

**Aus der ehemaligen
interdisziplinären Arbeitsgruppe
klinische und experimentelle Plasmaproteinforschung
der Freien Universität Berlin (Klinikum Steglitz)**

DISSERTATION

**Optimierung der Liquorproteinelektrophorese in Agarosegel
Mögliche Bedeutung für die Diagnose neuropädiatrischer Krankheiten**

**zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin**

von

Karin Barnard

aus Berlin

Gutachter/in: 1.: Prof. Dr. med. H. Siemes
 2.: Prof. Dr. med. Dr. h. c. G. Henze
 3.: Priv.-Doz. Dr. med. F. Jochum

Datum der Promotion: 08.04.2011

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	1
1.1 Physiologie des Liquors cerebrospinalis	1
1.1.1 Proteine des Liquors cerebrospinalis	3
1.1.2 Transthyretin	5
1.1.3 Albumin	6
1.1.4 α 1-Globuline	6
1.1.5 α 2-Globuline	7
1.1.6 β -Globuline	8
1.1.7 γ -Globuline	9
1.2 Pathologie des Liquors cerebrospinalis	10
1.2.1 Erhöhung der Liquorproteinkonzentration	10
1.2.2 Erniedrigung der Liquorproteinkonzentration	11
1.2.3 Immunglobulinveränderungen - Intrathekale Immunreaktion	12
1.2.4 Veränderungen der Liquorproteine bei pädiatrische Erkrankungen	13
1.2.4.1 Guillain-Barré-Syndrom	13
1.2.4.2 Akute Leukämie	13
1.2.4.3 Neuroborreliose	14
1.2.4.4 Bakterielle Meningitis	14
1.2.4.5 Retardierung mit Erweiterung der Liquorräume	15
1.3 Untersuchungstechniken der Proteine des Liquors cerebrospinalis:	15
1.3.1 Gesamteiweißbestimmung	16
1.3.2 Elektrophorese	17
1.3.3 Agarosegelelektrophorese	18
1.3.4 Immunfixationselektrophorese/ Immunoblotting	19
1.3.5 Isoelektrische Fokussierung	19
1.3.6 Zweidimensionale Elektrophorese mit Massenspektrometrie	20
1.3.7 Konzentrierung des Liquors cerebrospinalis	20

1.3.8	Auswertungsverfahren der Elektrophorese/ Densitometrie	21
1.3.9	Proteineinzelbestimmungen und Quotientenbildung	21
1.3.10	Stufenprogramm der Liquordiagnostik	22
2	Fragestellung	23
3	Methodik	24
3.1	Probengewinnung	24
3.2	Proteinbestimmung im Liquor cerebrospinalis	25
3.2.1	Gesamteiweißbestimmung durch Nephelometrie	25
3.2.2	Proteineinzelbestimmungen durch Nephelometrie	26
3.3	Konzentrierung des Liquors cerebrospinalis	26
3.3.1	Vorbereitung der Liquorprobe für die Konzentrierung	26
3.3.2	Das Konzentrierungsgerät	27
3.4	Elektrophorese	30
3.4.1	Agarosegelplatten	30
3.4.2	Probenauftragestelle	30
3.4.3	Probenauftragung	30
3.4.4	Elektrophorese	32
3.4.5	Fixation /Wässerung/Trocknung	32
3.4.6	Immunfixation	33
3.4.7	Färbung	33
3.5	Optische Auswertung der Agarosegelelektrophorese	33
3.5.1	Photometrie	33
3.5.2	Densitometrie	34
3.5.3	Analogcomputer zur quantitativen Auswertung	35
3.5.4	Hirschmann Elscript 500 Elektrophoreseauswerteprogramm	36

3.6	Statistische Auswertungsmethoden	37
4	Ergebnisse	38
4.1	Methodische Ergebnisse	38
4.1.1	Gesamteiweißbestimmung	38
4.1.2	Proteineinzelbestimmungen	38
4.1.3	Konzentrierungsgerät	39
4.1.4	Elektrophorese	41
4.1.4.1	Linearität der Proteinfärbung	41
4.1.4.2	Genauigkeit der Elektrophorese	41
4.1.4.3	Proteinpositionen in der Elektrophorese	42
4.1.5	Vergleich von Analog - und Computerelektrophoreseauswertung	44
4.1.6	Methodenvergleich: Proteineinzelbestimmung durch Nephelometrie versus Elektrophorese	44
4.2	Klinische Ergebnisse	45
4.2.1	Normalwerttabelle für die Liquorproteinelektrophorese von Kindern	45
4.2.2	Veränderung der Liquorproteine mit dem Alter	47
4.2.2.1	Gesamteiweiß	47
4.2.2.2	Transthyretin	47
4.2.2.3	Albumin	48
4.2.2.4	α 2-Globuline	48
4.2.2.5	β 1-Globulin (Transferrin)	49
4.2.2.6	γ -Globuline (IgG)	49
4.2.3	Klinische Auswertung	50
4.2.3.1	Guillain-Barré-Syndrom	50
4.2.3.2	Akute Leukämie/ lymphoblastisches Non-Hodgkin-Lymphom	54
4.2.3.3	Neuroborreliose	58
4.2.3.4	Bakterielle Meningitis	60
4.2.3.5	Globale Retardierung mit erweiterten Liquorräumen	62
4.2.3.6	Tabellarische Übersicht über alle gefundenen Veränderungen	64

5	Diskussion	65
5.1	Methodische Ergebnisse	65
5.2	Klinische Ergebnisse	72
5.2.1	Normalwertermittlung	72
5.2.2	Erkrankungen des ZNS	75
6	Zusammenfassung	90
7	Literaturverzeichnis	94
8	Lebenslauf	108
9	Publikationen	109
10	Danksagung	109
11	Selbstständigkeitserklärung	110

Glossar

α 1-AT	α 1-Antitrypsin
α 2-MG	α 2-Makroglobulin
AGE	Agarosegelelektrophorese
ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
BFM - Protokoll	Berlin-Frankfurt-Münster-Protokoll
BLS	Blut-Liquor-Schranke
CSF	Cerebrospinal Fluid
CT	Computer Tomographie
EEG	Elektroenzephalographie
EEO	Elektroendosmose
GBS	Guillain-Barré-Syndrom
GE	Gesamteiweiß
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
Hp	Haptoglobin
HWB	Halbwertsbreite
IB	Immunoblotting
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IF	Immunfixationselektrophorese
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
γ -GL	Gammaglobulin
IgM	Immunglobulin M
IR	Immunreaktionen
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
MAG	Myelin Associated Glykoprotein
ME	mittlere Elektroendosmose
MBP	Myelinbasisches Protein
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
MS	Multiple Sklerose
MTX	Methotrexat
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom

NSE	Neuronenspezifische Enolase
OD	Optic density
PAGE	Polyacrylamidgel
RES	Retikulo-endotheliales System
RM-Tumor	Rückenmarktumor
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium dodecylsulfate
SSPE	Subakute sklerosierende Panencephalitis
τ	τ -Fraktion
TCA	Trichloroacetic Acid
Tf	Transferrin
TT	Transthyretin
VK	Variationskoeffizient
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Erkrankungen des Zentralen Nervensystems (ZNS) spiegeln sich oft in dem das Gehirn umgebenden Liquor cerebrospinalis wider. Solche Erkrankungen können in jedem Lebensalter auftreten. Pädiatrische Patienten zeigen häufig nur unspezifische Symptome, somit ist eine Diagnose der Erkrankungen erschwert.

Die Analyse des Liquors cerebrospinalis erfolgt heutzutage üblicherweise in einem Dreistufenprogramm. In der Erstdiagnostik wird das Liquorgesamteiweiß, die Liquorzellzahl, die Beschaffenheit des Liquors und das Liquorlaktat untersucht. In einer zweiten Stufe schließt sich die Basisdiagnostik mit Differentialzellbild, Liquor-Serum-Quotienten des Albumins und des Immunglobulins G und die Untersuchung der Immunglobuline A und M an. Die dritte Stufe der Liquordiagnostik besteht in Spezialuntersuchungen, wie dem Nachweis von oligoklonalen Banden im Liquor und der Bestimmung erregerspezifischer Antikörper sowie von Markerproteinen im Liquor.

Durch Bestimmung der Liquorproteine können Störungen der Blut–Liquor–Schranken (BLS) Funktion bzw. der Liquorzirkulation, intrathekale Immunreaktionen im ZNS und unter Umständen spezifische Proteine, die für einzelne Erkrankungen charakteristisch sind, erkannt werden. Diese Informationen werden zur Diagnostik von entzündlichen und degenerativen Erkrankungen des ZNS sowie Zirkulationsstörungen in den Liquorräumen als Hilfe für therapeutische Maßnahmen genutzt.

Die Liquorproteine wurden mittels der von Siegert (1976) entwickelten quantitativen Agarosegelelektrophorese analysiert. Die Optimierung des Verfahrens und seine mögliche Bedeutung in der Diagnostik neuropädiatrischer Erkrankungen ist das Thema dieser Arbeit.

1.1 Physiologie des Liquors cerebrospinalis

Der Liquor cerebrospinalis ist eine farblose klare Flüssigkeit, die das Gehirn und das Rückenmark umgibt. Seine Hauptaufgaben sind der mechanische Schutz des Gehirnes und die Erhaltung der Stabilität der chemischen Außenbedingungen für das Gehirngewebe.

Der Liquor setzt sich aus Wasser, Proteinen, anorganischen Bestandteilen, Zuckern, und Zellen zusammen. Die Inhaltsstoffe entstammen sowohl dem Blut als auch der Synthese im Gehirn (Fishman 1992). Täglich produziert ein Erwachsener ca. 500 ml Liquor cerebrospinalis. Das Volumen der Liquorräume Erwachsener beträgt ca. 135 ml (ca. 50 ml bei Kindern), dies bedeutet, dass es alle 6 h zum Turnover des Liquors cerebrospinalis kommt (Broin 1968).

Der Liquor hat seinen Ursprung zu 2/3 im Plexus choroideus der Seitenventrikel und zu 1/3 extrachoroidal aus zerebralen Kapillaren, dorsalen Wurzelganglien und lokalen Stoffwechsellorganen. Die zerebralen Kapillaren haben eine 5000 x größere Fläche als der Plexus choroideus und stellen somit die Hauptbarriere für die Diffusion dar. Der Plexus hat jedoch eine wesentlich höhere Sekretionsrate für die zerebrospinale Flüssigkeit, so dass hieraus die hohe Syntheserate des Liquors im Plexus resultiert (Garton 1991).

Der extrachoroidal gebildete Liquor hat ständigen Kontakt mit dem choroidalen, die Zusammensetzung beider ist dadurch sehr ähnlich. Der Liquorfluss erfolgt von den Ventrikeln über die Zisternen in die kortikalen und lumbalen Subarachnoidalräume. Treibende Kräfte für den Liquorfluss sind eine Druckwelle, die durch den arteriellen Blutfluss generiert wird, der Druckgradient aus Liquorproduktion und -resorption und die Cilia der Ependymzellen (Renz 2003).

Der Liquor wird über die Pacchioni - Granulationen, meningiale Gefäße und Nervenscheiden hauptsächlich im zerebralen Kortex zurück an die Blutbahn abgegeben (Whitelaw 1997, Greitz 1997). Die Absorption der Proteine aus dem Liquor in das Blut erfolgt unabhängig von ihrer Größe.

Schon Anfang des 20. Jahrhunderts fand Goldmann, dass durch die i.v. Injektion von Trypan Blau parenchymatöse Organe angefärbt wurden, nicht jedoch das zerebrale Gewebe und zeigte somit, dass es eine Schranke zwischen Blut und Liquor geben muss.

Es gibt zwei Schranken, die den Übertritt von Blut in das zentrale Nervensystem verhindern:

- 1) Die Blut-Hirn-Schranke: Trennung des vaskulären Systems von dem Extrazellulärraum des Hirnparenchyms mit tight junctions
- 2) Die Blut-Liquor-Schranke: Trennung des vaskulären Systems von dem Liquorraum mit gap junctions und Pinozytosevesikeln

(Renz 2003)

Der größte Teil der zellulären Schicht der Blut-Liquor/Hirn-Schranke ist mit einer Basalmembran kontinuierlich unterfüttert, die ebenfalls eine Barriere darstellt (Garton 1991).

Für die Liquorproteindiagnostik, die in dieser Arbeit beschrieben wird, spielt die Blut-Liquor-Schranke (BLS) die entscheidende Rolle.

Die Blut-Hirn/Liquor-Schranke kann durch folgende Mechanismen überwunden werden:

- 1) Diffusion: passiv oder erleichterter Transport, z.B. der Proteine
- 2) aktiver carriervermittelter Transport z.B. Aminosäuren und Glucose
- 3) freie Diffusion z.B. respiratorischer Gase

(Renz 2003)

Die Zusammensetzung des Liquors hängt stark von der Zirkulationsgeschwindigkeit des Liquors und der Funktion der BLS ab. Die BLS hat die Funktion einer Schutzbarriere, die schädliche Stoffe von den Nervenzellen abhält und die chemischen Außenbedingungen für das Gehirnparenchym stabil hält. Die Zusammensetzung des Liquors kann durch äußere und innere Faktoren, wie veränderte Blutkonzentrationen von Stoffen, der Kapillarendotheldurchlässigkeit, dem Liquorfluss, der Molekülgröße von Stoffen, dem Patientenalter, dem Entnahmeort, der Entnahmemenge sowie der lokalen Synthese von z.B. Proteinen, beeinflusst werden (Felgenhauer 1999).

1.1.1 Die Proteine des Liquors cerebrospinalis

Der Anteil der Plasmaproteine im Liquor cerebrospinalis wurde 1931 von Fermont-Smith mit 0.4% beschrieben. Thompson (1991) beschreibt das Verhältnis der Konzentrationen von Plasmaproteinen zu Liquorproteinen mit einem Verhältnis von 1:350. Etwa 80% der Liquorproteine gelangen durch Diffusionsvorgänge in den Liquor cerebrospinalis, 20% werden lokal synthetisiert. Einige Proteine werden sowohl lokal synthetisiert als auch aus dem Plasma sezerniert. Hierzu gehören als wichtigste Proteine Transthyretin (Herbert 1986) und Transferrin (Espinosa 1989). Zu den liquorspezifischen Proteinen zählen unter anderem: Myelinbasisches Protein (MBP), Neuronspezifische Enolase (NSE), Glial Fibrillary Protein (GFAP), Myelin Associated Glykoprotein (MAG). Diese Proteine haben für die Liquorproteinanalytik besondere Bedeutung als Markerproteine in der Diagnostik von Abbauvorgängen im ZNS (Wallesch 2005). Die lokale Synthese von Proteinen im ZNS kann physiologische (z.B. Transthyretin) aber auch pathologische Ursachen haben, wie zum Beispiel die lokale Produktion von Immunglobulin bei der Encephalitis disseminata (Thompson 1991).

Die Überwindung der BLS der Proteine hängt von folgenden Eigenschaften ab:

- dem hydrodynamischen Radius des Proteins (Felgenhauer 1974)
- der Ladung des Proteins (Griffen 1982)
- der Plasmakonzentration des Proteins (Felgenhauer 1974)
- der Blut-Liquor-Schrankenfunktion (Fishman 1958)

Felgenhauer (1974) zeigte, dass grundsätzlich alle Proteine die BLS durchwandern können, wobei der hydrodynamische Radius des Moleküls ausschlaggebend ist. Er fand eine logarithmische Linearität zwischen Serum/CSF-Proteinverhältnissen und dem hydrodynamischen Radius der Proteine.

