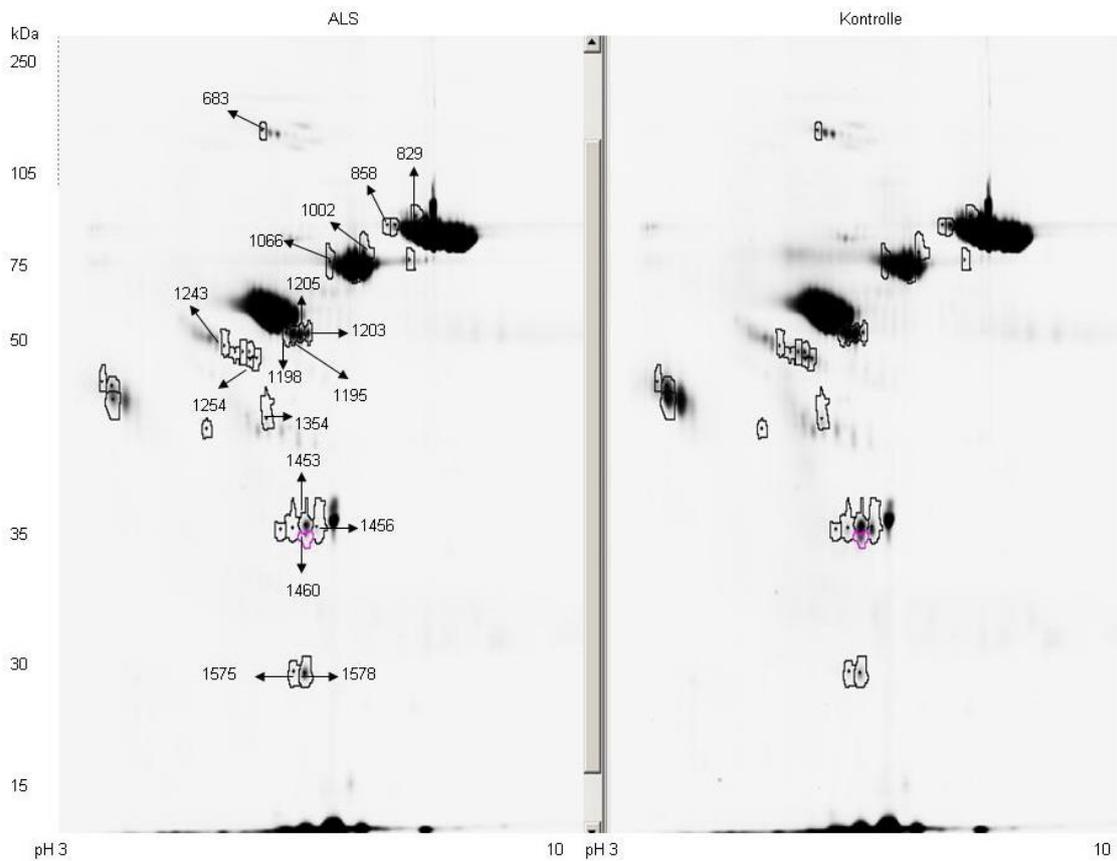


Abbildung 4: Ansicht der identifizierten Spots nach Analyse mittels DeCyder Differential Analysis Software

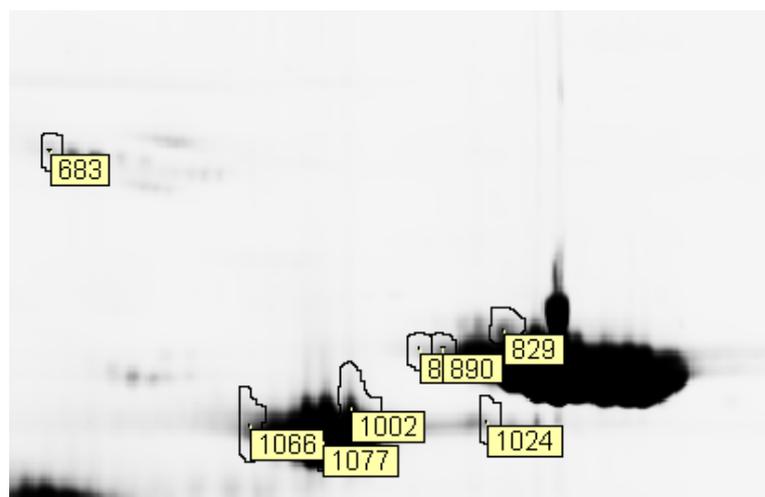


Abbildung 5: Darstellung des oberen Gelausschnittes mit den zugewiesenen Spotnummern



Abbildung 6: Darstellung des unteren Gelausschnittes mit den zugewiesenen Spotnummern

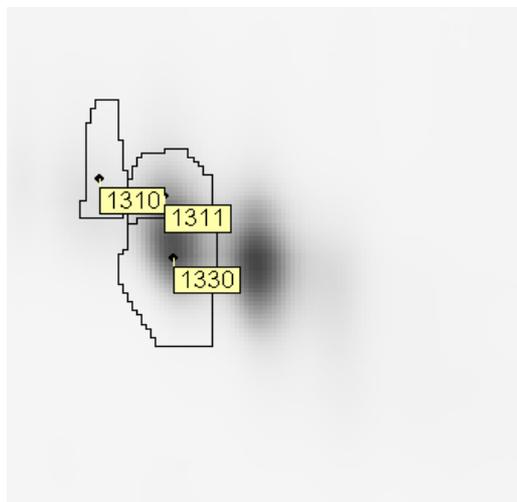


Abbildung 6a:

vergrößerte Darstellung des unteren Gelausschnittes mit den zugewiesenen Spotnummern

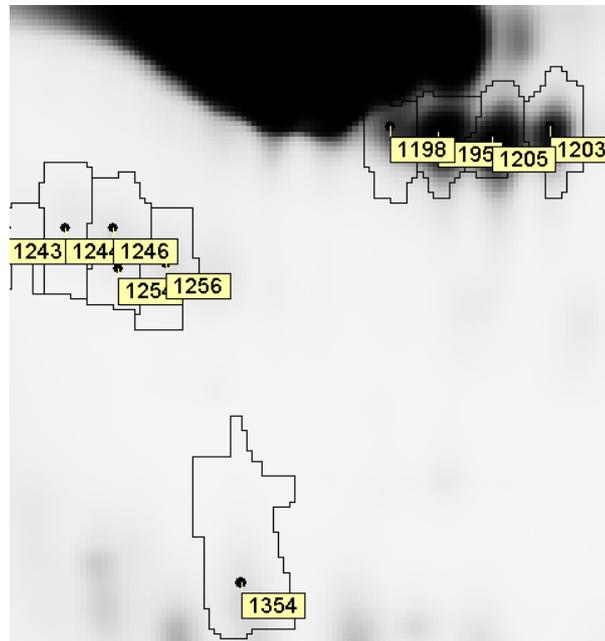


Abbildung 6b: vergrößerte Darstellung des unteren Gelausschnittes mit den zugewiesenen Spotnummern

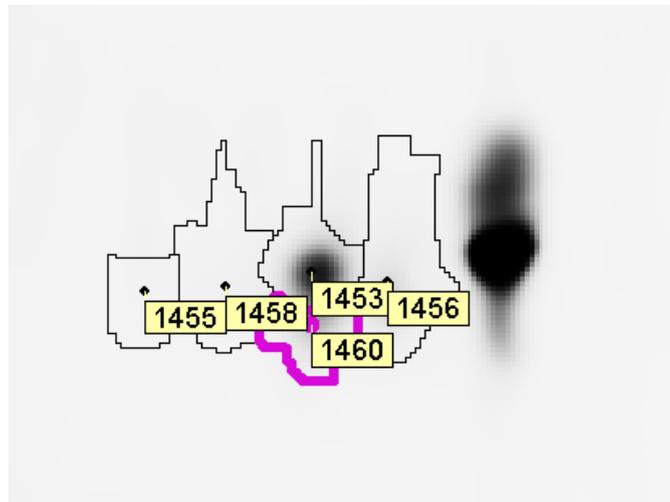


Abbildung 6c: vergrößerte Darstellung des unteren Gelausschnittes mit den zugewiesenen Spotnummern

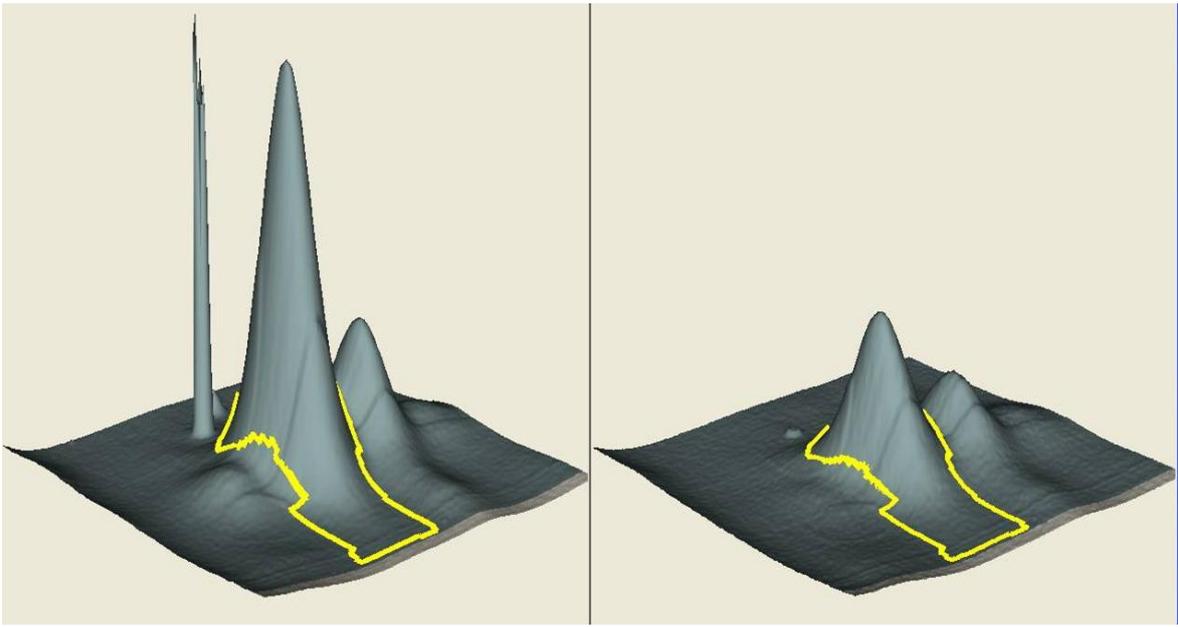


Abbildung 7: Darstellung eines herunterregulierten Proteinspots mittels DeCyder Software am Beispiel des Proapolipoproteins [links Kontrolle; rechts ALS] [Abkürzungen: ALS = Amyotrophe Lateralsklerose]

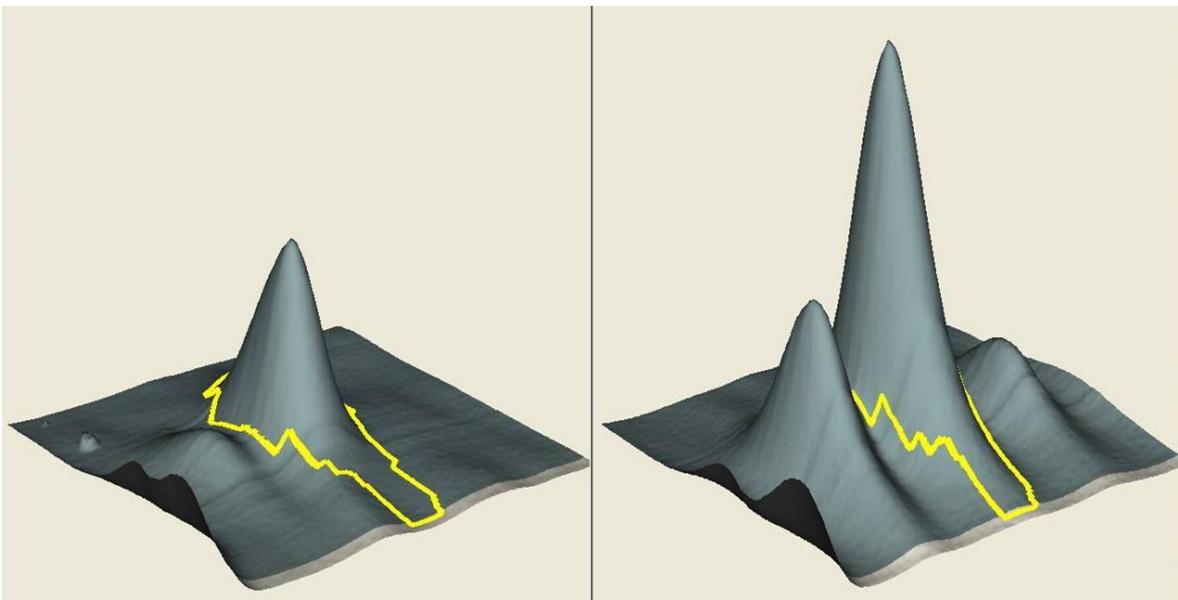


Abbildung 8: Darstellung eines hochregulierten Proteinspots mittels DeCyder Software am Beispiel des Transthyretins [links Kontrolle; rechts ALS] [Abkürzungen: ALS = Amyotrophe Lateralsklerose]

3.2 Darstellung der gefundenen Proteine bei ALS:

In den drei 2D-DIGE-Gelen mit den gepoolten Liquorproben von ALS-Patienten und der Kontrollgruppe wurden im Durchschnitt 2241 Proteinspots gefunden. Davon stellten sich 1702 Proteinspots mit gleicher Konzentration in den ALS- und Kontrollproben dar, während 145 Proteinspots als herunter- und 394 als hochreguliert dargestellt wurden.

Tabelle 6: Darstellung der gefundenen Spots, nach Regulation aufgetrennt

[Abkürzungen: ALS = Amyotrophe Lateralsklerose, K = Kontrolle]

	Gel 1 Anzahl/ [Prozent]	Gel 2 Anzahl/ [Prozent]	Gel 3 Anzahl/ [Prozent]	Durchschnitt Anzahl/ [Prozent]
Gesamtzahl	2043 [100%]	2538 [100%]	2141 [100%]	2241 [100%]
gleiche Konzentration	1464 [71,6%]	1997 [78,7%]	1645 [76,8%]	1702 [76%]
Hochreguliert (ALS zu K)	375 [18,4%]	441 [17,4%]	366 [17,1%]	394 [17,5%]
Herunterreguliert (ALS zu K)	204 [10,0%]	100 [3,9%]	130 [6,1%]	145 [6,5%]

Davon wiesen 17 Spots einen signifikanten, um mindestens 1,3-fachen Konzentrationsunterschied zwischen ALS und Kontrollen in allen drei Gelen auf. Diese 17 Spots konnten 8 verschiedenen Proteinen zugeordnet werden. Von den 8 identifizierbaren Proteinen waren 2 herunterreguliert, und zwar Vitamin D-binding protein precursor Isoformen und Proapolipoprotein. 6 weitere Proteine waren heraufreguliert, im einzelnen: Alpha1-Antitrypsin, Serum Vitamin D-binding Protein Precursor Isoformen, Carboxypeptidase E Precursor, Transthyretin, Amyloid Fibril Protein und Alpha-2-HS-Glycoprotein.