Der Proteingehalt im Liquor cerebrospinalis ist orts- und altersabhängig (Weisner 1978, Garton 1991). Von mehreren Autoren wird gezeigt, dass es zu einem Anstieg des Liquorproteingehaltes entlang der Neuroaxis kommt. Weisner und Bernhardt (1978) finden eine ansteigende Proteinkonzentration vom Ventrikel (256 mg/l), über die Zisterne (316 mg/l) nach lumbal (420 mg/l). Eine Erklärung hierfür ist, dass es durch Equilibrieren der Plasmaproteine entlang der Kapillaren der Neuroaxis zu einer Erhöhung ihrer Konzentration in Richtung des Lumballiquors kommt. Bei Patienten mit eingeschränkter lumbaler Liquorzirkulation (z.B. Dauerlieger, Bandscheibenvorfall) steigt die Konzentration von Plasmaproteinen durch eine verlängerte Equilibrierungszeit an.

Die Abhängigkeit des Gesamtproteingehaltes des Liquors vom Lebensalter wird von mehreren Autoren beschrieben (Garton 1991, Biou 2000). Neugeborene haben einen Proteingehalt im Liquor, der über dem von Erwachsenen liegt (Statz 1983). Dieser nimmt im Verlauf der ersten drei Lebensmonaten stark ab, erreicht Werte unterhalb derer des Erwachsenenalters und steigt in der Pubertät wieder zu einer Proteinkonzentration an, die dann auch bei Erwachsenen zu finden ist (Statz 1983, Häfeli 1985, Isenberg 1999). Mit zunehmendem Alter steigen die Proteinkonzentrationen weiter an (Garton 1991). Neben dem Gesamteiweiß im Liquor zeigen auch die einzelnen Proteine Veränderungen ihrer relativen und absoluten Konzentration in Abhängigkeit vom Lebensalter und dem Ort der Entnahme (Siemes 1980, Häfeli 1985). Zur Klärung der altersabhängigen Veränderungen der Liquorproteinkonzentrationen gibt es mehrere Theorien:

- 1) Keine tight junctions der BLS in der frühen Fetalentwicklung (Mollgard 1986)
- 2) Verminderte Produktion von Liquorproteinen in der Neugeborenenperiode (Amtrop 1976)
- 3) Verminderter Fluss des Liquors im Neugeborenenalter (Reiber 1989)
- 4) Geringere Reabsorption von CSF durch die Pacchioni-Granulationen in den ersten 12 Lebensmonaten (Greitz 1997, Le Gros Clark 1920)
- 5) Veränderungen der BLS-Funktion während einzelner Lebensabschnitte (Bell 1991, Statz 1983)

Veränderungen des Gesamteiweißes mit dem Alter:

Alter	0 - < 2 Monate	2 - 4 Monate	4 Mo - 14 Jahre	14 - 18 Jahre
Gesamteiweiß (mg/l)	590	370	170	260
Standardabweichung	+/- 210	+/- 150	+/- 60	+/- 60

(Wong 2000)

Eine Geschlechtsabhängigkeit der Proteinkonzentrationen wird kontrovers von verschiedenen Autoren diskutiert (Vermes 1984).

1.1.2 Transthyretin (ehemals Präalbumin):

Transthyretin ist ein kleines Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 55 000 Da und 32,5 Å. Seine Aufgabe ist der Transport von Thyroxin und dem retinolbindenden Protein. Die Konzentration liegt bei einem Erwachsenen im Serum bei 200-500 mg/l und beträgt im Lumballiquor 17 +/-7 mg/l, welches einen Konzentrationsgradienten Serum/Liquor von 14 ergibt (Felgenhauer 1974). Synthesort des Proteins sind Hepatozyten und der Plexus choroideus, der hohe Konzentrationen der Transthyretin-mRNA aufweist (Herbert 1986). Etwa 90% des Transthyretin im Liquor wird im ZNS synthetisiert, der Rest stammt aus dem Blut (Zettl 2005).

Die relative Konzentration des Transthyretins im Liquor cerebrospinalis ist stark ortsabhängig und zeigt folgende Veränderungen entlang der Neuroaxis:

Ort	Ventrikel	Zisterne	Lumbal
Prozent Transthyretin	12,8 %	7,2 %	5,5 %

(Weisner 1978)

Die absolute Konzentration dieses Proteins ist vom Ort unabhängig, jedoch abhängig vom Alter. In der Neonatalperiode zeigen sich höhere Werte als im Erwachsenenalter. Dies kann theoretisch durch erhöhte Permeabilität der BLS, aber auch durch einen erhöhten Bedarf an Nährstoffen des sich entwickelnden Gehirns oder durch eine verminderte Zirkulation des Liquors im neonatalem Gehirn erklärt werden (Larsen 1986).

In der Liquorproteindiagnostik ist Transthyretin zur Beurteilung der BLS - Funktion von Bedeutung. Kommt es zu deren Störung, so fällt charakteristischerweise der relative Anteil des Präalbumins im Liquor ab und ist somit ein Maß für die Schwere der Schrankenfunktionsstörung (Wiederkehr 1991).

Zirkulationsstörungen im Liquorsystem spiegeln sich in Veränderungen des Transthyretinwertes wieder (Weisner 1983). Bei zerebraler Atrophie konnte ein Anstieg der Proteinfraction festgestellt werden (Takeoka 1980). Bei einer Obstruktion des Liquorflusses im Spinalkanal fällt die Transthyretinfraktion relativ ab.

Im Gegensatz zu der Aufgabe des Transthyretins im Serum als Anti-Akute-Phase-Protein, kann eine solche Funktion des Proteins im Liquor nicht beobachtet werden. Es kommt zu keinem

Abfall der mRNA Konzentration dieses Proteins während einer Entzündung im ZNS (Schreiber 1993).

1.1.3 Albumin

Albumin ist ein Glykoprotein, das ausschließlich in den Hepatozyten synthetisiert wird. Es hat ein Molekulargewicht von 69 000 Da und einen Radius von 35,8 Å, ist also wie Transthyretin ein kleines Molekül. Seine Aufgabe ist der Transport verschiedener endogener und exogener Stoffe wie z.B. von Medikamenten. Außerdem ist es wesentlich an der Aufrechterhaltung des osmotischen Druckes im Blut beteiligt.

Das Albumin steigt im Liquor cerebrospinalis entlang der Neuroaxis in seiner absoluten und relativen Konzentrationen an.

Ventrikel	Zisterne	Lumbal
51,9 %	56,2 %	61,4%
83 mg/l	127 mg/l	180 mg/l

(Weisner, Bernhardt 1978)

Die Konzentration des Albumins beträgt im Serum eines Erwachsenen 36 600 mg/l, im Liquor 155 mg/l, dieses ergibt einen Serum/Liquor Quotienten von 237 (Felgenhauer 1974).

Die proportionale und absolute Konzentration des Albumins im Liquor verändert sich mit dem Alter des Patienten. Minimalkonzentrationen werden im Alter von 7–8 Monaten beschrieben (Hung 1992, Häfli 1985, Garton 1991).

Albumin ist ein wichtiger Indikator der BLS-Funktion (Bonate 1988), da es alleinig aus dem Serum in den Liquor übergeht, es wird nicht im ZNS produziert. Eine absolute und relative Erhöhung des Albumins im Liquor lässt sich entweder auf eine Undichte der BLS bzw. einen gestörten Liquorfluss oder auf eine Erhöhung des Serumalbumins zurückführen.

1.1.4 α 1-Globuline

α 1-Antitrypsin (α 1-AT) nimmt in der Elektrophorese den größten Anteil der α 1-Globuline ein (Wiederkehr 1991). Es hat ein Molekulargewicht von 55 000 Da und ist mit einem Radius von 32,5Å ein kleines Molekül. Als Glykoprotein wird es vornehmlich in den Hepatozyten, aber auch im zentralen Nervensystem (Neurone, Glia) synthetisiert (Mollgard 1988). Die Konzentra-

tion im Serum eines Erwachsenen beträgt 3000 mg/l, im Liquor 7 mg/l (Schreiber 1987). α 1-AT ist ein Akute-Phase-Protein und hat die Aufgabe Serin-Proteasen zu inaktivieren.

In der Liquordiagnostik kann dieses Protein besonders den Beginn einer entzündlichen ZNS Erkrankung anzeigen. Ein Anstieg kann außerdem bei epileptischen Anfällen, Gefäßschäden und bei einem akuten MS-Anfall in Zusammenhang mit einem Untergang von Nervenzellen gesehen werden (Pearl 1985, Karcher 1980).

Die elektrophoretische Auswertung der α 1-Globuline ist problematisch, da sie direkt neben der Albumin Fraktion liegen und somit von dieser beeinflusst werden (Keren 1986).

In der α 1-Globulinfraktion der Elektrophorese liegen ebenfalls unter anderen das α 1-Fetoprotein, das α 1-Lipoprotein und das α 1-Glykoprotein (Liquorkonzentration = 3,7 mg/l).

1.1.5 α 2-Globuline

Ein wichtiges Protein in der α 2-Globulinfraktion ist das α 2-Makroglobulin. Es ist mit einer Molekularmasse von 79 800 Da und einem Radius von 93,5 Å ein großes Molekül. α 2-Makroglobulin ist ein Glykoprotein mit 4 Untereinheiten und hat eine Konzentration im Serum von 2200 +/-650 mg/l, im Liquor von 2 +/-0.7 mg/l, dieses ergibt einen Konzentrationsgradienten Serum/ Liquor von 1111 (Felgenhauer 1974). Das Protein wird vornehmlich in den Hepatozyten, aber auch in Makrophagen und in Zellen des ZNS, besonders in Gliazellen Neugeborener synthetisiert (Dziegielewska 1986, Gebicke 1987). Es ist ein Akute-Phase-Protein und hat die Aufgabe als Proteaseinhibitor besonders Endopeptidasen zu neutralisieren. Wie auch andere Antiproteasen wird α 2-Makroglobulin während Glucocorticosteroid- und Zytokintherapie (besonders Interleukin 6) vermehrt produziert (Warburton 1993).

In der Liquordiagnostik gibt das α 2-Makroglobulin Aufschluss über die Funktion der BLS und kann gut für Verlaufsbeobachtungen und Therapieüberprüfung im Sinne einer Wiederherstellung der Schrankenfunktion genutzt werden (Schliep 1974, Kanah 2007).

Bei der Meningitis wird ein Anstieg des α 2-Makroglobulins für die Differentialdiagnostik einer aseptischen oder bakteriellen Ursache genutzt (Virji et al 1984). In der Elektrophorese wandert dieses Protein in der α 2-Globulinfraktion, neben unter anderen α 2-Coeruloplasmin, Haptoglobin (Liquorproteinkonzentration = 2,2 mg/l), C1-Esterase Inhibitor und Prä- β -Lipoprotein.

1.1.6 β -Globuline

Transferrin ist ein Glykoprotein und liegt in der Elektrophorese in der β 1-Globulinfraktion. Mit zwei Untereinheiten, einem Molekulargewicht von 81 000 Da und einem Radius von 36,7 Å ist es ein großes Molekül. Es ist ein Anti-Akute-Phase-Protein mit Abwehrfunktion, zuständig für den Eisentransport und wirkt in der ZNS-Entwicklung als Differenzierungsfaktor (Espinosa 1989). Die Synthese dieses Proteins erfolgt sowohl in den Hepatozyten als auch in dem Plexus choroideus (Espinosa 1990, Aldred 1987).

Das Transferrin hat im Serum eines Erwachsenen eine Konzentration von 2100-4450 mg/l, im Liquor von 17-3 mg/l, was ein Verhältnis Serum/Liquor 142 entspricht (Felgenhauer 1974). Die absolute Konzentration des Transferrins im Liquor hängt vom Alter des Patienten ab (Gruener 1991). Wie bei dem Transthyretin ist die relative Konzentration der β -Globuline im Ventrikelliquor höher als im lumbalen Liquor (Weisner 1978).

Im Liquor ist Transferrin ein wichtiger Parameter zur Beurteilung entzündlicher und degenerativer Prozesse. Es kommt zum Anstieg dieses Proteins im Liquor bei atrophischen ZNS-Vorgängen (Takeoka 1980), bei viraler Meningitis (Gruener 1991) und bei dem serumbedingten Eisenmangel. In der Elektrophorese liegt dieses Protein zusammen mit Hämopexin, Komplement, β -Lipoprotein, Fibrinogen, Immunglobuline A (Liquorkonzentration bis 6 mg/l) und M (Liquorkonzentration bis 1 mg/l) und dem C reaktivem Protein in der β 1-Globulin-Fraktion.

Liquorspezifische τ -Fraktion (β 2-Globulin)

Die τ -Fraktion (auch τ -Transferrin) wird praktisch nur im ZNS gefunden. Es wird angenommen, dass es ein Spaltprodukt des Transferrins ist, welches im ZNS durch Abspaltung von 4 Sialogruppen mittels des Enzyms Neuronamidase entsteht (Gallo et al, 1985). Im Serum wird ein solches Protein durch Asialorezeptoren sofort in das RES aufgenommen und eliminiert.

Felgenhauer (1999) beschreibt den Anteil des τ -Transferrins am Gesamttransferrin im Liquor mit 45% und einer Konzentration von 6 mg/l. Die τ -Fraktion ist wichtig zur Beurteilung der BLS-Funktion, indem es besonders Aufschluss über die Stärke der Störung Auskunft gibt. Mit zunehmender Schrankenstörung vermindert sich ihr relativer Anteil (Fishman 1991).

Eine Erhöhung der τ -Fraktion im Vergleich zum Transferrin wird als Folge eines durch lysosomale Hydrolase initiierten Zelltodes beschrieben (Thompson 1991). In der Elektrophorese liegt

dieses Protein in der β 2-Globulin Fraktion. Der Nachweis der τ -Fraktion in einer Flüssigkeit gilt als Beweis, dass diese aus dem Liquorsystem kommt (Saunders 2004).

1.1.7 γ -Globuline

In der γ -Globulin Fraktion der Elektrophorese sind die Immunglobuline - hauptsächlich das Immunglobulin G (IgG) - gelegen. Syntheseort der Immunglobuline ist die Plasmazelle, die normalerweise nur im Blut nachzuweisen ist. Physiologischerweise stammen die Immunglobuline im Liquor cerebrospinalis daher aus dem Blut und passieren die BLS. In pathologischen Fällen wandern die Plasmazellen in das ZNS ein und synthetisieren dort Immunglobuline als eine intrathekale Immunreaktion.

Immunglobulin G (IgG) ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 150 000 Da, einem Radius von 53,4 Å und vier Untereinheiten. Die Konzentration des Immunglobulins G eines Erwachsenen beträgt 8-18 g/l im Serum und bis 40 mg/l im Liquor. Felgenhauer beschreibt einen Konzentrationsgradienten Serum/Liquor von 802. Die Aufgabe der Immunglobuline besteht in der humoralen Immunabwehr, wobei die einzelnen Unterklassen des Immunglobulins G Antwort auf verschiedene mikrobielle Erreger sind. Die Konzentration des Immunglobulins G im Liquor hängt stark von Lebensalter und Entnahmeort ab.

Die Konzentration der Immunglobuline für Erwachsene und Kinder im Liquor cerebrospinalis betragen:

Lebensalter	IgG (mg/L)	IgM (mg/l)	IgA
Erwachsene weibl.	20,3 +/- 7,2	0,24 +/- 0,15	1,1 +/- 0,8
männl.	24,1 +/- 9,5	0,23 +/- 0,16	1,6 +/- 1,0
Kinder (1-11 Jahre)	15,7 +/- 6,8	0,11 +/- 0,20	0,5 +/- 0,5

(Vermes 1983)

Lebensalter	bis 6 Mo.	7-12 Mo.	2-4 Jahre	4-6 Jahre	6-8 Jahre	8-10 Ja.	10-13 Ja.
IgG (mg/l)	25,6	11,8	12,9	11,8	13,8	16,2	18

(Bachmann 1990)

Die IgG-Veränderungen im Liquor verhalten sich analog zu den Serum-IgG-Veränderungen im Kindes- und Erwachsenenalter.

Die Konzentration des Immunglobulins G im Liquor verändert sich mit dem Abnahmeort:

IgG CSF	Ventrikel	Zisterne	Lumbal
Prozent (%)	8,7	9,8	8,9
Absolut (mg/l)	9	14	23

(Weisner et al, 1978)

Entlang der Neuroaxis erhöht sich die absolute Konzentration des Immunglobulins G im Liquor parallel zum Anstieg des Albumins. Durch den gleichzeitigen Anstieg des Gesamteiweißes entlang der Neuroaxis kommt es deshalb nicht zu einer relativen Veränderung des Immunglobulins G auf dem Weg von den Ventrikeln nach lumbal. Die Immunglobuline sind wichtige diagnostische Parameter zur Beurteilung von Entzündungen im ZNS. Bei akuten Entzündungen kommt es zum Anstieg des Immunglobulins G und Immunglobulins M im Liquor entweder durch Erhöhung der Permeabilität der BLS oder durch intrathekale Immunreaktionen. Chronische Entzündungen zeigen hingegen eine polyklonale IgG-Vermehrung oder oligoklonale Banden bei intakter oder wenig geschädigter BLS. In der Elektrophorese liegt das IgG in der γ -Globulin Fraktion.

1.2 Pathologie des Liquors cerebrospinalis

1.2.1 Erhöhung der Liquorproteinkonzentration

Die Undichte der BLS bzw. eine Verlangsamung des Liquorflusses spiegelt sich generell in einer Erhöhung der Liquorproteinkonzentration wieder.

Ursachen:

Entzündung des ZNS oder der Meningen durch Bakterien, Pilze und Viren; defekte Reabsorption des Liquors; Obstruktion des Liquorflusses (z.B. Bandscheibenvorfall); ZNS Blutungen; Medikamente, Strahlentherapie; Stoffwechselerkrankungen

Diagnose:

- 1) Erhöhung des Gesamteiweißes
- 2) Immunchemische Bestimmung von Proteinen und Quotienten-Bildung
- 3) Elektrophorese:

Protein/ Fraktion	Trans- thyretin	Albumin	α 1- Globulin	α 2- Globulin	β 1- Globulin	β 2- Globulin	γ - Globulin
Absolut		++		+			+
Relativ	-			+		-	+

(Schmidt 1991)

Beispiele:

Physiologisch: Lebensalter über 60 Jahre; Neugeborene (0-14 Tage)

Pathologisch:

leichte Proteinerhöhung: virale ZNS Infektionen, chronische ZNS Infektion

starke Proteinerhöhung: bakterielle ZNS Infektionen (z.B. Meningitis)

Stoppliquor (z.B. RM-Tumor)

ZNS Tumoren (z.B. Medulloblastom)

artifiziell: traumatische Lumbalpunktion

1.2.2 Erniedrigung der Liquorproteinkonzentration

Eine so genannte Verdichtung der BLS-Funktion geht mit der Erniedrigung der Liquorproteine einher. Der Name Verdichtung ist willkürlich gewählt, da die Ursachen für die folgenden Proteinveränderungen noch nicht ausreichend erforscht sind.

Theoretische Ursachen:

- verminderter Eintritt von Proteinen aus dem Serum
- erhöhte Abgabe von CSF in das venöse System aufgrund eines erhöhten intrakraniellen Druckes - daher höhere CSF-Reabsorption
- erhöhter Liquorfluss

Proteinveränderungen:

Gesamteiweiß unter 200 mg/l

Elektrophorese:

Protein/ Fraktion	Trans- thyretin	Albumin	α 1- Globulin	α 2- Globulin	β 1- Globulin	β 2- Globulin	γ - Globulin
Absolut*					-	+	
Relativ**	++					++	

* Fishman 1992

**Fauchier 1988

Beispiele :

physiologisch: Kinder zwischen dem 3. und 6. Lebensmonat

pathologisch: erhöhter intrakranieller Druck, Hyperthyreoidose, Leukose, Anämie

artifiziell: Abnahme zu großer Liquormengen mit zunehmendem Anteil an Ventrikelliquor im Lumballiquor (Isenberg 1999)

1.2.3 Immunglobulinveränderungen - Intrathekale Immunreaktion

Veränderungen der Immunglobuline im Liquor können verschiedene Ursachen haben, die sich in Veränderungen der Liquorproteinelektrophorese oder der Liquor-Serum-Quotienten der Immunglobuline widerspiegeln.

Erhöhte Konzentrationen an Immunglobulin G können unter folgenden Bedingungen im Liquor gefunden werden:

- erhöhtes Liquoreiweiß (BLS - Störung) - polyklonale Erhöhung des IgG
- Vermehrung des Immunglobulins G im Serum - polyklonale Vermehrung des Immunglobulins G
- klonale IgG Erhöhung im Serum – klonale Vermehrung des IgG
- intrathekale Produktion von IgG - oligoklonale Vermehrung des Immunglobulins G

Ursachen einer intrathekalen Immunglobulin G Bildung:

- chronische Infektion durch Mikroorganismen z.B. Borrelia Burgdorferi
- primär demyelinsierende Erkrankungen z.B. Multiple Sklerose
- Autoimmunerkrankungen z.B. systemischer Lupus erythematodes

Nachweismethoden von oligoklonalen Banden:

- Elektrophorese und Immunfixation
- IEF (isoelektrische Fokussierung) und IF (Immunfixation) oder Immunoblotting
- Liquor-Serum-Quotienten

Eine intrathekale Immunreaktion gilt als bewiesen, wenn oligoklonale Banden nicht im Serum, jedoch im Liquor nachweisbar sind.

Beispiel für die Häufigkeit des Vorkommens intrathekalen Immunreaktionen (Thompson 1991):

- Multiple Sklerose: 95%
- SSPE 100%
- Neurosyphilis: 95%
- Neuroborreliose: 80%

(Oft ist der Nachweis von oligoklonalen Banden stark von dem Stadium der Erkrankung abhängig.)

1.2.4 Veränderungen der Liquorproteine bei pädiatrischen Erkrankungen

Veränderungen der Liquorproteine durch Erkrankungen im Kindesalter haben verschiedene Ursachen. So kann die BLS-Funktion bzw. der Liquorfluss direkt durch Erreger (bakterielle Meningitis), indirekt durch spinale (Guillain-Barré-Syndrom) oder zentrale Autoimmunprozesse (Neuroborreliose), durch Medikamente sowie Strahlentherapie (Leukämietherapie) und Veränderungen der Struktur der Liquorräume und chemische Vorgänge im ZNS verändert werden. Exemplarisch wurden daher folgenden Krankheiten ausgewählt.

1.2.4.1 Guillain-Barré-Syndrom (Akute Polyradikulitis)

Pathophysiologie: Entzündung der peripheren Nerven und Nervenwurzeln durch eine wahrscheinlich zellvermittelte humorale Immunantwort nach Infektionen oder Impfungen und bei herabgesetzter Immunabwehr (lokale spinale Autoimmunantwort).

Symptome: motorische Lähmungen, zu Beginn Schmerzen

Liquorproteinveränderungen (Korinthenberg 1992, Link 1973):

Achtung: Ventrikel- und Zisternenliquor kann ein normales Eiweißbild zeigen.

Tag 1 bis ca. Tag 5 der ersten klinischen Symptome: meist keine sichtbaren Veränderungen der Liquorproteine

Tag 6 bis mehrere Wochen (häufig bis zu einigen Monaten):

Liquor-Serum-Quotient des Albumins mit bis 50×10^{-3} stark erhöht

Gesamteiweiß stark erhöht

IgG erhöht (Fishman 1992)

Mäßige IgG-Erhöhung im Krankheitsverlauf (Delank 2004)

1.2.4.2 Akute Leukämie

Pathophysiologie: - Einwandern von neoplastischen Zellen in das ZNS

- ZNS Prophylaxe: Chemotherapie und Bestrahlung

Klinik: - mannigfaltige neurologische Symptome können auftreten:

Nervenlähmungen, Bewusstseinsstörungen, epileptische Anfälle

Liquorproteinveränderungen im Verlauf der Erkrankung unter Therapie:

Gesamteiweiß: Anstieg

Albumin: Anstieg

α 2-Makroglobulin: je nach schwere der BLS - Störung erhöht

IgG: oft prozentualer und absoluter Abfall unter der Chemotherapie

(Siemes 1980, Ludwig 1987)

1.2.4.3 Neuroborreliose

Ursache: Entzündung durch das Bakterium Borrelia Burgdorferi

Klinische Symptome (Logigean 1991)

- 1) Frühsymptome (Tage - Wochen): generelle Symptome wie Fieber, Müdigkeit, Erythema migrans, Meningismus
- 2) Symptome (Wochen-Monate): Mono-/Oligoarthritis, Myokarditis, Meningoradikulitis mit Hirnnervenlähmungen und peripheren Neuropathien (z.B. Facialisparese)
- 3) Symptome (7 Monate-12 Jahre): Arthritis, Synovitis, chronische Neuralgie, Hautveränderungen, Encephalitis, Encephalomyelitis

Liquorproteinveränderungen (Hamann-Brand 1995, Logigean 1991):

Stadium 1: meist keine Liquorproteinveränderungen

Stadium 2: Gesamteiweiß: stark erhöht

Liquor-Serum-Quotient des Albumins: bis 50×10^{-3}

Albumin, IgG stark erhöht

Lokalsynthese von Borrelienantikörpern

oligoklonale Banden (30% IgG, 53% IgA, 86% IgM)

Stadium 3: Normalisierung des Liquorgesamteiweißes

Lokalsynthese von Borrelienantikörpern

1.2.4.4 Bakterielle Meningitis

Ursache: Entzündung der Meningen, z.B. durch Pneumokokken, Meningokokken oder Hämophilus Influenza

Klinik: plötzlich einsetzende Symptome mit Nackensteifigkeit und hohem Fieber, Kopfschmerzen, Reizüberempfindlichkeit, Auftreten von Bewusstseinsstörungen, Lähmungen, epileptischen Anfällen

Liquorproteinveränderungen (abhängig vom Abnahmezeitpunkt):

Gesamteiweiß: starker Anstieg

Liquor-Serum-Quotient des Albumins : $>20 \times 10^{-3}$

Albumin stark absolut erhöht

IgG stark absolut erhöht, initial keine oligoklonalen Banden
 Liquorelektrophorese: prozentual starke Vermehrung α 2-Globuline,
 verringerter prozentualer Anteil von Albumin und der β -Globuline

(Isenberg 1999)

1.2.4.5 Retardierung mit Erweiterung der Liquorräume

Ursachen: Uneinheitlich, genetische Defekte, toxisch, nach ZNS Infektionen, nach hypoxischer Hirnschädigung

Klinik: Verlust erworbener Fähigkeiten, epileptische Anfälle, Entwicklungsstörungen mit motorischen, sensorischen oder mentalen Symptomen

Liquorproteinveränderungen:

Gesamteiweiß: vermindert

Transthyretin: erhöht

Transferrin erniedrigt, τ -Fraktion erhöht (Fishman 1992)

1.3 Untersuchungstechniken der Proteine des Liquors cerebrospinalis

Seit dem erstmaligen Beschreiben der Lumbalpunktion zur Gewinnung des Liquors cerebrospinalis durch Quincke 1891, ist die Untersuchung der Gehirnflüssigkeit ein wichtiges diagnostisches Mittel in der Aufklärung neurologischer Erkrankungen geworden.

Anfang des 20. Jahrhunderts wurden verschiedene Methoden zur Untersuchung des Lumballiquors in Bezug auf Gesamtproteingehalt (Nonne Appelt 1908, Lange 1912, Kaffka 1921) und Zellzahl (Fuchs, Rosenthal 1904) eingeführt. Diese Methoden wurden im weiteren Verlauf verfeinert. Einige der damaligen Untersuchungen (Pandy 1910) werden bis heute durchgeführt.

Nach erstmaligem Beschreiben der Trennung von Proteinen im Gleichstrom (Michaelis 1909) gelang es Hesselvik (1939), die Elektrophorese in der Liquorproteindiagnostik einzusetzen. Die Liquorproteinelektrophoresen wurden zuerst auf Papier (Karcher 1959, Van Sande 1958, Lowenthal 1960), später auf Celluloseacetat (Kohn 1957, Johnstone 1966) und dann in Agarosegel (Lowenthal 1964, Wieme 1965, Laurell 1966) und Polyacrylamid (Thompson 1991) durchgeführt.

Die Technik der Agarosegelelektrophorese wird heute teilautomatisiert von Firmen wie Sebia und Beckmann zur Quantifizierung oder Halbquantifizierung hauptsächlich von Serumproteinen und quantitativ (Siegert 1977) zur Beurteilung der Liquorproteine eingesetzt. Besonders mit der quantitativen Agarosegelelektrophorese können die Funktion der BLS und Veränderungen der γ

- Globulinfraktion als entzündliche Reaktionen im ZNS gut charakterisiert werden (Siemes 1980).

Anfang der 50er Jahre (Ouchtelony 1949) und in den 60er Jahren (Laurell 1966, Mancini 1965) wurden immunochemische Verfahren zur Proteineinzelbestimmung im Liquor eingeführt. Mit der 1959 durch Schultze und Schweg erarbeiteten Lasernephelometrie ergab sich ein einfaches und schnelles Untersuchungsverfahren für Einzelproteinbestimmungen des Liquors cerebrospinalis.

Fragen nach Störung der BLS-Funktion und der intrathekalen Produktion von Immunglobulinen können durch Quotientenbildung (Deplech/Lichtblau 1972, Reiber 1987) immunochemisch bestimmter Proteine im Serum und Liquor beantwortet werden.

Anfang der siebziger Jahre (Delmotte 1971) wurde die isoelektrische Fokussierung des konzentrierten und später des unkonzentrierten Liquors mit Polyacrylamid oder Agarosegel als Matrix eingeführt. Diese Untersuchungsmethode mittels Färbung oder immunochemischem Nachweis wird vor allem zur Detektion von intrathekalen Immunreaktionen, wie z.B. bei der Multiplen Sklerose, genutzt.

In der Spezialdiagnostik, z.B. neurodegenerativer Erkrankungen, wird heute die zweidimensionale Elektrophorese mit anschließender Massenspektrometrie zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Proteinen eingesetzt. An weiteren Methoden zur Analyse der Liquorproteine zur Identifizierung von Krankheitsmarkern wird gearbeitet (Hühner 2006, D'Agua 2007).

1.3.1 Gesamteiweißbestimmung

Die Gesamteiweißbestimmung im Liquor ist eine wichtige Erstuntersuchung insbesondere in der Notfalldiagnostik neurologischer Erkrankungen, die in ihrer Bewertung jedoch aus folgenden Gründen problematisch ist (Lott 1989, Lowenthal 1984):

1. Die verschiedenen Methoden, die für diese Untersuchung zur Verfügung stehen variieren sehr in ihren Ergebnissen, sodass der Vergleich dieser von Labor zu Labor schwierig ist.
2. Medikamente und variierende Konzentrationen der Einzelproteine können zu methodischen Störungen führen (Gerbaut 1986, Luxton 1989).
3. Die Normwertbildung ist schwierig, da Lumbalpunktionen immer klinisch begründet sind und somit die Auswahl der Referenzgruppen problematisch ist (Lott 1989).
4. Abhängigkeit des Gesamteiweißwertes im Liquor cerebrospinalis vom Lebensalter der Patienten (Siemes 1977, Garton 1991), vom Ort der Abnahme (Weisner 1978) und dem zeitlichen Ablauf der Liquorabnahme ab.

Zur Verfügung stehen Proteinfällungsmessungen mit z.B. Benzalkoniumchlorid (Luxton 1989) oder Trichloroaceticacid (TCA) sowie Farbmessungen mit z.B. Commasie brilliant blue SDS (Huang 1988) und kombinierte Farb/Fällungsmessungen z.B. TCA Ponceau S (Presce 1973). Das zur Gesamteiweißbestimmung benötigte Probenvolumen variiert zwischen 10 µl und 50 µl.

1.3.2 Elektrophorese

Grundgedanke der Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld ist, dass Proteine amphotere Moleküle sind. Sie besitzen also sowohl positive als auch negative Ladungen, und sind dementsprechend, abhängig von dem die Proteine umgebenden pH Wert der Lösung, positiv oder negativ geladen. Die Standardelektrophorese wird in einem basischen Puffer (pH 8,4) durchgeführt, die Proteine sind hier negativ geladen und wandern daher im elektrischen Feld zur Anode (Kleinert 1990).