Tabelle 7: Darstellung der gefundenen Proteine bei ALS(Spotnummer, p-Wert, Regulationsfaktor (+ bedeutet: hochreguliert in ALS, - bedeutet: herunterreguliert in ALS)

[Abkürzungen: ALS = Amyotrophe Lateralsklerose]

Proteinname	Spotnummer	p-Wert signifikant wenn $p \leq 0,05$	Regulationsfaktor
Alpha1-Antitrypsin	683	0,0044	+1,36
Serum Vitamin D-binding Protein Precursor	1205	0,023	+1,31
Serum Vitamin D-binding Protein Precursor	1198	0,00077	+1,37
Carboxypeptidase E Precursor [Homo sapiens]	1354	0,0032	+1,38
Transthyretin (Prealbumin, Amyloidosis Type I)	1453	0,024	+1,55
Amyloid Fibril Protein=Transthyretin- related [human, Peptide Mutant, 127 aa]	1456	0,00013	+2,95
Transferrin [Homo sapiens]	890	0,011	+1,48

Fortsetzung der tabellarischen Darstellung der gefundenen Proteine bei ALS:

Proteinname	Spotnummer	p-Wert signifikant wenn $p \leq 0,05$	Regulationsfaktor
Vitamin D binding Protein Precursor [Homo sapiens]	1195	0,0048	+2,35
Alpha-2-HS- Glycoprotein [Homo sapiens]	1254	0,0039	+4,05
Transthyretin	1460	0,037	+1,87
Vitamin D-binding Protein Precursor	1203	0,00012	-1,45
Proapolipoprotein	1575	0,0073	-1,28
Proapolipoprotein	1578	0,0012	-1,79
Alpha1-Antitrypsin	1243	0,00074	+4,12
Transferrin [Homo sapiens]	858	0,02	+1,53

Tabelle 8: Darstellung der gefundenen Proteine bei ALS(Spotnummer, GenBank ID, theoretische Masse/pH, experimentelle Masse/pH)

[Abkürzungen: ALS = Amyotrophe Lateralsklerose, GenBank ID = Identifikationsnummer der GenBank, pH = potentia Hydrogenii]

Proteinname	Spotnummer	GenBank ID	Theoret. Masse/ pH	Experiment. Masse/ pH
Alpha1-Antitrypsin	683	1942629	44,28/5,4	43/5,1
Serum Vitamin D-binding Protein Precursor	1205	181482	54,61/5,4	52/5,6
Serum Vitamin D-binding Protein Precursor	1198	181482	54,61/5,4	55/5,4
Carboxypeptidase E Precursor [Homo sapiens]	1354	4503009	53,51/5,0	52/4,9
Transthyretin (Prealbumin, Amyloidosis Type I)	1453	15991	13,84/5,5	13/5,6
Amyloid Fibril Protein=Transthyretin-related [human, Peptide Mutant, 127 aa]	1456	255208	13,84/5,4	12/5,7
Transferrin [Homo sapiens]	890	31415705	79,28/6,8	81/6,4
Vitamin D binding Protein Precursor [Homo sapiens]	1195	32483410	54,48/5,3	56/5,4

Fortsetzung der tabellarischen Darstellung der gefundenen Proteine bei ALS:

[Abkürzungen: ALS = Amyotrophe Lateralsklerose, GenBank ID = Identifikationsnummer der GenBank, pH = potentia Hydrogenii]

Proteinname	Spotnummer	GenBank ID	Theoret. Masse/ pH	Experiment. Masse/ pH
Alpha-2-HS-Glycoprotein [Homo sapiens]	1254	29387000	40,1/5,4	42/5,6
Transthyretin	1460	339685	12,84/5,3	11/5,5
Vitamin D-binding Protein, Precursor	1203	34785355	54,5/5,3	56/5,7
Proapolipoprotein	1575	178775	28,94/5,5	29/5,4
Proapolipoprotein	1578	178775	28,94/5,5	29/5,4
Alpha 1-Antitrypsin	1243	1942629	44,28/5,4	45/4,6
Transferrin [Homo sapiens]	858	31415705	79,28/6,8	78/6,4

3.3 Tabellarische Darstellung der natürlichen Funktionen der gefundenen Proteine:

Tabelle 9: Darstellung der natürlichen Funktionen der gefundenen Proteine

[Abkürzungen: HDL = High Density Lipoprotein]

Proteinname (Synonym)	Physiologische Funktion
Alpha 2-Heremans-Schmid Glycoprotein (Fetuin)	Regulation des Knochenwachstums und Hemmung der Kalzifizierung, Beteiligung an Zell-Zell-Interaktionen, Gewebemorphogenese, Immunreaktionen und Entzündung
Proapolipoproteine (Vorstufe Apolipoprotein-A1)	Vorstufe des Apolipoproteins-A1 Bestandteil des HDL, Kontrolle der Lipid- Homöostase in peripheren Zellen, Cholesterintransport in und aus Neuronen
Transferrin (Beta-1 Globulin)	Eisenbindung
Transthyretin (Präalbumin)	Synthese im Plexus choroideus; Prävention der Amyloid- β -fibrillogenese
Vitamin D-binding Protein	Bindung von Vitamin D und monomerem Aktin; Regulator des Immunsystems
Carboxipeptidase E Precursor	Beteiligung an der Biosynthese einer Vielzahl von Peptidhormonen und Neurotransmittern
Amyloid Fibril Protein= Transthyretin related [human, Peptide Mutant, 127 aa]	pathologischer niedermolekularer Eiweißkörper, der eine β -Faltblattstruktur aufweist
Alpha1-Antitrypsin	Akute-Phase-Protein; Serinproteinaseinhibitor im Serum; Suppressor der Hämoxxygenase 1

4 Diskussion

4.1 Einleitung

Der Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Frage, ob sich im Liquor cerebrospinalis von ALS-Patienten spezifische Biomarker identifizieren lassen, mit denen sich eine Liquorbefund-gestützte Diagnose erstellen lässt. Des Weiteren war von Interesse, inwieweit sich die Konzentrationsveränderungen der herauf- oder herunterregulierten Proteine in die bisher bereits bekannten Daten einfügen oder ergänzen lassen.

4.2 Diskussion der Methodik

4.2.1 Auswahl der Patienten

Es wurden die Liquorproben von insgesamt 63 Patienten aus der Neurologischen Universitätsklinik verwendet, davon gehörten 38 in die ALS- und 25 in die Kontrollgruppe. Die Zuteilung in die Gruppen erfolgte anhand der in den Arztbriefen der Patienten erhobenen Befunde. Die recht hohe Anzahl der verwendeten ALS-Proben ergab sich aus der teilweise geringen Liquormenge der Einzelproben.

Der ideale Patient in der Kontrollgruppe würde über keinerlei Erkrankungen verfügen und wäre auf alle Erkrankungen, die eine Veränderung in der Proteinliquorkonzentration hervorrufen könnten, getestet worden. Der ideale Patient in der ALS-Gruppe würde über keine Komorbiditäten verfügen und wäre ebenfalls auf alle möglichen Krankheiten getestet worden, um eine Beeinflussung der Ergebnisse auszuschließen. In der Realität existiert aber eine enorme biologische Variabilität zwischen den einzelnen Patienten, die noch zusätzlich durch Faktoren wie Alter, Geschlecht etc. beeinflusst werden.[50] Die tatsächliche komplette Durchtestung der Testpersonen würden einen sehr großen logistischen als auch finanziellen Aufwand bedeuten.

4.2.2 Vorbereitung der Proben

Vor der Gelelektrophorese wurden die Proben aufkonzentriert, gereinigt, die Proteinmenge bestimmt und das Protein präzipitiert, mit Farbstoff markiert und der isoelektrischen Fokussierung unterzogen.