Abhängig von dem Trägermedium, das für die Elektrophorese gewählt wird, können Proteine nicht nur nach ihrer Ladung, sondern auch nach ihrem isoelektrischen Punkt oder nach ihrer Molekülgröße im elektrischen Feld aufgetrennt werden.

Als Matrix für die Elektrophoresegele können unter anderen folgende Trägermedien genutzt werden:

Matrix	Anwendung	Trennungsart	Literatur
Papier	heute keine Anwendung mehr	elektrische Ladung	Hesselvik 1939
Cellulosacetat	Serumelektrophorese Liquorelektrophorese	elektrische Ladung	Kohn 1957
Agarosegel (AGE)	1) Serum-, Urin- und Liquor- elektrophorese 2) Spezialelektrophoresen (z.B.Immunprecipitation, DNA/ Lipoprotein-Elektrophorese) 3) Isoelektrische Fokussierung	elektrische Ladung isoelektrischer Punkt	Laurell 1966 Wieme 1965
Polyacrylamidgel (PAGE)	1) Serum-, Urin- und Liquor- elektrophorese 2) Isoelektrische Fokussierung	Molmasse und elektrische Ladung isoelektrischer Punkt und Molmasse	Davis 1964 Delmott 1971

1.3.3 Agarosegelelektrophorese

Agarosegel ist ein langkettiges Polysaccharid, das aus Meeresalgen gewonnen wird. Bei Erwärmung bildet sich eine Doppelhelixstruktur aus, die eine hohe Stabilität und Porengröße des Gels gewährleistet. Im Gegensatz zu Polyacrylamidgel ist Agarosegel nicht toxisch, enthält keine Radikale, erlaubt aufgrund seiner Porengröße die Trennung hochmolekularer Proteine, ist schnell und mit großer Reproduzierbarkeit anzufertigen, ist optisch leer und für eine effiziente Anfärbung und den quantitativen Nachweis von Proteinen besonders gut geeignet (Chrambach 1985). Je nach ihrer Elektroendosmose (EEO) können verschiedene Arten von Agarose für die Elektrophorese eingesetzt werden. Die Elektroendosmose entsteht durch negative Ladung von Sulfat-, Phosphat- und Carboxylgruppen, die an der Agarose hängen und im basischen Puffer eine positiv geladene Pufferwolke über dem Gel bewirken, die eine elektroendosmotische Wasserbewegung verursacht. Dieses bedeutet, dass bei alkalischen Elektrophoresebedingungen Proteine mit positiver/neutraler Ladung durch die EEO in Richtung der Kathode wandern. Speziell für die Liquoranalytik kann man diese EEO nutzen. Die γ -Globuline wandern im basischen Elektrophoresemilieu durch den Einfluss der EEO in Richtung der Kathode, während alle anderen Proteine in Richtung der Anode laufen. Dadurch kann die γ -Globulin Fraktion abhängig von der Stärke der EEO besonders aufgetrennt werden. Dies ist besonders wichtig in der Diagnostik von intrathekalen Immunreaktionen, wie zum Beispiel bei der Multiplen Sklerose.

Das Liquor- und Serumagarosegelelektrophoreseprofil unterscheidet sich unter physiologischen Bedingungen aufgrund der restriktiven Eigenschaften der BLS für den Durchtritt von Proteinen aus dem Serum in den Liquor und durch die hauptsächlich zentral synthetisierten Proteine (Laurell 1972). Die folgende Tabelle zeigt die prozentualen Unterschiede der Proteinverteilung in der Liquor- und Serumelektrophorese im Erwachsenenalter auf:

	Serumelektrophorese*	Liquorelektrophorese**
Transthyretin	meist nicht nachweisbar	4,3 +/-3 %
Albumin	60% - 70%	62,3 +/-13,2 %
α 1-Proteine	1,4 – 2,9 %	4,9 +/-0,2 %
α 2-Proteine	7 - 11 %	5,4 +/-2,5 %
Transferrin	8 - 13 %	8,8 +/-2,4 %
τ -Fraktion		5,9 +/-2,9 %
γ -Globuline	9 -16 %	9,5 +/-3,7 %

* Sebia Agarosegelelektrophorese mit Amidoschwarz Färbung ** Heisel 2007

1.3.4 Immunfixationselektrophorese / Immunoblotting

Die Immunfixationselektrophorese (IF) und das Immunoblotting (IB) werden zur immunologischen Identifikation und Positionsbestimmung bestimmter Proteine in der Elektrophorese eingesetzt (Alper 1969).

Bei der IF werden nach der Elektrophorese einzelne Proteine mit einem spezifischen Antikörper in dem Elektrophoresegel durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion fixiert. Die nicht fixierten Proteine werden in den folgenden Schritten aus dem Gel ausgewaschen. Anschließend werden die zu identifizierenden Proteine durch Färbung sichtbar gemacht.

Bei dem IB (Western Blot) werden die Proteine nach der Elektrophorese auf ein immobilisierendes Trägermedium transferiert und unspezifische Bindungsstellen durch eine Blockierungssubstanz blockiert. Spezifische Proteine werden durch Immunreaktionen mit spezifischen Antikörpern und Färbung sichtbar gemacht.

Abhängig von der Sensitivität der Färbung können Liquorproteine nativ oder nach vorheriger Konzentrierung nachgewiesen werden. Als sensitive Farbstoffe können Silbernitrat oder enzymmarkierte Antikörper mit anschließender Peroxidase-Färbung eingesetzt werden.

In der Liquorproteinanalytik werden diese Techniken hauptsächlich zum Nachweis von oligoklonalen Banden im Liquor in der Agarosegelelektrophorese oder in der isoelektrischen Fokussierung genutzt (Cavuoti 1998, Keir 2008).

1.3.5 Isoelektrische Fokussierung

Die Auftrennung der Proteine erfolgt aufgrund ihres isoelektrischen Punktes. Als Trägermatrix wird EEO-freies Agarosegel oder Polyacrylamidgel, die mit Trägerampholyten vermischt werden, benutzt. Trägerampholyte sind amphotere Substanzen mit einem niedrigen Molekulargewicht und einer hohen Pufferkapazität, durch die es möglich ist, einen pH - Gradienten im elektrischen Feld zu erzeugen, indem sich die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt anreichern können.

In der Liquorproteindiagnostik wird diese Technik besonders zu der Identifizierung von oligoklonalen Banden eingesetzt. Die oligoklonalen Banden im Liquor werden hierfür entweder mit Farbstoffen wie Silbernitrat gefärbt, mittels Antigen-Antikörper-Reaktion in der Immunfixationselektrophorese oder mit der Western-Blot-Technik dargestellt und mit den korrespondierenden Patientenserumproben verglichen (Keir 2008).

1.3.6 Zweidimensionale Elektrophorese mit Massenspektrometrie

Diese Untersuchung wird hauptsächlich zur Identifizierung und Quantifizierung einzelner Proteine im Liquor oder Serum eingesetzt. In einer ersten Dimension werden die Proteine mittels einer isoelektrischen Fokussierung aufgetrennt und anschließend in der zweiten Dimension nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Nach der Färbung stellt sich ein Protein in einem oder mehreren Spots dar, was ein physiologisches oder pathologisches Muster ergibt. Anschließend werden die zu quantifizierenden Spots aus dem Gel gestanzt und massenspektrometrisch untersucht.

Diese Technik findet besonders Anwendung in der Diagnostik neurodegenerativer Erkrankungen (Wallesch, D'Agunno 2007).

1.3.7 Konzentrierung des Liquors cerebrospinalis

Für alle Elektrophoreseverfahren ist es nötig, den Liquor cerebrospinalis zu konzentrieren, es sei denn, die Färbung der Gele erfolgt mit einem hoch sensitiven, jedoch nur in einem engen Konzentrationsbereich linearen Farbstoff, wie z. B. dem Silbernitrat.

Zur Konzentrierung des Liquors cerebrospinalis stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung: Ultrafiltration, Dialyse, Gefriertrocknung oder Präzipitation und Wiederauflösen von Proteinen. Treibende Kraft für die Konzentrierung können Zentrifugalkraft, Adsorption, Unter- oder Überdruck sein.

Die verschiedenen Konzentrierungssysteme unterscheiden sich stark durch auftretende spezifische Eiweißverluste, Ausbeuterate und Konzentrierungszeit.

Eine der gebräuchlichsten Verfahren zur Konzentrierung ist das von der Firma Amicon hergestellte Minicon Konzentrierungssystem. Hierbei liegt hinter einem Molekularfilter ein Absorptionsmedium, das die Flüssigkeit und Proteine aus der Konzentrationskammer zieht, die ein kleineres Molekulargewicht haben als sie durch die Ausschlußgrenze des Filters vorgegeben wird. Zu selektiven Proteinverlusten kann es durch unterschiedliche Absorption von Proteinen an dem Filter, durch Aggregatbildung oder durch Denaturierungsprozesse kommen (Kleine 1980, Fishman 1992, Christenson 1989). Die Ausbeuteraten für verschiedene Konzentrierungssysteme wurden miteinander verglichen, die besten Ergebnisse erbringt das Miliporesystem, welches jedoch sehr zeitaufwendig ist. Es wurden unterschiedliche Ausbeuteraten für Albumin, IgG und Gesamteiweiß gefunden.

1.3.8 Auswertungsverfahren der Elektrophorese / Densitometrie

Die Auswertung der Elektrophoresen erfolgt nach der Färbung, entweder mit dem Auge oder der quantitativen bzw. halbquantitativen Analyse mittels Densitometrie.

Bei der Densitometrie werden Farbintensitäten von Proteinbanden in einem Pherogramm mittels der Absorption (oder Extinktion) von Licht aus einer definierten Lichtquelle bestimmt. Die Lichtquelle tastet das Pherogramm ab. Aus den einzelnen Messpunkten, die von einem Detektor aufgezeichnet werden, wird ein Densitogramm erstellt (Epstein 1984).

Zur quantitativen Erfassung von Proteinen mittels der Densitometrie müssen folgende Grundvoraussetzungen beachtet werden:

- 1) Linearität der Absorptionsmessung für alle zu messenden Proteine
- 2) Keine Schwankungen der Lichtquelle oder Einsatz einer Referenzmessung
- 3) Auswahl der richtigen Wellenlänge für den entsprechenden Farbstoff
- 4) Auswahl des optimalen Lichtspaltes
- 5) Auswahl der optimalen Schrittweite zum Abtasten des Pherogrammes (Kleinert 1990)

Ob eine quantitative Auswertung erfolgen kann, hängt entscheidend von dem Farbstoff ab.

Amidoschwarz ist ein Farbstoff, der in großen Konzentrationsbereichen Proteine linear anfärbt, Silbernitrat ein wesentlich sensitiverer Farbstoff, färbt Proteine jedoch nur in sehr engen Konzentrationsbereichen linear an. Siegert und Siemes (1977) zeigten, dass mittels der Gaußapproximierung von Densitogrammen, Proteine, die mit Amidoschwarz gefärbt wurden, quantitativ dargestellt werden können.

1.3.9 Proteineinzelbestimmungen und Quotientenbildung

Es gibt grundsätzlich zwei Methoden zur quantitativen immunchemischen Bestimmung von einzelnen Proteinen.

- 1) direkte Immunoassays
- 2) indirekte Immunoassays

Zu der Berechnung von Liquor-Serum-Quotienten werden in der Liquorproteinanalytik meist immunchemische Bestimmungsmethoden der Proteine eingesetzt.

Unter anderen wurden von Deplech/Lichtblau (1972) und Tourtelotte (1970) Quotientenformeln zur Beurteilung der BLS-Funktion und zu der Diagnose von intrathekalen Immunreak-

tionen (IR) entwickelt. Basierend auf diesem Wissen wurde von Reiber (1987) ein Quotienten-Diagramm zur einfacheren Diagnose von Liquorveränderungen erarbeitet.

Alle Quotienten-Formeln und Diagramme basieren auf dem Wissen, das Albumin, ein Protein das sowohl in einem großen Prozentsatz im Serum als auch im Liquor zu finden ist, alleinig in der Leber und nicht im ZNS synthetisiert wird. Dieses Protein ist daher ideal, den Zustand der BLS-Funktion zu charakterisieren. Steigt die Konzentration des Albumins im Liquor im Verhältnis zu der Konzentration im Serum an so bedeutet dies, dass eine BLS-Funktionsstörung vorliegen muss.

Das Immunglobulin G im Liquor stammt ebenfalls unter physiologischen Bedingungen nur aus den Serumplasmazellen, passiert jedoch unter normalen Bedingungen die BLS nicht so gut wie das Albumin. Dieser Konzentrationsunterschied wurde durch empirisch gewonnene Faktoren in den meisten Formeln kompensiert, so dass ein direkter Vergleich des Liquor-Serum-Quotientens des Albumins und Immunglobulins G möglich ist. Steigt nur das IgG im Liquor an, so kann dieses durch die Quotienten-Formeln erkannt werden und eine intrathekale Immunreaktion diagnostiziert werden. Nach dem gleichen Prinzip werden auch intrathekale Immunreaktionen des Immunglobulins A und M nachgewiesen.

In Deutschland hat sich für die Basisuntersuchung der Liquordiagnostik das Göttinger Quotienten-Diagramm (auch Reiber-Diagramm genannt) durchgesetzt, welches Schrankenstörungen und lokal synthetisiertes Immunglobulin G, A oder M beurteilt (Felgenhauer 1999). In dem Quotienten-Diagramm ist die Grenzlinie, die Auskunft über intrathekal gebildetes Immunglobulin gibt, eine Hyperbelfunktion. Die Konstanten darin unterscheiden sich jeweils für das Immunglobulin G, A oder M.

Die Sensitivität der Quotientenverfahren zur Detektion einer autochtonen Immunglobulinproduktion im ZNS wird in der Literatur zwischen 60% (Blennow) und 70% (Renz 2005) beschrieben. Zum Nachweis von oligoklonalen Banden wird die isoelektrische Fokussierung in Verbindung mit Immundetektionsverfahren empfohlen (Kleine 1991, Keir 2008). Die normale Agarosegelelektrophorese ist für die Diagnostik von oligoklonalen Banden weniger geeignet (60% Sensitivität) als die Isoelektrische Fokussierung (98% Sensitivität) (Fortini 2003).

1.3.10 Stufenprogramm der Liquordiagnostik

- Erstdiagnostik: Zellzahl, Gesamteiweiß, Laktat, Beschaffenheit
- Basisdiagnostik: Tumorzellen, Albumin- und Immunglobulin Quotienten, oligoklonale Banden

- Spezialdiagnostik: erregerspezifische Antikörper, spezifische Hirnproteine, IEF, zweidimensionale Elektrophorese

2 Fragestellungen

Die oben dargestellten verschiedenen Techniken der Liquoranalyse werden zur Diagnostik von neuropädiatrischen Krankheiten eingesetzt. Einzelne Erkrankungen führen zu unterschiedlichen, zum Teil charakteristischen Veränderungen der BLS-Funktion und /oder zu Immunreaktionen im ZNS.

Proteinveränderungen im Liquor, insbesondere des Gesamteiweißes, des Albumins und des Immunglobulins G werden in den meisten Laboratorien als Erst- oder Basisdiagnostik routinemäßig untersucht. In den letzten Jahren wird zunehmend die Konzentration des Albumins auf altersbezogene Normalwerte bezogen (Reiber 1995). Die Fragestellungen, die beantwortet werden sollen, sind: Liegt eine BLS-Funktionsstörung vor? Gibt es einen Verdacht auf eine intrathekale Immunreaktion? Fragen, ob es ein bestimmtes Muster von Proteinveränderungen gibt, welches Hinweise auf eine bestimmte neuropädiatrische Erkrankung gibt, werden eher selten gestellt. Proteinveränderungsmuster in der Elektrophorese werden in der Regel lediglich in Bezug auf Immunglobulinveränderungen untersucht.