Die Aufkonzentrierung und Entsalzung erfolgte mit 5 kDa Millipore UltrafreeMC Filtereinheiten. Im Gegensatz zum Blutplasma weist der Liquor eine deutlich höhere Salzkonzentration auf. Das Salz kann sowohl Probleme bei der isoelektrischen Fokussierung verursachen, als auch die Visualisierung bei der Gelelektrophorese beeinträchtigen.[13] Daher ist dieser Schritt unerlässlich.

Im nächsten Schritt wurden Albumin und IgG aus dem Liquor entfernt, da allein das Albumin etwa 50% der Proteinmenge im Liquor ausmacht und so andere Proteine maskiert.[42] Mit dem von uns verwendeten Aurum Serum Protein Mini Kit ist es möglich, den größten Teil der im Liquor enthaltenen Menge an Albumin und gleichzeitig auch das in größerer Menge vorkommende IgG zu entfernen. Wichtig ist dabei das Einhalten des Zeitfensters, da eine längere Behandlung mit dem Aurum Serum Protein Mini Kit zu einem erhöhten Verlust an weiteren Proteinen führen kann.[2] Als Nachteil der Albuminentfernung wird in mehreren Studien benannt, das kleinere und nur in geringen Mengen vorhandene Proteine und Proteinfragmente an das Albumin gebunden, herausgefiltert werden.[24;65] Im Endeffekt überwiegen die Vorteile der Albuminentfernung die Nachteile deutlich, da ohne die Entfernung des Albumins die Identifizierung eines Großteils der Proteine nicht möglich gewesen wäre. In einer Studie zur Serumproteinanalyse wird die Verwendung von 20% Azetonnitrat vorgeschlagen, um die Proteinbindung zwischen Albumin und kleineren Proteinen aufzulösen.[58] Ob diese Methode ohne weiteres auf den Liquor übertragbar ist und ob es einen Vorteil gegenüber der in dieser Dissertation verwendeten Methode bringt, müsste in nachfolgenden Versuchen überprüft werden.

Durch das Poolen der Proben sollten die inter-individuellen Unterschiede der Patientenproben bedingt durch den heterogenen Verlauf der Erkrankung sowie auch durch nicht ALS-bedingte externe Einflüsse limitiert werden. Ein weiterer Vorteil des Poolens besteht darin, mögliche Messungenauigkeiten bei der Proteinbestimmung der Einzelproben auszugleichen.

Die Proteine in den Liquorproben wurden mit Cy5-Farbstoffen markiert. Dies ermöglichte die Auftragung von ALS-Proben, Kontrollproben sowie auch einem internen

Standard zur experimentellen Kontrolle gleichzeitig auf einem Gel. Der Vorteil der Verwendung eines internen Standards besteht in der besseren Vergleichbarkeit der verschiedenen Gele (wenn sie aus dem selben Probenpool bestückt werden) und der daraus resultierenden genaueren Auswertung mit der DeCyder Software.[3] Ein weiterer Vorteil der CyDye-Farbstoffmarkierung liegt in deren hoher Sensitivität und der im Vergleich zu anderen Markierungstechniken relativ hohen Geschwindigkeit mit der sie ausgeführt werden kann.[51] Ein Problem was beim Labeln der Proteine mit Farbstoffen beschrieben wurde, ist die Änderung der säurebasierenden Eigenschaften der Proteine durch diese.[54] Dies scheint aber nicht für die CyDye-Farbstoffe zu gelten, da diese positiv geladen sind, dadurch an die Lysinreste der Proteine binden und deren positive Ladung ersetzen. Dadurch bleibt die Ladung der Proteine im Gesamten konstant.[59]

4.2.3 Gelelektrophorese

Die 2-D DIGE Gelelektrophorese basiert darauf, dass auf einem Gel 2 verschiedene Proteinproben, welche mit verschiedenen fluoreszierenden Farbstoffen markiert wurden, aufgebracht werden und so den direkten Vergleich zwischen diesen Proben erlaubt. Der Vorteil dieser Methode liegt darin dass jedes Protein im jeweiligen Experiment ein spezifisches Signal hat und so mittels der Auswertungssoftware ein direkter Vergleich zwischen 2 Proben möglich ist. Weitere Vorteile sind eine hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, eine einfache und genauere Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen Proben, sowie eine relativ hohe Geschwindigkeit bei der Analyse der Gele.[26] Den Vorteilen des Verfahrens wie eine hohe Sensitivität und Präzision, stehen Nachteile wie hohe Kosten für Farbstoffe, Hardware und Software, sowie der relativ hohe Aufwand bei der Etablierung der Methode gegenüber.

4.3 Diskussion der Ergebnisse

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden gepoolte Liquorproben von 38 ALS-Patienten und 25 Kontrollpatienten verwendet. Es fanden sich insgesamt 9 identifizierbare Proteine, die mindestens einen Konzentrationsunterschied von 1,3 aufwiesen und statistisch signifikant ($p < 0.05$) in allen drei Gelen gefunden worden sind. Von diesen 8 Proteinen waren in den ALS-Proben 6 herauf- und 2 herunterreguliert. Im Folgenden soll nun auf die einzelnen Proteine und deren Stellenwert in der ALS-Diagnostik eingegangen werden.

4.3.1 Transthyretin

Transthyretin, früher auch als Präalbumin bezeichnet, wird in der Leber und dem Plexus choroideus gebildet. Neben seiner Funktion als negatives Akute-Phase-Protein, dient es noch als Transportprotein für je 2 Moleküle Thyroxin oder Trijodthyronin. Im Liquor von ALS Patienten sind bisher nur Konzentrationsverringerungen[43] beschrieben worden. Im vorliegenden Versuch konnten 2 Transthyretinisformen identifiziert werden, deren Konzentrationen um den Faktor 1,55 beziehungsweise 1,87 erhöht waren. Ob es beim Transthyretin eventuell zu Konzentrationsveränderungen im Krankheitsverlauf kommt, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht geklärt. Bei einer anderen neurodegenerativen Erkrankung, dem Morbus Alzheimer, wurden im Liquor ebenfalls erhöhte Werte von Transthyretin gefunden. Dabei wird Transthyretin als Hemmer der Amyloid- β -fibrillognese interpretiert.[23] Für die ALS gibt es neben Mausmodellen mit SOD-1 Defekten, welche in Folge zu Amyloid- β -ablagerungen führen[32] auch Nachweise von Ablagerungen in der Haut[56] und an den Motoneuronen im Lumbalmark.[10] Eine abschließende Klärung über die Rolle des Transthyretins in der Pathogenese der ALS liegt aktuell noch nicht vor. In diesem Zusammenhang wäre es denkbar, dass es im frühen Stadium der Erkrankung zu einer vermehrten Produktion von Transthyretin kommt, um eine Amyloid- β -fibrillognese zu hemmen. Bei einem trotzdem weiterhin steigendem oxidativen Stress innerhalb des Organismus könnte es dazu kommen, dass sich eine ursprünglich als protektiv gedachte Strategie des Körpers ins Gegenteil verkehrt und die erhöhte Transthyretinkonzentration zu einem Handicap im Rahmen einer beginnenden Umwandlung des Transthyretins in Amyloid Fibril Proteine wird.

4.3.2 Amyloid Fibril Protein vom Transthyretintyp

Amyloid Fibril Proteine sind pathologische niedermolekulare Eiweißkörper, die eine β -Faltblattstruktur aufweisen, wobei die β -Faltblattstruktur die Proteinaseresistenz und damit die Pathogenität im Organismus vermittelt.[22;62] Pathologische Ansammlungen von Eiweißstrukturen sind bereits in anderen neurodegenerativen Erkrankungen, wie der Alzheimer-Demenz und dem M. Parkinson nachgewiesen worden.[52] Bei der Alzheimer-Demenz und dem M. Parkinson lassen sich A β -Amyloidproteine nachweisen, während sich bei dem vorliegenden Versuch eine Hochregulation des Amyloids vom Transthyretintyp findet. Dies bedeutet, dass sich die Amyloidfibrillen aus Transthyretin, dem Transportprotein des Thyroxins, bilden. Ablagerungen von Amyloid vom Transthyretin Typ finden sich in inneren Organen, Auge sowie im peripheren und zentralen Nervensystem.[45] Auf den Liquor cerebrospinalis bezogen ist dies der erste Nachweis. Die bisher mit der Ablagerung von Amyloid des Transthyretintyps in Verbindung gebrachten Erkrankungen sind die Amyloidosen vom Transthyretintyp.[5] Dabei unterscheidet man 2 Unterformen, einmal eine hereditäre Form, welche autosomal dominant vererbt wird, und eine senile systemische Form, welche sich vor allem im höheren Alter ausbildet. Symptome der hereditären Form können Malabsorption und Kachexie bei schweren Diarrhoen sein. Es gibt dabei 2 Altersgipfel, einmal um das 30. Lebensjahr herum und einmal zwischen dem 50.-70. Lebensjahr.[45]

Eine seltene Form der hereditären ATTR Amyloidose ist die familiäre leptomeningeale oder meningovaskuläre Amyloidose. Das klinische Bild wird dabei von Demenz, Ataxie, Spastik, Krampfanfällen, Sehstörungen und Hydrocephalus, als auch rezidivierenden intracerebralen und subarachnoidalen Blutungen dominiert.[6]

Wie kommt die pathologische Faltung der Proteine zustande? Neben Mutationen in den Vorgängerproteinen, allein für Transthyretin sind über 80 bekannt[49], werden auch ein niedriger pH-Wert, erhöhte Temperatur und eingeschränkte Proteolyse diskutiert.[36] Eine weitere diskutierte Ursache ist oxidativer Stress, welcher die Fehlfaltung der Proteine begünstigen soll.[48;57]

Gleichzeitig könnten amyloide Ablagerungen bei neurodegenerativen Erkrankungen selbst wieder oxidativen Streß induzieren.[9;16] Auch für die amyloiden Ablagerungen, deren Proteinvorstufe Transthyretin ist, wird diese Induktion beschrieben.[16] Oxidativer Stress ist auch einer der diskutierten pathogenetischen Faktoren bei der ALS[27] und anderen neurodegenerativen Erkrankungen.[33;44]

Die Anordnung der Transthyretin abhängigen Amyloidfibrillen weist eine hohe Ähnlichkeit zu der Anordnung von Ablagerungen von SOD1 auf.[20] Zusätzlich wurde auch schon die Fehlfaltung der SOD-1 Proteinstruktur beschrieben.[40]

4.3.3 Alpha-1-Antitrypsin

Alpha-1-Antitrypsin (AAT) ist ein 51 kDa schweres akutes Phase Protein, welches die Serinproteinasen inhibiert und antiinflammatorische Aktivitäten zeigt.[14]

Im vorliegenden Versuch war die Konzentration im Liquor von ALS-Patienten viermal höher als in der Kontrollgruppe. In einem weiteren Versuch unserer Arbeitsgruppe fand sich ebenfalls eine Erhöhung der Vorstufe von Alpha-1-Antitrypsin.[8]

Bei Alzheimer Patienten wurden erhöhte AAT-Konzentrationen sowohl im Blutplasma[64] als auch im Liquor nachgewiesen. [41] Neben den antiinflammatorischen Aktivitäten scheint AAT auch eine Funktion als Suppressor der Hämoxxygenase-1(HO-1) zu haben.[35] HO-1 katalysiert die Oxidation des Häms durch α -meso-Hydroxylierung, Fragmentation des α -meso-Hydroxyhäm zu Verdohäm und seine Oxidation zu Biliverdin . HO-1 verbraucht dabei drei Moleküle O₂ und fünf Elektronen, die von der Zytocrom P₄₅₀ Reduktase für diese Reaktion zur Verfügung gestellt werden, um Häm in drei biologisch aktive Produkte, das Biliverdin, Eisen und Kohlenmonoxid abzubauen.[60] Eine übermäßige Ausschüttung von HO-1 scheint eine pathologische Mobilisation von Eisen auszulösen und Eisen verstärkt den intrazellulären oxidativen Stress und schädigt so unter anderem das Mitochondrium.[4] Der Zusammenhang zwischen gestörter Metallhomöostase und oxidativem Stress in der Pathogenese der ALS wurde bereits diskutiert.[11]

4.3.4 Alpha 2-Heremans-Schmid Glycoprotein

Alpha 2-Heremans-Schmid Glycoprotein, auch als Fetuin bekannt, wies im Liquor von ALS-Patienten eine um den Faktor 4 heraufregulierte Konzentration im Vergleich zur Liquorkonzentration der Kontrollgruppe auf. Bekannte Funktionen sind eine Beteiligung an der Regulation des Knochenwachstums und der Hemmung der Kalzifizierung,[55], sowie die Beteiligung an Immunreaktionen und Entzündung.[15]

Eine Erhöhung der Liquorkonzentration des Alpha 2-Heremans-Schmid Glycoproteins wurde bisher einmal im Liquor von Alzheimer-Patienten nachgewiesen.[41] Für die ALS ist diese der erste Nachweis einer Konzentrationsveränderung im Liquor. Aus den zum jetzigen Zeitpunkt vorliegenden Daten lassen sich keine Rückschlüsse auf eine pathophysiologischen Beteiligung von Alpha 2-Heremans-Schmid Glycoprotein bei neurodegenerativen Erkrankungen im Allgemeinen und der ALS im Besonderen herstellen.

4.3.5 Transferrin:

Transferrin ist ein eisenbindendes Protein, das sowohl im Serum als auch im Liquor vorkommt. Das Transferrinmolekül verfügt über 2 Bindungsstellen für Eisen, es können aber auch Mangan, Kupfer und andere Metalle gebunden werden. Bei Entzündungen sinkt Transferrin ab, das heißt, es hat eine Funktion als negatives Akute-Phase-Protein. Mittels spezieller Transferrinrezeptoren kann das Protein leicht per Pinozytose in die Zellen gelangen. Bisher sind für die ALS keine veränderten Konzentrationen im Liquor nachgewiesen worden. Es gibt jedoch Beschreibungen von einer erhöhten Akkumulation von Transferrin in basophilen und Bunina Einschlusskörperchen.[38] Die genannten, sowie eine Reihe von weiteren Einschlusskörperchen stehen im Verdacht, bei der ALS und weiteren neurodegenerativen Erkrankungen an der Pathogenese beteiligt zu sein.[25] In diesem Zusammenhang wäre dann auch eine Erhöhung der Transferrinkonzentration im Liquor erklärbar.

4.3.6 Vitamin D-binding Protein:

Das Vitamin-D-bindende Protein, auch als Vitamin-D-bindendes Alpha-Globulin bekannt, ist ein Glykoprotein welches zur Familie der Albumine gehört. Die Hauptfunktion besteht in der Bindung von hydrophoben Vitamin-D-Metaboliten und deren Bluttransport. Zusätzlich bindet es auch monomeres Aktin, Fettsäuren und spielt eine Rolle in der Aktivierung von Makrophagen und in der Chemotaxis.[53]

Während für andere neurologische Erkrankungen, wie der Multiplen Sklerose, Konzentrationsveränderungen im Liquor beschrieben sind[31], gibt es für den Bereich der neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere der ALS bisher keine derartigen Forschungsergebnisse. Es wurde von einer Forschungsgruppe für die Alzheimer Demenz eine erhöhte Karbonylierung der Vitamin D binding Proteine bei unveränderter Liquorkonzentration gegenüber der Kontrollgruppe gefunden.[28]

Die Karbonylierung von Proteinen korreliert mit der Höhe des oxidativen Stress im menschlichen Organismus. Karbonylierte Proteine selber können einen irreversiblen Substanzverlust erleiden und in der Folge selber zum Fortschreiten der Erkrankung beitragen.[17] Diagnostisch kann man den Anteil an karbonylierten oder anderweitig modifizierten Proteine als Marker für die Höhe des oxidativen Stresses im menschlichen Organismus benutzen.[18] Es fanden sich mehrere Isoformen des Vitamin D binding Proteins im Liquor. 2 von diesen Isoformen wiesen eine erhöhte Konzentration im Liquor von ALS Patienten auf, eine eine erniedrigte Konzentration. Die leicht erhöhte Liquorkonzentration von 2 Isoformen des Vitamin D binding Protein bei ALS-Patienten kann man in diesem Fall als Kompensation für den Ausfall durch eine eventuelle Karbonylierung interpretieren.