In dieser Arbeit soll daher mittels eines optimierten quantitativen Elektrophoresesystems untersucht werden, ob es bei den oben dargestellten neuropädiatrischen Krankheiten (1.2.4) zu Veränderungen des Liquorproteinmusters kommt, die eine Hilfe bei der Diagnose der Krankheiten geben können.

Es wird ein als Teil dieser Arbeit optimiertes Elektrophoresesystem vorgestellt und seine Anwendbarkeit in der quantitativen Liquorproteinanalyse untersucht. Ein mit der Firma Hirschmann München neu entwickeltes computergestütztes densitometrisches Auswertesystem der Liquoragarosegelelektrophorese wird mit der von Siegert und Siemes (1977) dargestellten quantitativen Auswertung von Liquorelektrophoresen durch Photometrie und anschließender Gaußapproximierung verglichen. Einzelschritte der Elektrophoresevorbereitung sind vereinfacht bzw. neu ausgearbeitet worden. Ihre Verwendbarkeit zur Quantifizierung von Proteinen wird untersucht.

Nachdem gezeigt wird, dass das System zur quantitativen Liquorproteinanalyse verwendet werden kann, wird diese Methode zur Analyse von Kinderliquorproben eingesetzt.

Als erstes werden Normalwerte für die Liquorproteine in der Pädiatrie erarbeitet, um diese in einem zweiten Schritt mit Liquorproben von Kindern, die an bestimmten Erkrankungen litten, zu vergleichen.

Folgende Fragen sollen beantwortet werden:

- 1) Ist das hier vorgestellte optimierte Agarosegelelektrophoresesystem zur quantitativen Analyse der Liquorproteine geeignet?
- 2) Könnte die Agarosegelelektrophorese-Methode als Ergänzung zu immunchemischen Verfahren in dem Basisuntersuchungsprogramme der Liquorproteindiagnostik eingesetzt werden?
- 3) Lassen sich mittels der Liquoragarosegelelektrophorese pädiatrische Normalwerte ermitteln? Sind diese mit den Werten aus der Literatur vergleichbar?
- 4) Gibt es Muster der Liquoragarosegelelektrophorese, die zur Diagnosefindung und Verlaufsbeobachtung der oben vorgestellten pädiatrischen Krankheiten beitragen können?
- 5) Welche Bedeutung kann die Liquoragarosegelelektrophorese für die Diagnose neuropädiatrischer Erkrankungen haben?

3 Methodik

Für die Liquorproteinanalytik in dieser Arbeit wird ein Elektrophorese- und Auswertesystem genutzt, das über Jahrzehnte in dem Labor von Prof. Siegert entwickelt und als Teil dieser Arbeit optimiert wurde. Teile des Elektrophoresesystems wurden besonders in der Probenvorbereitung und Auftragung vereinfacht, so dass einfacher und noch reproduzierbarer größere Probenanzahlen bearbeitet werden können. Zusätzlich wurde das Auswertesystem wesentlich von Siegert und im Zuge dieser Arbeit durch moderne Scan- und Computertechniken vereinfacht, damit so die Auswertung der Elektrophoresepherogramme schneller und rationeller erfolgen kann.

3.1 Probengewinnung

Von 1988 bis 1998 wurden über 4000 Lumballiquorproben (Patientenalter 0 - 85 Jahre) - davon 1800 Proben von Patienten im Lebensalter von 0 -18 Jahren - aus verschiedenen Kliniken in Deutschland zur Proteinanalyse in das Labor auf dem Postweg meist ohne spezielle Kühlung zur Routineanalyse eingeschickt. Der durchschnittliche Zeitraum von Punktion bis zur Bearbeitung der Probe betrug drei Tage, wobei die Proben bis zur Analyse im Kühlschrank bei 4°C gelagert wurden. Zur Bestimmung der Normalwerte der Liquorproteine im Kindesalter wurden 202 aus

1800 pädiatrischen Proben retrospektiv ausgewählt. Die Kinder litten mit höchster Wahrscheinlichkeit an keiner Krankheit, welche die Konzentrationen der Liquorproteine beeinflussten.

Gründe, die zum Ausschluss von Proben zur Normwertbestimmung führten, waren:

traumatische Lumbalpunktion, Unreife des Kindes, unklare Anfälle, Epilepsie, Sepsis, Meningoencephalitis, Radikulitis, Paresen, Hydrozephalus, Psychosen, klinische Zeichen entzündlicher ZNS-Erkrankungen (Fieber und Nackensteifigkeit).

Aufgenommen in die Normwertanalyse wurden: isolierte Entwicklungsretardierung (keine Hirnpathologie), idiopathische Lähmung eines Hirnnerves (N. facialis), Sehstörungen, Müdigkeit, leichte Corpus-callosum-Agenesie, isolierte Kopfschmerzen und einfache einmalige Fieberkrämpfe.

Bei den Patienten, welche die Normgruppe darstellen, gab es keine weiteren Symptome, bildgebende Verfahren (CT, MRT) sowie EEG waren, soweit bekannt, ohne krankhaften Befund und andere Laboruntersuchungen zeigten ebenfalls keine pathologischen Veränderungen.

Die exemplarische Darstellung von pathologischen Liquorproteinveränderungen erfolgt anhand von 5 Erkrankungen. Dazu wurden 101 Kinder aus dem Gesamtkollektiv der Proben ausgewählt, die an einer dieser Erkrankungen litten. Die Diagnosen wurden einerseits retrospektiv durch die Krankengeschichte oder Rückmeldung der Klinik gesichert. Bei dem Krankheitsbild der akuten Leukämie und dem lymphoblastischen Non-Hodgkin-Lymphom stand die Diagnose bereits vor der Untersuchung der Proben fest. Hier und bei dem Guillain-Barré-Syndrom wurden von den pädiatrischen Patienten Serienproben untersucht. Insgesamt wurden so zur Darstellung pathologischer Liquorproteinveränderungen im Kindesalter 297 pädiatrische Liquorproben von 101 Kindern aus dem Gesamtkollektiv von 1800 pädiatrischen Proben untersucht.

3.2 Proteinbestimmung im Liquor cerebrospinalis

3.2.1 Gesamteiweißmessung durch Nephelometrie

Zur Gesamteiweißbestimmung im Liquor cerebrospinalis wurde 20 µl nativer Liquor (Totraumvolumen 200 µl) oder 2 µl konzentrierter Liquor in einer Verdünnung 1:100 (0,9% N-Diluens, Behring) eingesetzt.

Es wurde eine Trichloressigsäure Fällung (TCA 20% Merck) zur Fixed-time Methode mit einem Nephelometer (Behring BNA 100) durchgeführt. Die Eichgerade wurde in 6 Verdünnungsschritten mit einem Standard-Serum (NT Standard Behring) in einem Referenzbereich von 115 bis 3400 aufgestellt. Als Kontrolle diente ein 1:100 verdünntes Kontrollserum (NT Kontrollse-

rum, Behring). Die Erstellung der Eichgeraden und Kontrollen wurden vorschriftgemäß durchgeführt. Die Korrektheit der Richtigkeitskontrollen war Basis aller nephelometrisch durchgeführten Messungen.

Prinzip der nephelometrischen Messungen ist die Detektion von Streulicht bei einer Wellenlänge 840 nm, das durch Trübung in Flüssigkeiten erzeugt wird, die entweder durch Antigen - Antikörper - Komplexe oder eine Fällungsreaktion von Eiweiß mit Trichloressigsäure hervorgerufen wird.

3.2.2 Proteineinzelbestimmung durch Nephelometrie

In 70 Liquorproben wurde das Immunglobulin G, Albumin, Transferrin und α 1-Antitrypsin im Liquor und Serum nephelometrisch für vergleichende Untersuchungen mit der Agarosegelelektrophorese bestimmt. Es wurde mittels eines BNA 100 Nephelometers (Behring) unter Verwendung der Fixed-time-Methode Eichgeraden in 6 Verdünnungsschritten mit einem NT-Standard-Serum und N-Antiserum gegen Human-IgG, -Albumin, -Transferrin und - α 1-Antitrypsin durch Fällungsreaktionen für die Serum- und Liquordiagnostik aufgestellt. Als Liquorkontrolle diente das NT-Kontrollserum (Behring) in einer Verdünnung von 1:100, die Probe wurde nativ eingesetzt. Als Serumkontrolle wurde das NT Kontrollserum (Behring) nativ eingesetzt. Die Erstellung der Eichgerade und Kontrollen wurde vorschriftgemäß durchgeführt. Die Korrektheit der Richtigkeitskontrollen war Basis aller nephelometrisch durchgeführten Messungen.

3.3 Konzentrierung des Liquors cerebrospinalis

Die Liquorproben wurden abhängig von ihrem Gesamteiweißgehalt bis zu einem Verhältnis von 150:1 mit einem einzigartigen in dem Labor entwickelten Ultrafiltrationsgerät eingeengt. Ziel der Konzentrierung war es, möglichst genau, ohne spezifische Proteinverluste, einen Eiweißgehalt von 12 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ im Liquorkonzentrat zu erhalten.

3.3.1 Vorbereitung der Liquorprobe für die Konzentrierung

Vor der Konzentrierung wird das Volumen des Liquors mittels Wägung festgestellt. Aufgrund des Eiweißgehaltes im Liquor und seines Volumens wird dann berechnet, wie viel Liquor eingesetzt werden muss, um bei einer Konzentratmenge von 15 μl genau einen Eiweißgehalt von 12

$\mu\text{g}/\mu\text{l}$ zu erhalten. Diese Proteinkonzentration hat sich als optimal für die spätere Durchführung der Agarosegelelektrophorese erwiesen.

Zur Berechnung der Liquormenge einer Probe, die auf ein Volumen von $15 \mu\text{l}$ eingeeengt werden soll, wurde folgende Formel entwickelt:

$$\frac{\text{Endvolumen (15 } \mu\text{l) x Endkonzentration (12 000 mg/l) x 1,85}{\text{Proteingehalt Probe (mg/l)}}$$

In eigenen Vorversuchen zeigte es sich, dass es durch die Konzentrierung zu einem Gesamtproteinverlust von ungefähr 20% kommt.

Zur Vereinfachung des Vorbereitungsverfahrens der Konzentrierung wurde im Zuge dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit einem Programmierer ein Computerprogramm (Atari Elpho-Programm) entwickelt. Hierbei werden die fortlaufende Probennummer und das Gesamteiweiß der Probe manuell in den Computer eingegeben. Die Wägung der Probe erfolgt durch eine Sartorius-Waage, die direkt an den Computer angeschlossen wurde und das Volumen der Probe übermittelt. Automatisch wird das Leergewicht des Probengefäßes (Saarstedt), das vorher durch Wägung von 100 Probengefäßen durchschnittlich ermittelt wurde, abgezogen. Per Befehl "Rechnen" wird aufgrund der programmierten Konzentrierungsformel ausgerechnet wie viel Liquor für die Konzentrierung eingesetzt werden muss, um in dem Konzentratvolumen von $15 \mu\text{l}$ den Gesamteiweißgehalt von $12 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ zu erhalten.

3.3.2 Konzentrierungsgerät

Das von Siegert entwickelte und für die eigenen Versuche eingesetzte Gerät (US Patent) besteht aus 2 Plexiglasteilen. In das eine Teil ist eine rhombusartige Kammer als Konzentrierungskammer mit einem Konzentratkanal eingelassen. Das andere Teil bildet das erhabene Gegenstück mit einem System feiner Rillen, das in einem Filtrationskanal endet, um ein optimales Abfließen des Filtrates zu gewährleisten.

Auf die Konzentrierungskammer wird eine Teflonmaske gelegt, mit deren Hilfe der Konzentratkanal begrenzt und damit das Konzentratvolumen bestimmt wird (normalerweise $15 \mu\text{l}$). Auf diese Teflonmaske wird ein Molekularfilter (20 000 Da Hoechst UPA 20 Darmstadt) aufgelegt und durch das Plexiglasgegenstück fixiert. Zwei Spannungstangen werden durch Bohrungen in beiden Plexiglasteilen des Konzentrationsgerätes geführt und durch einen Riegel mit einem Druck von 4 Pont verschraubt, um das Gerät abzudichten.

Die Liquorprobe wird in eine 5 ml Hamilton-Spritze (Luer Lock-Ansatz) mit einem Luftpolster von 1 ml aufgezogen. Zu dem Füllen der Konzentrierungskammer wird eine Stahlkanüle an dem Ende der Spritze fixiert und die Kammer durch einen Einföhrungsgang, der ebenfalls einen Luer Lock Verschluss besitzt, von unten startend, luftblasenfrei gefüllt.

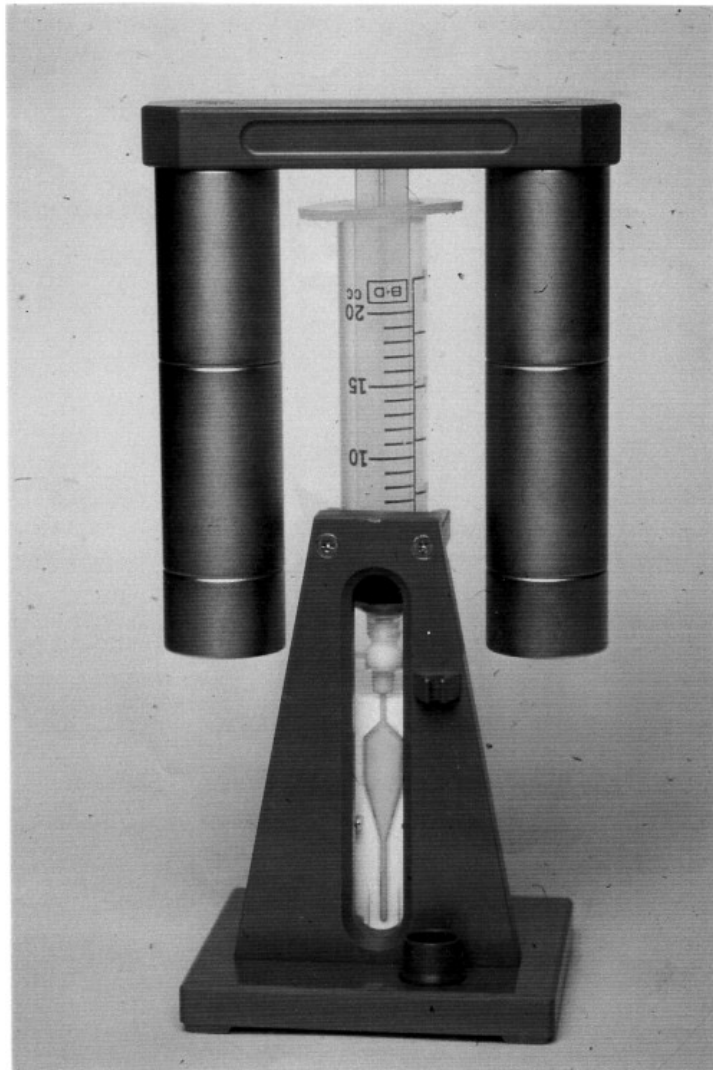


Abb. 1: Mikrokonzentratör US Patent Nr. 5,092,997

Ist die Konzentrationskammer gefüllt, wird der verbleibende Liquorrest in der Spritze auf den Luer Lock Verschluss der Kammer geschraubt. Treibende Kraft der Konzentrierung ist ein Gewicht (1-3 kg) auf dem Stempel der Spritze. Die Probe wird durch den Molekularfilter gedrückt, wobei alle Proteine mit einem Molekulargewicht größer als 20 000 Dalton in dem Konzentrationskanal verbleiben, alle kleineren passieren den Filter und laufen am Kammergegenstück in den Filtrationskanal ab, der in einen Schlauch übergeht. Das Filtrat wird in einem Gefäß außerhalb des Gerätes gesammelt und kann für weitere Untersuchungen, wie zum Beispiel Aminosäurebestimmungen verwendet werden.

Die Konzentrationszeit beträgt maximal 45 Minuten. Zur besseren Ausbeute wird der Filtrationschlauch umgedreht und das Filtrat gegen den Filter rückgeströmt, um so eventuelle Proteinniederschläge auf der Membran zu lösen. Die erneute Konzentrationszeit beträgt 3 Min.

Das Konzentrat wird dann mit einer Hamilton-Glasspritze mit einem Volumen von 50 μl , auf die eine stumpfe Kanüle befestigt ist, abgenommen. Bei der Abnahme kommt das Konzentrat nicht in Berührung mit der Hamilton Spritze, sondern wird nur in die Kanüle aufgenommen, um so Kontaminierungen zu verhindern. Das Konzentrat wird in vorher tarierte Gefäße zur späteren Volumen- und Eiweißbestimmung und anschließender Auftragung abgegeben.

3.4 Elektrophorese

3.4.1 Agarosegelplatten

Für die Elektrophorese der Liquorproteine werden Objektträger mit 1,2% Seakem-Agarose (ME= mittlere Elektroendosmose - FMC, Rockland, USA) in 50% Elektrophorese Veronal-Gebrauchspuffer (pH 8,4) mit einer Schichtdicke von 1,6 mm beschichtet. Hierfür werden je 6 Objektträger auf eine Glasplatte mit einem spezial dünnen Doppelklebeband befestigt. Nach Fixation der Objektträger auf die Platte werden durch jede Ecke der Platte, die dort Durchbohrungen besitzt, je eine Schraube gesteckt. Auf diese Schrauben werden Muttern gelegt, die als Distanzstücke die Agarosegelschichtdicke bestimmen. Ein Draht, der mit Gummi beschichtet ist, wird als Dichtung um die Objektträger gelegt. Die zweite Glasplatte, ebenfalls mit Durchbohrungen, wird darüber geschichtet und durch Flügelschrauben fixiert. Hiermit hat man eine Kassette, mit der es möglich ist, Agarosegelelektrophoretträger mit einer exakten Schichtdicke zu gießen.

In diese Kuvette wird die Agarose, nach 10 minütigen Kochen bei 90 °C und darauf folgendem Abkühlen auf 70 °C, gegossen. Nach Abkühlung Agarosegelträger auf Raumtemperatur werden die Gele für mindestens einen Tag im Kühlschrank bei 4 °C gelagert, bevor sie weiterverwendet werden können.

3.4.2 Probenauftragungsstelle

Zur Auftragung werden an das kathodische Ende des mit Agarose beschichteten Objektträgers je 2 Gräben mit einem Volumen von 9 µl gestanzt. Hierfür wurde eine Spezialstanze aus Edelstahl mit zwei kleinen Greifarmen, die das Agarosegelstück herausgreifen, gebaut. Nach jeder Stanzung wird das Gerät mit Pressluft von innen gereinigt.

3.4.3 Probenauftragung

Die Probenauftragung erfolgt als Proben-Agarose-Gemisch, um Diffusionsvorgängen der Proteine aus dem Auftragschlitz vor der Elektrophorese entgegen zu wirken.

Für eine optimale Elektrophorese sollen insgesamt 60 µg Protein, als Protein-Agarose-Gemisch aufgetragen werden, wobei der Anteil der Probe nicht 2/3 überschreiten soll.

Insgesamt werden 9 µl des Protein-Agarose-Gemisches aufgetragen, das heißt bei einem optimalen Proteingehalt von 12 µg/µl im Konzentrat wird ein Mischungsverhältnis Probe/Agarose von 5:4 hergestellt. Für diese Berechnung wird wiederum das ELPHO-Atari-Programm eingesetzt, das gleichzeitig auch die Einzelschritte der Auftragung steuert. Zusätzlich wird automatisch die Wiederfindungsrate des Gesamtproteins nach Konzentrierung, d.h. der Gesamtproteinverlust durch die Konzentrierung, berechnet.

Das Volumen des Konzentrates wird mittels Wägung auf der Sartorius-Waage bestimmt, wobei automatisch der Leerwert des vorher austarierten Gefäßes abgezogen wird. Die Daten werden automatisch in das Programm übertragen. Manuell wird der Eiweißwert des Konzentrates, der nephelometrisch aus 2 µl des Konzentrates ermittelt wurde, eingegeben. Mit dem Befehl "Rechnen" werden die Rechenvorgänge gestartet. Das Mischungsverhältnis Agarosegel-Protein und die Wiederfindungsrate erscheinen. Diese Daten werden gespeichert und später für das ELPHO-Auftragungsprogramm zur Probenauftragung genutzt.

Thermoblock

Die Probenauftragung erfolgt als warmes Agarose-Protein-Gemisch, d.h. die Agarose muss geschmolzen und temperiert werden. Hierfür wurde ein Thermoblock entwickelt, in dem die Agarose in einem Glasgefäß auf 90 °C erhitzt wird. Für die Mischung der Agarose mit der Probe wird diese Agarose dann auf 50 °C temperiert.

Die Proben können in kleinen Ausbuchtungen im Frontteil des Gerätes auf 30 °C vortemperiert werden, um so eine spätere Gelierung des Agarosegel-Protein-Gemisches zu verhindern.

Im hinteren Teil des Gerätes befindet sich ein temperierter Mixer, in dem die Probe und Agarose zur Auftragung gut gemischt werden können.

Thermopipette

Die Auftragung Agarosegel-Protein-Gemisches erfolgt mittels einer speziell entwickelten Thermopipette, um so das Gelieren der Probe während der Auftragung zu verhindern. Die Steuerung der Pipette erfolgt durch das Atari-ELPHO-Auftragungsprogramm über einen Hamilton-Diluator.

Die Datei aus dem ELPHO-Vorbereitungsprogramm, welche die Daten für das ELPHO-Auftragungsprogramm liefert, wird aufgerufen und das Mischungsverhältnis Proteinkonzentrat-Agarosegel wird vorgegeben. Bis zu 50 so vorprogrammierter Proben können in verschiedenen Mischungsverhältnissen aufgetragen werden. Die Bedienung der Thermopipette erfolgt über eine Fußtaste, so dass beide Hände zur Manipulation des Elektrophoresegels frei sind.

3.4.4 Elektrophorese

Die Elektrophorese erfolgt in einer stark modifizierten Wieme-Kammer. Die Elektrophoreseträger werden in einen mit Petrolether (Merck, Darmstadt) gefüllten Raum, der ständig gekühlt und mit einem Magnetrührer gemischt wird, eingetaucht. Die Träger stehen jeweils links und rechts 0,5 cm mit in Puffer und Agarosegel getränkten Schaumstoffblöcken in Kontakt. Diese haben mit dem Anoden- bzw. Kathoden-Pufferraum, in der die eigentlichen Platinelektroden eintauchen, Verbindung. Genutzt wird hierbei das Prinzip der kommunizierenden Röhren, Petrolether kann nicht über die Schaumstoffblöcke in den Pufferraum gelangen, da er spezifisch leichter als der Puffer ist. Der Gebrauchspuffer von Anode und Kathode (Natrium-Barbital pH 8.4 Merck) wird durch ein Pumpsystem ständig ausgetauscht und ebenfalls gekühlt.

Die Kühlung des Puffers und des Petrolethers erfolgt durch mit Kühlmittel durchflossene Kühlelemente, die in den Flüssigkeiten liegen. Betrieben wird die Kühlung durch einen Kühlthermostat. Es kann so eine konstante Elektrophoresetemperatur von 8 °C erreicht werden.

Die Elektrophoresezeit beträgt 35 Minuten bei einer Spannung von 200 V (29 V/cm) und einer Stromstärke von 145 mA.

3.4.5 Fixation/Wässerung/Trocknung

Die Fixation der Proteine erfolgt in 5% Essigsäure für eine Stunde. Nach der Fixation werden die Agarosegelträger zur Lösung der Puffersalze für drei Stunden in Aqua dest. gewässert und anschließend bei 42 °C in einem Trockenschrank über Nacht getrocknet. Die Schichtdicke der Gele reduziert sich auf 0,2 mm.

3.4.6 Immunfixation

Für die Identifikation einzelner in der Elektrophorese aufgetrennter Proteine wird eine Immunfixationselektrophorese durchgeführt.

Nach der Elektrophorese wird das Agarosegel mit einem Filterpapier kurz abgedeckt, um so auf der Oberfläche befindliches Petrolbenzin zu entfernen. Jeweils 20 µl eines bestimmten Antikörpers wird auf ein Celluloseacetatstreifen pipettiert und auf die Stelle, an der das zu identifizierende Protein vermutet wird, aufgebracht. Die Elektrophoreseträger werden anschließend für eine Stunde bei 40 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach der Inkubationszeit wird dieses Papier entfernt und ein mit physiologischer Kochsalzlösung getränktes Filterpapier, dann mehrere Lagen trockenen Filterpapiers, darauf wiederum ein Plastikbrettchen und schließlich ein Gewicht (200 g) aufgelegt. Das Filterpapier wird bis auf die unterste Schicht mehrmals gewechselt, um so alle Flüssigkeit aus dem Agarosegelträger aufzusaugen.

Bei allen Immunfixationen wurde die Albuminfraktion als Bezugspunkt mittels Pikrinsäure markiert, um die Position der zu identifizierten Proteine in der Elektrophorese genau zu erfassen.

3.4.7 Färbung

Die bis auf eine Schichtdicke von 0,2 mm herunter getrockneten Agarosegelträger werden mit 0,5% Amidoschwarz (10 B Merck) in 5 prozentiger Essigsäure für 25 Min. gefärbt und in 2% Essigsäure für jeweils 5, 10 und 20 Min. entfärbt. Die Färbung erfolgt automatisch, um so eine optimale Reproduzierbarkeit und eine Vereinfachung der Färbung zu erreichen. Nach der Färbung werden die Träger mit Aqua dest. abgespült und nochmals getrocknet.

3.5 Optische Auswertung der Agarosegelelektrophorese

3.5.1 Photometrie

Zur Photometrie wurde ein Chromatogrammspektrophotometer (PMQ 2 Carl Zeiss), das an einen Extinktionsschreiber (W+W Recorder 1100 Schreibgeschwindigkeit 10 cm/Minute) angeschlossen ist, eingesetzt. Die Spaltbreite der Lichtquelle betrug 0,04 mm. Das Pherogramm wurde mit einer Geschwindigkeit von 155 mm/Min. über die Lichtquelle bewegt. Die Aufzeichnung des Pherogrammes erfolgt bei einer Wellenlänge von 610 nm und einer Extinktion

von 0-1. Proben mit niedriger Proteinkonzentration werden bei einer Extinktion von 0-0,5 registriert. Ausnahme bildet das Albumin, das bei einer Wellenlänge von 482 nm aufgezeichnet wurde und auf 610 nm mit einem empirisch ermittelten Faktor von 3,71 umgerechnet wurde (Siemes, Siegert 1977).

3.5.2 Densitometrie

Das hochauflösende transilluminierende Densitometer (Hirschmann Elscript 500) und die dazu gehörigen Programme wurden speziell für die Auswertung von Elektrophoresen nach dem Vorbild des Hochgeschwindigkeitsscanners von Neuhoff (1990) entwickelt.

Ein Probentablett, das alternativ Objektträger verschiedener Größe zur eindimensionalen Auswertung oder Glasplatten zur Auswertung von zweidimensionalen Elektrophoresen aufnehmen kann, wird mit Hilfe von Schrittmotoren, die durch einen Computer gesteuert werden, über eine Lichtquelle bewegt.

Mit diesem speziell entwickelten Densitometer ist es somit möglich, 28 Zonenelektrophoresen auf 14 Objektträgern in 2 Min. in Schritten von 0,1 mm zu densitometrieren.

In dieser Arbeit wurde die Auswertung von eindimensionalen Agarosegelelektrophoreseträgern mittels Transmissionsmessung vorgenommen.

Das Licht einer Halogenlampe passiert einen Grünbandfilter mit der Wellenlänge von 544,9 nm, wird in einer Blende (2,5 x 0,3 mm) fokussiert, transilluminiert dann den Elektrophoreseträger, trifft auf das Fokussierteil eines Zeiss Mikroskops und wird durch einen Photomultiplier, der dem Mikroskop aufsitzt, aufgefangen. Die Pherogramme werden bei einem Extinktionsbereich von 0-4 OD aufgezeichnet. Die minimale Auflösung wurde 200 dpi festgelegt.

Die Steuerung der Messung erfolgt über ein speziell entwickeltes Adapter-Meßprogramm (ADP 500). Dieses Messprogramm beinhaltet eine so genannte ABD-Meßdatei, mit der als ASC3-Textdatei die einzelnen Variablen zu der Messung festgelegt werden. Der Adapter ist ein Probentablett dessen Koordinaten anhand einer X- und Y- Achse bestimmt werden und maximal 14 Objektträger aufnehmen kann.

In der ersten Zeile der Messdatei wird die Zahl der Messfelder festgelegt.

Die zweite Zeile definiert den Abgleichpunkt (Punkt der Maximalen Intensität) der Messung, der durch x-Achsen und y-Achsen-Koordinaten festgelegt, ist die Meßmethode (hier Transmission) und die maximal erlaubte Intensität der Messung.

Die jeweils zwei folgenden Zeilen beschreiben die Geometrie und Feldtyp der sich anschließenden Messfelder. Hierbei wird Start- und Endpunkt der Messung auf der X- und Y- Achse be-

stimmt, außerdem werden die Schrittweite in beiden Richtungen zum Abtasten der Elektrophorese, die Nummer des Scanfildes, der Feldtyp und die Standardnummer der Probe festgelegt.

Aus Start- und Endpunkt des Scannens auf der X-Achse werden die Zahl der Messzeilen und aus denselben Variablen auf der Y-Achse die Zahl der Messpunkte pro Messzeile errechnet.

Die Messwerte werden von dem Photomultiplier zu einem DOS-kompatiblen PC als 16 bit-Zahlen in eine Messdatei (**.dat) übertragen, welche die Informationen der Transmissionsmessung beinhalten. In einer Protokolldatei werden alle Punkte pro Teilschritt, Gesamtzahl der Teilschritte, maximale und minimale Transmissionswerte gespeichert und gemittelt.

Aus technischen Gründen liegt die Zahl der maximal auswertbaren Messpunkte bei 615 für eine Normalelektrophorese. Erfolgt die Auswertung von Dateien über ein zweidimensionales Auswertprogramm so können mehr Punkte ausgewertet werden.

Für die quantitative Auswertung wurden zwei verschiedene Systeme genutzt, die aber beide die Summenkurve der Proteinfractionen nach der Gaußschen Normalverteilung auflösen.

3.5.3 Analogcomputer zur quantitativen Auswertung

Für die Auswertung der Pherogramme wurde ein Du Pont-Analogcomputer stark modifiziert, indem zusätzliche Generatoren und digitale Anzeigefelder eingebaut wurden (Siegert, Siemes 1977).

Das Pherogramm wird hiermit in Normalverteilungen einzelner Proteinfractionen aufgelöst. Achtzehn Funktionsgeneratoren können maximal 18 Normalverteilungen von Proteinen darstellen. Jeder Funktionsgenerator besitzt 3 Generatoren, mit denen Höhe, Breite und Position der einzelnen Normalverteilungen variiert werden können. Durch ein Spiegelsystem werden die so generierten Computerkurven auf die bei 610 nm aufgenommene Pherogrammkurve abgebildet. Jedem Proteinpeak wird eine Gaußkurve zugeordnet. Diese werden in Höhe, Breite und Position variiert, bis die Summenkurve der Gaußkurven der zu analysierenden Pherogrammkurve entspricht. Die Integralangabe zu jedem Gaußpeak, sowie deren Kurvenverlauf wird per Hand in das Pherogramm eingetragen. Zusätzlich können Angaben über Halbwertsbreite, Position, und Höhe jedes Peaks archiviert werden. Der Albuminpeak, der bei 482 nm aufgenommen wurde, wird separat integriert und der Wert des Integrals mit einem Umrechnungsfaktor (3,71) auf die Wellenlänge 610 nm angepasst.