4.3.7 Carboxypeptidase E precursor

Das auch als Carboxypeptidase H bekannte Protein ist in den neuroendokrinen Zellen lokalisiert, wo es als Exopeptidase an der Aktivierung von Neurotransmittern beteiligt ist. Zu den aktivierten Neurotransmittern zählen unter anderem Insulin und Enkephalin.

In einer älteren Forschungsarbeit wird eine Veränderung der Gewebkonzentration bei der Alzheimer Demenz beschrieben.[61] Inwieweit Veränderungen in der Liquorkonzentration eine Rolle in der Pathogenese der ALS spielen ist zum jetzigen Zeitpunkt ungeklärt.

4.3.8 Proapolipoprotein

Das ZNS ist das lipidreichste Organ im menschlichen Körper, es enthält 25% der Gesamtmenge an Cholesterin. Hauptsächlich ist das Cholesterin in den Myelinscheiden und den Membranen von Astrocyten und Neuronen lokalisiert.[37] Lipidkomplexen kommt eine wichtige Funktion bei der Reifung und Aufrechterhaltung der Plastizität von Synapsen zu.[29] Proapolipoproteine sind die Vorstufe der Apolipoproteine, welche den Proteinanteil der Lipoproteine stellen. Die Apolipoproteine bilden zusammen mit den Phospholipiden die hydrophile Oberfläche der Lipoproteine, wo sie als strukturelles Gerüst und Erkennungs- und Andockmolekül, zum Beispiel für Membranrezeptoren fungieren. Unterteilt werden die Apolipoproteine in 5 Hauptklassen, Apolipoprotein A bis E, sowie in zahlreiche Unterklassen.

Das hier nachgewiesene, herunterregulierte Proapolipoprotein wurde als Vorstufe des Apolipoproteins-A1 identifiziert. Apo-A1 ist ein Bestandteil des HDL. Neben der

Beteiligung an der Lipidhomöostase in peripheren Zellen, ist es auch am Cholesterintransport in und aus den Neuronen beteiligt.[19] Während es für die ALS bisher noch keinen Nachweis für eine veränderte Liquorkonzentration gibt, geht man bei einer anderen neurodegenerativen Erkrankung, der Alzheimer-Demenz, davon aus, dass es einen Zusammenhang zwischen einer erniedrigten Apo-A1 Liquorkonzentration und dem Auftreten der Erkrankung gibt.[47] Diskutiert wird dabei unter anderem ein antioxidativer Wirkmechanismus des Apo-A1 [46] und eine Beeinflussung der Bildung von A β -Amyloidplaques.[21] Über diese Wirkmechanismen könnte sich eine erniedrigte Liquorkonzentration des Proapolipoproteins als Vorstufe des Apo-A1 auch bei der ALS auswirken.

5 Zusammenfassung

Die amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist eine chronisch degenerative Erkrankung des ersten und zweiten Motoneurons. Dabei kommt es zu einer zunehmenden Lähmung der Muskulatur, welche meistens mit dem Tod bei Lähmung der Atemmuskulatur endet. Der Großteil der betroffenen Patienten verstirbt innerhalb der ersten 5 Jahre nach Diagnosestellung. Die Ätiologie und Pathogenese des sporadischen Typs der ALS sind zum jetzigen Zeitpunkt weitgehend ungeklärt. Dies erschwert sowohl die Diagnose als auch die Therapie der Erkrankung.

Die vorliegende Arbeit wurde deshalb mit dem Ziel durchgeführt, mittels Proteomanalyse neue oder veränderte Proteine im Liquor von ALS-Patienten im Vergleich zu neurologisch unauffälligen Patienten zu finden, welche in Zukunft als Biomarker dienen könnten oder Einblicke in die Pathogenese der ALS gewähren.

Eines der Probleme bei der Proteombestimmung im Liquor ist die Tatsache, dass einer geringen Anzahl von liquorspezifischen Proteinen eine große Anzahl von liquorunspezifischen Proteinen, welche zum größten Teil aus dem Blut stammen, gegenüber stehen. Dieses Problem wird noch durch individuelle Unterschiede zwischen den Patienten verstärkt. Aus diesem Grund wurden die Liquorproben der einzelnen Gruppen gepoolt, um die inter-individuellen Unterschiede so weit als möglich zu minimieren. Von den 8 identifizierten Proteinen wurde bisher nur das Transthyretin mit einer Konzentrationsänderung im Zusammenhang mit der ALS beschrieben. 6 der Proteine wurden aber im Zusammenhang mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere der Alzheimer-Demenz identifiziert. Mehrere Proteine, wie das Alpha-1-Antitrypsin, Proapolipoprotein und Vitamin D-binding Protein passen mit ihren Veränderungen gut in das vermutete pathogenetische Konzept durch oxidativen Stress. Eines der Proteine, das Amyloid Fibril Protein vom Transthyretin Typ ist auffällig, da es bisher keinerlei Nachweis im Liquor von ihm gibt, es lässt sich aber im Rahmen der oxidativen-Stress-Theorie in die Krankheitspathogenese einordnen.

Beim Vergleich von bereits existierenden Arbeiten zum Thema Liquorproteomanalyse bei ALS-Patienten fällt auf, dass Übereinstimmungen bei den gefundenen Proteinen sehr

selten sind. Ob dies auf Veränderungen im Liquor während des Krankheitsverlaufes zurückzuführen ist oder ob es andere Methodik-assoziierte Ursachen hat, die eine derartige Spannbreite an veränderten Proteinen zum Vorschein bringt, ist zum aktuellen Zeitpunkt noch ungeklärt. Dies macht eine weitere Validierung der bisher gefundenen Ergebnisse notwendig. Unter Umständen wäre es auch sinnvoll, einzelne Patientengruppen nach Krankheitsdauer zu bilden und dann mit Einzelproben die Bestimmung durchzuführen.

Es gibt aktuell weniger als ein Dutzend Forschungsarbeiten im Bereich der Liquorproteomanalyse bei der sporadischen Form der ALS. Diese Arbeiten wurden fast ausschließlich in den letzten 3 Jahren publiziert. Auch wenn die vorliegende Arbeit es nicht ermöglicht, zum jetzigen Zeitpunkt einen spezifischen Biomarker zu benennen, so zeigt sie doch, dass die Liquorproteomanalyse mittels 2-D DIGE eine gut funktionierende Methode zum Proteomvergleich zwischen kranken und gesunden Proben ist. Die steigende Zahl der Forschungsarbeiten und die damit verbundene anwachsende Datenmenge wird zukünftig hoffentlich eine bessere Ein- und Zuordnung der einzelnen Proteine in die Pathogenese der ALS möglich machen.