Zur Normierung der horizontalen Achse des Pherogrammes wird die Mitte des Albuminpeaks als 39,5% und Auftrageschlitz mit 100% willkürlich festgelegt. Die Position des am schnellsten

wandernden Präalbumins ist somit kleiner 39,5%, die des durch Elektroendosmose kationisch wandernden Immunglobulins G größer 100%.

3.5.4 Hirschmann Elscript 500 Elektrophoreseauswerteprogramm

Das Elscript 500 Elektrophoreseauswertungsprogramm wurde aufgrund der Erfahrungen, die mit dem Auswertesystem mittels des Analogrechners gewonnen wurden, zur Vereinfachung der Analyse der Elektrophorese in Zusammenarbeit des Labors Siegert im Zuge dieser Arbeit mit der Firma Hirschman entwickelt.

Grundprinzip der Auswertung ist, dass die einzelnen Proteinfractionen in Gaußsche-Normalverteilungen aufgeteilt werden, wobei im Gegensatz zu dem Analogrechner bis zu 50 Fraktionen analysiert werden können.

Die Auswertung der Elektrophoresepherogramme erfolgt über das Siaus-Auswerteprogramm. Der Aufruf dieses Programms schließt eine Definitionsdatei, die Messdatei und darüber die Protokolldatei ein. Erscheint die erste gemessene Extinktionskurve auf dem Bildschirm, wird diese analog zu der oben beschriebenen Methode zur Auswertung auf der X-Achse normiert, Mitte Albumin entspricht 39,5% und Mitte Auftrageschlitz 100%.

Die Auswertung der Pherogramme erfolgt nach Normierung automatisch durch Gaußapproximierung mit 16 Standardpeaks, die in einer Definitionsdatei in ihrer Position vorgegeben wurden.

In der Definitionsdatei werden zusätzlich folgende Parameter zur Auswertung festgelegt:

Glättung der Rohdaten und Krümmung, Empfindlichkeit der Erkennung, minimale Peakbreite und Peakhöhe, maximale Anzahl der Gaußiterationen, Approximations Inkremente, max. Peak Rutsch, max. HWB Änderung, Zahl der Normalpeaks, Basislinienkorrektur ja/ nein.

Die Positionen der Standardpeaks für die einzelnen Proteine wurden mittels Immunfixationsversuche festgelegt (siehe Versuchsteil).

Zu Beginn der automatischen Auswertung wird der Mittelwert der einzelnen Scanzeilen pro Spur gebildet. Das bedeutet für die Auswertung, dass der Mittelwert von 2 Scanzeilen genommen wird. Zur Entfernung von Hintergrundstörungen kann eine Basislinienkorrektur durchgeführt werden, welche die Messresultate nicht beeinflusst.

Nach automatischer Peakerkennung ist meist eine leichte manuelle Korrektur der Ergebnisse nötig, da Proteine bei pathologischen Prozessen ihre elektrische Ladung verändern können und sich somit die Position dieser Proteine in der Elektrophorese verschieben kann.

Die Summenkurve der Gaußpeaks ergibt die eigentliche Extinktionskurve der Pherogramme. Ist die Auswertung beendet, so kann die Kurve entweder elektronisch archiviert oder ausgedruckt werden. Die Auswertung enthält die Angaben über Probennummer, Position des Peaks auf der x-Achse, Peak Höhe, Extinktion, Integral und für die spätere Befundung die prozentualen Aufteilungen der einzelnen Proteinfractionen.

3.6. Statistische Auswertungsmethoden

Die Daten wurden mit SAS-Version 6.10 unter Windows analysiert. Verwendet / bestimmt wurden: lineare Regression, Variationskoeffizient, Wilcoxon-Rangsummen-Test, univariate deskriptive Statistiken und der Ryan-Einot-Gabriel-Welsh-Spannweiten-Test. Das Signifikanzniveau wurde auf 0,05 festgelegt und - falls nötig - für multiple Vergleiche korrigiert.

Für normalverteilte Daten werden der Mittelwert und die Standardabweichung angegeben. Unterschiede zwischen wiederholt untersuchten Daten, wie zum Beispiel der Untersuchung der Konzentrierungsgeräte auf spezifische Proteinverluste, wurden mit dem Wilcoxon-Rangsummen-Test evaluiert, indem der Test wiederholt für die einzelnen Proteine eingesetzt wurde.

Für die Erstellung der Altersnormalwerte im Kindesalter wurden die Patienten nach ihrem Lebensalter geordnet. Altersgrenzen wurden entsprechend vermuteter unterschiedlicher Entwicklungsstadien gewählt. Danach wurden die Daten auf Unterschiede zwischen Altersgruppen durch das lineare Modell untersucht. Der Ryan-Einot-Gabriel-Welsh-Spannweiten-Test führte Altersgruppen, die keine Unterschiede in Hinblick auf Streuung der Verteilung zeigten, wieder zusammen. Der R^2 Wert entspricht dem Anteil der gesamten Varianz (Streuung), der durch das lineare Modell erklärt wird. Die Verteilungen der Altersnormalwerte der Proteinkonzentrationen sind in einer Tabelle und in Boxplots dargestellt.

Die Ergebnisse der Liquorproteinelektrophorese bei den 5 ausgewählten Erkrankungen sind auf die Altersnormalwerte normiert worden. Werte von 1 sind Normalwerte, Werte die größer oder kleiner als 1 sind pathologische Werte. Die normierten Veränderungen der Liquorproteinkonzentrationen sind in Boxplots dargestellt. Ist der normierte Wert größer als 1, zeigt dieser einen multiplen über die Norm erhöhten Probenwert des jeweils auf der x-Achse dargestellten Proteins/ der Proteingruppe auf der y-Achse an (bis 10-fach erhöht), ist der normierte Wert kleiner als

1, zeigt dieser einen gegenüber der Norm multiplen erniedrigten Probenwert auf der y-Achse an (bis 0,1-fach erniedrigt).

Die Querlinie der Boxplots zeigt den Median der Werteverteilung, die Boxenkanten zeigen die 25ste und 75ste Perzentile der Verteilung, und die Linien zeigen die 10te und 90zigste Perzentile der Werteverteilung an.

4 Ergebnisse

4.1 Methodische Ergebnisse

4.1.1 Gesamteiweißbestimmung

Zur Überprüfung der Präzision der nephelometrischen Eiweißbestimmung wurden jeweils 10x ein Kontrollserum (Behring) in einer Verdünnung von 1:100 und ein Liquor an 10 aufeinander folgenden Tagen bestimmt und die relativen Variationskoeffizienten (VK) untersucht.

Methode	VK % Liquor	VK % Kontrolle
Nephelometrie	5,2 – 7,5	1 - 9

4.1.2 Proteineinzelbestimmungen - Nephelometrie BNA 100

Um die Genauigkeit der Proteineinzelbestimmung des Immunglobulin G, Albumins, α 1- Antitrypsins und Transferrins durch die Nephelometrie (BNA 100) zu überprüfen, wurde ein Kontrollserum nativ für die Bestimmung der Serumproteine (siehe Serum in Tabelle) und das gleiche Serum in einer Verdünnung von 1:100 als Kontrolle (siehe Liquor in Tabelle) für die Liquorproteine mehrfach untersucht und der relative Variationskoeffizient berechnet.

Protein	Albumin	α 1-Antitrypsin	Transferrin	Immunglobulin G
Liquor VK% (N1 = 14)	7,70	5,90	5,90	5,50
Serum VK% (N2=10)	8,30	3,00	3,50	5,00

N1 = Zahl der Liquorproben; N2 = Zahl der Serumproben

4.1.3 Konzentrierungsgerät

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Konzentrierung und zu der Feststellung des absoluten Proteinverlustes durch die Konzentrierung wurde 12 x ein Standardserum (NT - Standardserum, Behring) mit einem Proteingehalt von 70 g/l 1:100 verdünnt und mit dem oben beschriebenen Konzentrierungsgerät eingengt.

Probe	Konz Menge (μ l)	Konzentrat TP (μ g/ μ l)	Ausbeute (μ g)	Ausbeute (%)
1,00	18,50	12,80	236,80	71,00
2,00	19,20	13,90	266,88	80,00
3,00	19,70	14,80	291,56	87,00
4,00	18,40	16,90	310,00	93,00
5,00	18,00	13,80	248,00	74,00
6,00	19,00	14,60	277,00	83,00
7,00	18,00	13,50	243,00	73,00
8,00	16,40	18,20	298,00	89,00
9,00	15,40	17,10	263,00	79,00
10,00	15,70	15,80	248,00	74,00
11,00	17,60	15,70	276,00	83,00
12,00	17,80	14,10	250,00	75,00
Mittelwert	17,96	14,95	267,35	80,10
SD	1,64	1,41	23,56	7,04
VK	9,00	9,40	8,80	8,80

SD = Standardabweichung, VK = Variationskoeffizient

In der Tabelle wird die Menge des Konzentrates, der durch Nephelometrie gemessene Gesamteiweißgehalt des Konzentrates und die Ausbeuterate der Konzentrierung dargestellt.

Die Ausbeuterate der Konzentrierung beträgt, ausgehend von der in der Routine eingesetzten Nephelometrie zur Bestimmung des Eiweißes im Konzentrat, 80,1% +/-7%, was bedeutet, dass es durch die Konzentrierung zu einem Gesamteiweißverlust von durchschnittlich 20% kommt.

Die Präzision der Konzentrierung zur Erlangung eines Zieleiweißes hat einen Variationskoeffizienten von 8,8%, das gewollte Endvolumen wird mit einer Präzision von $VK = 9\%$ erreicht. Zum Ausschluss eines spezifischen Eiweißverlustes durch die Konzentrierung wurden ein Standardprotein und ein Humanserum mit klonalen Immunglobulin G-Banden vor und nach der Konzentrierung mehrfach ($N=9$) elektrophoretisch untersucht. Die Serumproben wurden entweder auf einen Proteingehalt von $12 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ oder 1:200 verdünnt. Die stark verdünnten Proben (1:200) wurden mit dem beschriebenen Konzentrierungsgerät wiederum auf einen Proteingehalt von $12 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ konzentriert. Die verdünnten bzw. konzentrierten Proben wurden mittels der beschriebenen Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und anschließend analysiert. Das Muster der Serumproteine vor und nach Konzentrierung wurde verglichen. Es zeigten sich keine Eiweißverschiebungen durch die Konzentrierung der Proteine des Standardserums oder des Patientenserums für die Proteine Albumin, β 1-Globuline und γ -Globuline. Einen Unterschied vor/ nach der Konzentrierung ergaben sich für die α 1-Proteine des Human-Standardserums ($2,1 \pm 0,2\%$ vs. $2,7 \pm 0,4\%$; $P = 0,001$) und die α 2-Proteine ($5,9 \pm 0,3\%$ vs $5,5 \pm 0,3\%$; $P = 0,01$). Die klonale Fraktion des Patientenserums wurde durch den Konzentrierungsprozess nicht beeinflusst. Der Vergleich dieser Fraktion vor und nach der Konzentrierung zeigte eine hohe lineare Korrelation von $r^2 = 0,98$.

4.1.4 Elektrophorese

4.1.4.1 Linearität der Proteinfärbung

Zur Kontrolle der Linearität der Proteinfärbung wurde eine Verdünnungsreihe eines Human-Standardserum (Behring) in Konzentrationen von 8-72 g/l zur Elektrophorese aufgetragen. Die Konzentrationsreihe wurde nach der Elektrophorese mit Amidoschwarz gefärbt und anschließend, wie oben beschrieben, mit dem Hochgeschwindigkeitsdensitometer ausgewertet. Es wurde der absolute Gehalt des Albumins, der α 1-, α 2-, β - und γ -Globuline der jeweils aufgetragenen Proteinmenge gegenübergestellt. Die absoluten Proteingehalte ergeben sich durch Multiplikation des Eiweißgehaltes der Probe mit dem relativen Anteil des Proteins/der Proteinfraktion an dem Gesamtintegral.

Es zeigte sich eine starke lineare Korrelation (r^2) zwischen dem aufgetragenen Proteingehalt und den Flächen unter den Gaußkurven:

Protein	Albumin	α 1-Globuline	α 2-Globuline	β -Globuline	γ -Globuline
r^2	0.992	0.991	0.994	0.994	0.995

Die relativen Proteinkonzentrationen waren nicht abhängig von der jeweiligen aufgetragenen Proteinkonzentration. Ausnahme bildeten das Albumin und die β 1-Globuline, wobei hier für Albumin die maximale Abweichung 3,5% in dem beschriebenen Konzentrationsbereich betrug.

4.1.4.2 Genauigkeit der Elektrophorese

Zur Kontrolle der Genauigkeit der Elektrophorese wurde ein Human-Standardserum insgesamt 9-fache zur Elektrophorese aufgetragen und nach Färbung densitometrisch untersucht. Die 6 Haupt- Proteinfractionen wurden dann als relative Werte auf ihren Variationskoeffizienten (VK) untersucht. Es ergaben sich folgende Ergebnisse für den relativen VK: Albumin 1,3%; α 1-Globuline 7,7%; α 2-Globuline 4,5%; β -Globuline 4,2%; γ -Globuline 4,5%.

4.1.4.3 Proteinpositionen in der Elektrophorese

Zur Sicherung der Positionen einzelner Proteine auf der x-Achse der Elektrophoresepherogramme wurden anhand von nicht pathologischen Liquorproben Immunfixationen für die Proteine Transthyretin (TT), α 1-Antitrypsin (α 1-AT), α 2-Makroglobulin (α 2-MG), Haptoglobin (Hp), Transferrin (Tf), τ -Fraktion (τ) und Immunglobulin G (γ -GL) durchgeführt. Die Immunfixations-Pherogramme wurden mit den beiden hier vorgestellten Scansystemen aufgenommen und mit der Gaußapproximierung per Analogrechner und dem Computerprogramm Elscript 100 analysiert.

Für beide Methoden wurden die Albuminfraktion und der Auftrageschlitz der Elektrophorese, der bei der Auswertung eine Markierung hinterlässt, als Bezugspunkt für die Auswertung ausgewählt. Die Albuminfraktion erhielt die willkürliche Position 39,5% und der Auftrageschlitz der Probe die Position 100% auf der X-Achse des Densitogramms, alle anderen Proteine erhielten ihre Position in dem Densitogramm nach der Normierung der Elektrophorese, relativ zu diesen Fixpunkten. Eine Identifikation einzelner Proteine konnte so anhand ihrer Positionen auf der X-Achse erfolgen.

Nach der Festlegung der Positionen der Proteine durch eine erste Immunfixation wurden die Positionen der Proteine statistisch erfasst. Dafür wurden Pherogramme gesunder Patienten und Immunfixations-Pherogramme densitometrisch ausgewertet und Mittelwerte und Standardabweichung der Proteinpositionen berechnet.