6 Literaturverzeichnis

1. **World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases Subcommittee on Motor Neuron Disease. Airlie House guidelines.**
Therapeutic trials in amyotrophic lateral sclerosis. Airlie House "Therapeutic Trials in ALS" Workshop Contributors. *J Neurol Sci* **129 Suppl**: 1-10 (1995)
2. **Ahmed N, Barker G, Oliva K, Garfin D, Talmadge K, Georgiou H, Quinn M, Rice G:**
An approach to remove albumin for the proteomic analysis of low abundance biomarkers in human serum.
Proteomics **3**: 1980-1987 (2003)
3. **Alban A, David S O, 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)
4. **Almeida A M, Bertoncini C R, Borecky J, Souza-Pinto N C, Vercesi A E:**
Mitochondrial DNA damage associated with lipid peroxidation of the mitochondrial membrane induced by Fe²⁺-citrate.
An Acad Bras Cienc **78**: 505-514 (2006)
5. **Bergström J, Gustavsson A, Hellman U, Sletten K, Murphy C L, Weiss D T, Solomon A, Olofsson B O, Westermarck P:**
Amyloid deposits in transthyretin-derived amyloidosis: cleaved transthyretin is associated with distinct amyloid morphology.
J Pathol **206**: 224-232 (2005)
6. **Blevins G, Macaulay R, Harder S, Fladeland D, Yamashita T, Yazaki M, Hamidi Asl K, Benson M D, Donat J R:**
Oculoleptomeningeal amyloidosis in a large kindred with a new transthyretin variant Tyr69His.
Neurology **60**: 1625-1630 (2003)
7. **Brettschneider J, Mogel H, Lehmensiek V, Ahlert T, Sussmuth S, Ludolph A C, Tumani H:**
Proteome Analysis of Cerebrospinal Fluid in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS).
Neurochem Res **33**: 2358-2363 (2008)
8. **Brooks B R, Miller R G, Swash M, Munsat T L:**
El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis.
Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord **1**: 293-299 (2000)

9. **Butterfield D A, Sultana R:**
Redox Proteomics Identification of Oxidatively Modified Brain Proteins in Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment: Insights into the Progression of this Dementing Disorder.
J Alzheimers Dis **12**: 61-72 (2007)
10. **Calingasan N Y, Chen J, Kiaei M, Beal M F:**
Beta-amyloid 42 accumulation in the lumbar spinal cord motor neurons of amyotrophic lateral sclerosis patients.
Neurobiol Dis **19**: 340-347 (2005)
11. **Carri M T, Ferri A, Cozzolino M, Calabrese L, Rotilio G:**
Neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis: the role of oxidative stress and altered homeostasis of metals.
Brain Res Bull **61**: 365-374 (2003)
12. **Chandran J, Ding J, Cai H:**
Alsin and the molecular pathways of amyotrophic lateral sclerosis.
Mol Neurobiol **36**: 224-231 (2007)
13. **Chen R L, Sage E A, Dunn M J, Wait R, Preston J E:**
Optimising ovine cerebrospinal fluid preparation for two-dimensional gel electrophoresis.
Proteomics **6**: 3170-3175 (2006)
14. **Churg A, Dai J, Zay K, Karsan A, Hendricks R, Yee C, Martin R, MacKenzie R, Xie C, Zhang L, Shapiro S, Wright J L:**
Alpha-1-antitrypsin and a broad spectrum metalloprotease inhibitor, RS113456, have similar acute anti-inflammatory effects.
Lab Invest **81**: 1119-1131 (2001)
15. **Cozzolino M, Galassi A, Biondi M L, Turri O, Papagni S, Mongelli N, Civita L, Gallieni M, Brancaccio D:**
Serum fetuin-A levels link inflammation and cardiovascular calcification in hemodialysis patients.
Am J Nephrol **26**: 423-429 (2006)
16. **Crouch P J, Harding S M, White A R, Camakaris J, Bush A I, Masters C L:**
Mechanisms of Abeta mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease.
Int J Biochem Cell Biol **40**: 181-198 (2008)
17. **Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A:**
Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression.
J Cell Mol Med **10**: 389-406 (2006)
18. **Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A:**
Biomarkers of oxidative damage in human disease.
Clin Chem **52**: 601-623 (2006)

19. **Davidsson P, Westman-Brinkmalm A, Nilsson C L, Lindbjör M, Paulson L, Andreassen N, Sjögren M, Blennow K:**
Proteome analysis of cerebrospinal fluid proteins in Alzheimer patients.
Neuroreport **13**: 611-615 (2002)
20. **Elam J S, Taylor A B, Strange R, Antonyuk S, Doucette P A, Rodriguez J A, Hasnain S S, Hayward L J, Valentine J S, Yeates T O, Hart P J:**
Amyloid-like filaments and water-filled nanotubes formed by SOD1 mutant proteins linked to familial ALS.
Nat Struct Biol **10**: 461-467 (2003)
21. **Fagan A M, Younkin L H, Morris J C, Fryer J D, Cole T G, Younkin S G, Holtzman D M:**
Differences in the Aβ₄₀/Aβ₄₂ ratio associated with cerebrospinal fluid lipoproteins as a function of apolipoprotein E genotype.
Ann Neurol **48**: 201-210 (2000)
22. **Fändrich M:**
On the structural definition of amyloid fibrils and other polypeptide aggregates.
Cell Mol Life Sci **64**: 2066-2078 (2007)
23. **Friedland R P:**
Lipid metabolism, epidemiology, and the mechanisms of Alzheimer's disease.
Ann N Y Acad Sci **977**: 387-390 (2002)
24. **Granger J, Siddiqui J, Copeland S, Remick D:**
Albumin depletion of human plasma also removes low abundance proteins including the cytokines.
Proteomics **5**: 4713-4718 (2005)
25. **Hachiya N S, Kozuka Y, Kaneko K:**
Mechanical stress and formation of protein aggregates in neurodegenerative disorders.
Med Hypotheses **70**:1034-1037 (2007)
26. **Issaq H J, Veenstra T D:**
The role of electrophoresis in disease biomarker discovery.
Electrophoresis **28**: 1980-1988 (2007)
27. **Kaufmann E, Boehm B O, Sussmuth S D, Kientsch-Engel R, Sperfeld A, Ludolph A C, Tumani H:**
The advanced glycation end-product N epsilon-(carboxymethyl)lysine level is elevated in cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis.
Neurosci Lett **371**: 226-229 (2004)
28. **Korolainen M A, Nyman T A, Nyyssonen P, Hartikainen E S, Pirttilä T:**
Multiplexed proteomic analysis of oxidation and concentrations of cerebrospinal fluid proteins in Alzheimer disease.
Clin Chem **53**: 657-665 (2007)

29. **Koudinov A R, Koudinova N V:**
Essential role for cholesterol in synaptic plasticity and neuronal degeneration.
Faseb J **15**: 1858-1860 (2001)
30. **Lange S, Bender R:**
What is a significance test?
Dtsch Med Wochenschr **132 Suppl 1**: e19-21 (2007)
31. **Lehmensiek V, Sussmuth S D, Tauscher G, Brettschneider J, Felk S, Gillardon F, Tumani H:**
Cerebrospinal fluid proteome profile in multiple sclerosis.
Mult Scler **13**: 840-849 (2007)
32. **Li Q X, Mok S S, Laughton K M, McLean C A, Volitakis I, Cherny R A, Cheung N S, White A R, Masters C L:**
Overexpression of A β is associated with acceleration of onset of motor impairment and superoxide dismutase 1 aggregation in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model.
Aging Cell **5**: 153-165 (2006)
33. **Lipton S A, Gu Z, Nakamura T:**
Inflammatory mediators leading to protein misfolding and uncompetitive/fast off-rate drug therapy for neurodegenerative disorders.
Int Rev Neurobiol **82**: 1-27 (2007)
34. **Ludolph A C, Bendotti C, Blaugrund E, Hengerer B, Loffler J P, Martin J, Meininger V, Meyer T, Moussaoui S, Robberecht W, Scott S, Silani V, Van Den Berg L H:**
Guidelines for the preclinical in vivo evaluation of pharmacological active drugs for ALS/MND: report on the 142nd ENMC international workshop.
Amyotroph Lateral Scler **8**: 217-223 (2007)
35. **Maes O C, Kravitz S, Mawal Y, Su H, Liberman A, Mehindate K, Berlin D, Sahlas D J, Chertkow H M, Bergman H, Melmed C, Schipper H M:**
Characterization of alpha1-antitrypsin as a heme oxygenase-1 suppressor in Alzheimer plasma.
Neurobiol Dis **24**: 89-100 (2006)
36. **Merlini G, Bellotti V:**
Molecular mechanisms of amyloidosis.
N Engl J Med **349**: 583-596 (2003)
37. **Michikawa M:**
Cholesterol paradox: is high total or low HDL cholesterol level a risk for Alzheimer's disease?
J Neurosci Res **72**: 141-146 (2003)

38. **Mizuno Y, Amari M, Takatama M, Aizawa H, Mihara B, Okamoto K:**
Transferrin localizes in Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis.
Acta Neuropathol (Berl) **112**: 597-603 (2006)
39. **Münch C, Sedlmeier R, Meyer T, Homberg V, Sperfeld A D, Kurt A, Prudlo J, Peraus G, Hanemann C O, Stumm G, Ludolph A C:**
Point mutations of the p150 subunit of dynactin (DCTN1) gene in ALS.
Neurology **63**: 724-726 (2004)
40. **Nordlund A, Oliveberg M:**
Folding of Cu/Zn superoxide dismutase suggests structural hotspots for gain of neurotoxic function in ALS: parallels to precursors in amyloid disease.
Proc Natl Acad Sci U S A **103**: 10218-10223 (2006)
41. **Puchades M, Hansson S F, Nilsson C L, 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)
42. **Ramström M, Hagman C, Mitchell J K, Derrick P J, Hakansson P, Bergquist J:**
Depletion of high-abundant proteins in body fluids prior to liquid chromatography fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry.
J Proteome Res **4**: 410-416 (2005)
43. **Ranganathan S, Williams E, Ganchev P, Gopalakrishnan V, Lacomis D, Urbinelli L, Newhall K, Cudkowicz M E, Brown R H, Jr., Bowser R:**
Proteomic profiling of cerebrospinal fluid identifies biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis.
J Neurochem **95**: 1461-1471 (2005)
44. **Reynolds A, Laurie C, Lee Mosley R, Gendelman H E:**
Oxidative stress and the pathogenesis of neurodegenerative disorders.
Int Rev Neurobiol **82**: 297-325 (2007)
45. **Röcken C, Ernst J, Hund E, Michels H, Perz J, Saeger W, Sezer O, Spuler S, Willig F, Schmidt H H:**
Interdisciplinary guidelines for diagnosis and therapy of extracerebral amyloidosis: issued by the German Society of Amyloid Diseases e. V. .
Med Klin (Munich) **101**: 825-829 (2006)
46. **Rosenson R S:**
Beyond low-density lipoprotein cholesterol. A perspective on low high-density lipoprotein disorders and Lp(a) lipoprotein excess.
Arch Intern Med **156**: 1278-1284 (1996)

47. **Saczynski J S, White L, Peila R L, Rodriguez B L, Launer L J:**
The relation between apolipoprotein A-I and dementia: the Honolulu-Asia aging study.
Am J Epidemiol **165**: 985-992 (2007)
48. **Saito S, Ando Y, Nakamura M, Ueda M, Kim J, Ishima Y, Akaike T, Otagiri M:**
Effect of nitric oxide in amyloid fibril formation on transthyretin-related amyloidosis.
Biochemistry **44**: 11122-11129 (2005)
49. **Saraiva M J:**
Sporadic cases of hereditary systemic amyloidosis.
N Engl J Med **346**: 1818-1819 (2002)
50. **Schrattenholz A, Groebe K:**
What does it need to be a biomarker? Relationships between resolution, differential quantification and statistical validation of protein surrogate biomarkers.
Electrophoresis **28**: 1970-1979 (2007)
51. **Schriebl K, Trummer E, Weik R, Lattenmayer C, Muller D, Kunert R, Katinger H, Vorauer-Uhl K:**
Applicability of different fluorescent dyes for isoform quantification on linear IPG gels.
Electrophoresis **28**: 2100-2107 (2007)
52. **Selkoe D J:**
Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases.
Nat Cell Biol **6**: 1054-1061 (2004)
53. **Speeckaert M, Huang G, Delanghe J R, Taes Y E:**
Biological and clinical aspects of the vitamin D binding protein (Gc-globulin) and its polymorphism.
Clin Chim Acta **372**: 33-42 (2006)
54. **Stoyanov A V, Fan Z H, Das C, Ahmadzadeh H, Mei Q, Mohammed S:**
On the possibility of applying noncovalent dyes for protein labeling in isoelectric focusing.
Anal Biochem **350**: 263-267 (2006)
55. **Szweras M, Liu D, Partridge E A, Pawling J, Sukhu B, Clokie C, Jahnen-Dechent W, Tenenbaum H C, Swallow C J, Grynopas M D, Dennis J W:**
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)

56. **Tamaoka A, Matsuno S, Ono S, Shimizu N, Shoji S:**
Increased amyloid beta protein in the skin of patients with amyotrophic lateral sclerosis.
J Neurol **247**: 633-635 (2000)
57. **Teixeira P F, Cerca F, Santos S D, Saraiva M J:**
Endoplasmic reticulum stress associated with extracellular aggregates. Evidence from transthyretin deposition in familial amyloid polyneuropathy.
J Biol Chem **281**: 21998-22003 (2006)
58. **Tirumalai R S, Chan K C, Prieto D A, Issaq H J, Conrads T P, Veenstra T D:**
Characterization of the low molecular weight human serum proteome.
Mol Cell Proteomics **2**: 1096-1103 (2003)
59. **Tonge R, Shaw J, Middleton B, Rowlinson R, Rayner S, Young J, Pognan F, Hawkins E, Currie I, Davison M:**
Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology.
Proteomics **1**: 377-396 (2001)
60. **Tüzüner E, Liu L, Shimada M, Yilmaz E, Glanemann M, Settmacher U, Langrehr J M, Jonas S, Neuhaus P, Nussler A K:**
Heme oxygenase-1 protects human hepatocytes in vitro against warm and cold hypoxia.
J Hepatol **41**: 764-772 (2004)
61. **Weber S J, Louis R B, Trombley L, Bissette G, Davies P, Davis T P:**
Metabolic half-life of somatostatin and peptidase activities are altered in Alzheimer's disease.
J Gerontol **47**: B18-25 (1992)
62. **Westermark P:**
Aspects on human amyloid forms and their fibril polypeptides.
Febs J **272**: 5942-5949 (2005)
63. **Worms P M:**
The epidemiology of motor neuron diseases: a review of recent studies.
J Neurol Sci **191**: 3-9 (2001)
64. **Yu H L, Chertkow H M, Bergman H, Schipper H M:**
Aberrant profiles of native and oxidized glycoproteins in Alzheimer plasma.
Proteomics **3**: 2240-2248 (2003)
65. **Zolotarjova N, Martosella J, Nicol G, Bailey J, Boyes B E, Barrett W C:**
Differences among techniques for high-abundant protein depletion.
Proteomics **5**: 3304-3313 (2005)

7 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:

Zu allererst möchte ich mich bei **Prof. Dr. Hayrettin Tumani** bedanken, für die Überlassung des interessanten Themas, sowie sein beständiges Interesse am Fortgang der Arbeit. Weiterhin möchte ich mich für das schnelle und produktive Korrekturlesen in der Endphase dieser Arbeit bedanken.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Frau **Dr. Vera Lehmsiek** für die ständige und sehr gute Betreuung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre, sowie für die moralische Unterstützung in den Phasen, in denen es nicht so wie geplant lief.

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

Den **Mitarbeitern des Liquorlabors** danke ich für die freundliche Aufnahme ins Team und die unkomplizierte Hilfe bei Fragen und Problemen.

Abschließend danke ich noch meinen Eltern und Freunden für die moralische Unterstützung bei dieser Arbeit.