Protein	Position (%) per Computer	Standard-abweichung	Analogrechner Position (%) Immunfix	Standard-abweichung	Computer Position (%) Immunfix	Standard-abweichung
Transthyretin	16,25 (42)*	1,27	-	-	16,7 (9)*	0,82
α 1-Antitrypsin	48,4 (41)*	1,10	49,9 (8)*	0,20	48,9 (19)*	1,10
α 2-Makroglobulin	61,6 (46)*	2,30	66 (6)*	0,51	64,6 (12)*	1,59
Haptoglobin	70,6 (48)*	2,50	72,7 (4)*	0,60	72,8 (4)*	0,60
Transferrin	83,2 (42)*	0,46	82,3 (14)*	0,48	83,3 (25)*	0,45
τ -Protein	93,8 (42)*	0,35	-	-	94,1 (5)*	0,55
γ -Globulin	96,8-142 (33)*	0,26-2,28	-	-	-	-

*Zahl der untersuchten Proben

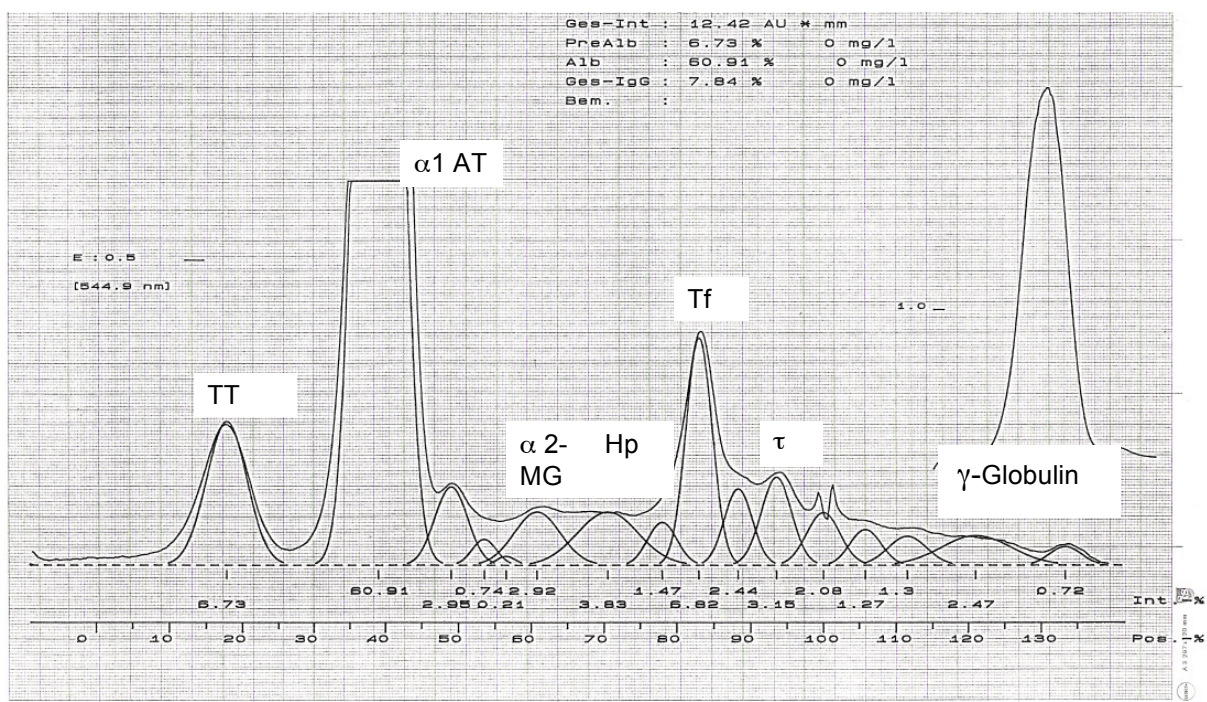


Abb. 2: Liquorelektrophorese mit Lage der einzelnen Proteine in der Elektrophorese, aufgenommen mit dem Hirschmann-Hochgeschwindigkeit-Densitometer (TT = Transthyretin; α 1-AT = α 1- Antitrypsin, α 2-MG = α 2-Makroglobulin; Hp = Haptoglobin, Tf = Transferrin, τ = τ -Fraktion, Pos.-% Position der Proteine auf der X-Achse, Int.-% prozentualer Anteil der Gaußkurve an dem Gesamtintegral)

4.1.5 Vergleich von Analog - und Computerelektrophoreseauswertung

Hundert Liquorproben wurden mittels der Photometrie und anschließender Gaußapproximierung sowohl mit dem Analogrechner als auch durch die Hochgeschwindigkeitsdensitometrie mit anschließender Gaußapproximierung durch das Computerprogramm Elscript 100 ausgewertet. Die Proben wurden zufällig gewählt und beinhalteten Liquores sowohl gesunder als auch kranker Patienten als auch von Kinder und Erwachsenen.

Der aufgetragene Proteingehalt lag nicht bei allen Proben bei der Idealkonzentration von 60 µg, sondern schwankte zwischen 20 µg und 60 µg. Diese Unterschiede sind durch mangelndes Ausgangsvolumen der Probe zu erklären.

Die vergleichenden Untersuchungen für die folgenden Proteine wurden auf ihre lineare Korrelation (r^2) untersucht.:

Protein	TT	Albumin	α -1 Globulin	α 2-Globulin	β 1-Globulin	β 2-Globulin	γ -Globulin
Liquor (N=100)	0,92	0,87	0,39	0,71	0,67	0,66	0,88

(N = Zahl der Liquorproben)

4.1.6 Methodenvergleich: Proteineinzelbestimmung durch Nephelometrie versus Elektrophorese

Liquor- und Serumproben wurden sowohl nephelometrisch als auch elektrophoretisch auf den Proteingehalt des Albumins, α 1-Antitrypsins, Transferrins und Immunglobulins G untersucht.

Die Ergebnisse wurden unter Anwendung der linearen Korrelation (r^2) verglichen.

Protein	Albumin	α 1-Antitrypsin	Transferrin	Immunglobulin G
Liquor (N1=70)	0,88	0,72	0,84	0,94
Serum (N2=70)	0,8	-	-	0,92

N1 bzw. N2 = Zahl der Proben

Die nephelometrischen und elektrophoretischen Proteinwerte wurden zu der Bestimmung von Protein Quotienten genutzt. Die so elektrophoretisch und nephelometrisch bestimmten Werte für die Proteine Albumin und IgG wurden unter Anwendung der Formel:

$$\text{Albumin-Quotient} = \text{Alb (CSF)} / \text{Alb (Serum)}$$

$$\text{IgG-Quotient} = \text{IgG (CSF)} / \text{IgG (Serum)}$$

verglichen.

Die Ergebnisse wurden auf ihre lineare Korrelation (r^2) untersucht.

Protein	Nephelometrie/ Elektrophorese
Albumin (N = 70)	0,94
IgG (N = 70)	0,96

N = Zahl der Proben

4.2 Klinische Ergebnisse

4.2.1 Normalwerttabelle für die Liquorproteinelektrophorese von Kindern

Aus der Gesamtgruppe der pädiatrischen Patienten von 1800 Kindern wurden 202 retrospektiv ausgewählt. Die Liquores für die Normalwertbildung dieser Studie waren klar und farblos; nach der Konzentrierung waren die Liquores weiterhin klar, jedoch meist etwas gelblich, welches auf die erhöhte Eiweißkonzentration im Konzentrat zurückzuführen ist. Die Zellzahl war für 24 Liquores bekannt und lag unter $4/\mu\text{l}$. In der Elektrophorese zeigte keine Probe verdächtige Banden, die auf oligoklonale γ -Globuline oder Hämoglobinprodukte hinweisen könnten. Für die Analyse der Studiengruppe wurden die 202 Kinder in 9 Altersgruppen eingeteilt (Gruppe 1: 0,1-0,5 Mo; Gruppe 2: 0,6-2,4 Mo; Gruppe 3: 3-7 Mo; Gruppe 4: 8-16 Mo; Gruppe 5: 18-36 Mo; Gruppe 6: 37-59 Mo; Gruppe 7: 61-107 Mo; Gruppe 8: 108-155 Mo; Gruppe 9: 156-210 Mo). In jeder Altersgruppe waren wenigstens 11 Kinder vertreten. Geschlechtsabhängigkeit konnte zwischen den Altersgruppen nicht festgestellt werden. Die hier beschriebenen Ergebnisse wurden vorab im J. of Child Neurology 1996 mit Erlaubnis von Prof. Siemes veröffentlicht (Barnard 1996).

AG	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Monate	0,1-0,5	0,6-2,4	3 - 7	8 - 16	18 - 36	37 - 59	60 -107	108 -155	156 - 210
Jahre (ca.)					1½-3	3-5	5-9	9-13	13-17½
Untersuchte	22	12	11	12	24	22	35	37	27
GE	388-1070	234-614	149 – 296						172 - 336
mg/l	653	372	214						292
Transthy.	13 - 29		10 - 19	8 - 16					
mg/l	21		13	12					
%	2,4 – 6,4		4,6 – 8,3	4 - 7					
Albumin	261-765	157-436	92 – 204						
mg/l	431	250	144						
%	62 - 76	65 - 72	60 – 69						
α2-Fraktion	20 - 74	16 - 47	11 – 23						
mg/l	41	27	17						
%	4,7 - 8	6,2 - 9	6,2 – 9,1						
β1-Fraktion	19 - 51	15 - 33	10 – 21						
mg/l	30	26	16						
%	4,3 – 6,2	5 - 8	5,8 – 8,5						
τ-Fraktion	6 - 24	4 – 8							
mg/l	14	5							
%	1,1 – 3,3	1,7 – 3,2							
γ -Globulin	25 – 78	9 - 45	7 - 17			11 - 26			
mg/l	41	23	11			17			
%	5,8 – 8,6	3,1– 7,9	3,7 – 7,6			5,4 - 9			

Normwerttabelle vom Gesamteiweiß (GE) und den Liquorproteinfraktionen in Abhängigkeit vom Lebensalter (AG = Lebensaltersgruppe)

4.2.2 Veränderungen der Liquorproteine mit dem Lebensalter

4.2.2.1 Gesamteiweiß

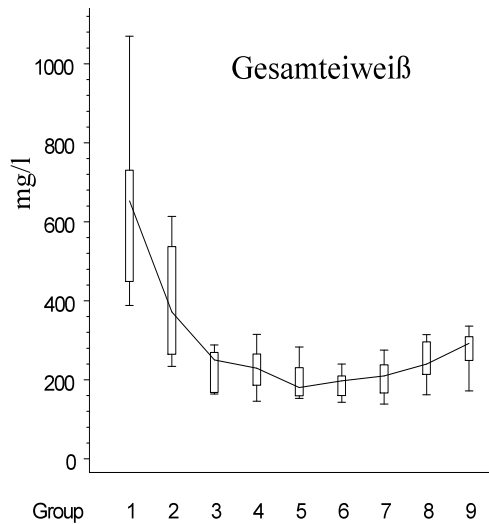


Abb.3 Normalwertverlauf Gesamteiweiß

4.2.2.2 Transthyretin

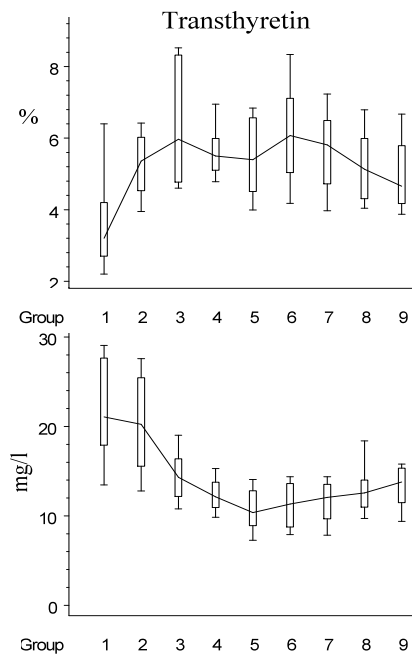


Abb. 4 Normalwerte Transthyretin

Die Abbildung 3 stellt die Veränderungen des Gesamteiweißes in Abhängigkeit vom Lebensalter dar.

Statistisch relevante Veränderung des Gesamteiweißes konnte zwischen den Altersgruppen 1, 2 und den restlichen gezeigt werden.

Verbindet man die einzelnen Alterswerte, so erhält man für den Altersverlauf des Gesamteiweißes einen U-förmigen Verlauf, mit einem Minimum in der Altersgruppe 5/6, das heißt in einem Lebensalter zwischen 1½ und 5 Jahren.

Der obere Teil der Abbildung 4 zeigt die prozentualen, der untere Teil die absoluten Veränderungen des Transthyretins abhängig vom Lebensalter. Statistisch signifikante Veränderungen der absoluten Konzentration des Proteins ($R^2 = 0,5$) konnten zwischen den Altersgruppen 1, 2, 3-4 und 5-9 festgestellt werden. Verbindet man die einzelnen Alterswerte so erhält man für den absoluten altersabhängigen Verlauf des Proteins einen U-förmigen Verlauf mit einem Minimum in der Altersgruppe 5. Im Vergleich dazu zeigt der Altersverlauf des prozentualen Proteingehaltes einen glockenförmigen Verlauf mit einem Maximum in der Altersgruppe 5/6 (1½ - 5 Jahre).

4.2.2.3 Albumin

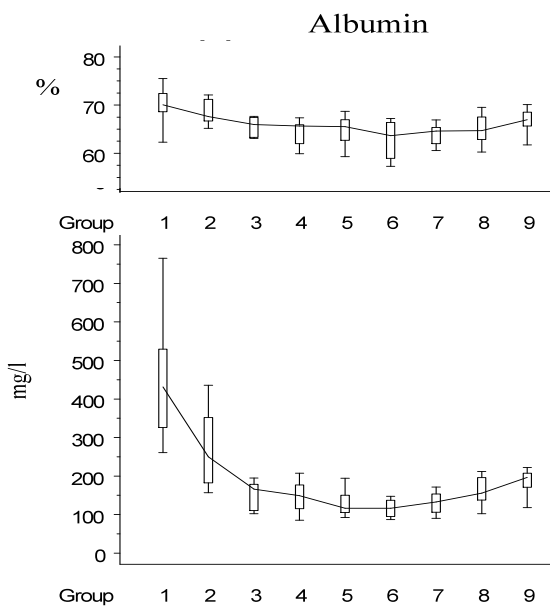


Abb.5 Normalwerte Albumin

4.2.2.4 α 2-Globuline

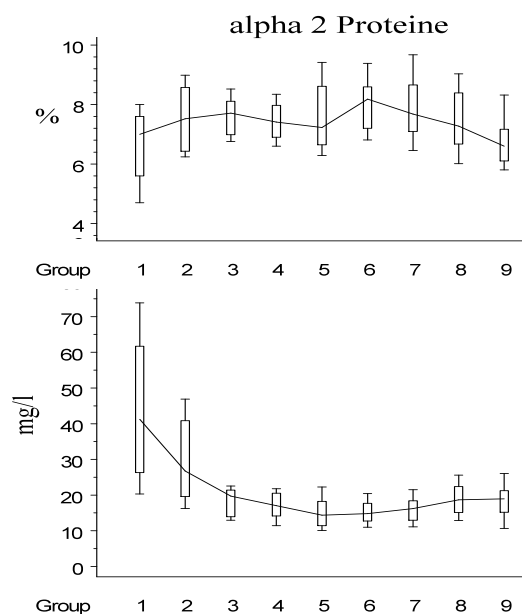


Abb.6 Normalwerte α 2-Globuline

Der obere Teil der Abbildung 5 zeigt die prozentualen, der untere Teil die absoluten Veränderungen des Albumins mit zunehmenden Lebensalter. Statistisch signifikante Unterschiede für die absolute Konzentration des Albumins konnten zwischen der Altersgruppe 1, 2 und 3-9 dargestellt werden ($R^2=0,63$). Sowohl die Veränderungen der absoluten als auch der relativen Konzentration des Albumin zeigen einen U-förmigen Verlauf mit zunehmendem Lebensalter. Von der Altersgruppe 1 fällt die Konzentration bis zur Gruppe 6 ($2\frac{1}{2}$ - 5 Jahre) auf ein Minimum ab und steigt dann langsam wieder an.

Der obere Teil der Abbildung 6 zeigt die prozentualen, der untere Teil die absoluten altersabhängigen Veränderungen der α 2-Globuline. Statistisch signifikante Unterschiede für die absolute Konzentration der α 2-Globuline konnten zwischen der Altersgruppe 1, 2 und 3-9 dargestellt werden ($R^2=0,51$). Verbindet man die einzelnen Alterswerte, so erhält man für den absoluten Verlauf der Proteine einen U-förmigen Verlauf mit einem Minimum in der Altersgruppe 5-6 ($1\frac{1}{2}$ - 5 Jahre). Im Vergleich dazu zeigt der Altersverlauf des prozentualen Proteingehaltes einen eher glockenförmigen Verlauf mit einem Maximum in der Altersgruppe 6 ($2\frac{1}{2}$ - 5 Jahre).

4.2.2.5 β 1-Globulin (Transferrin)

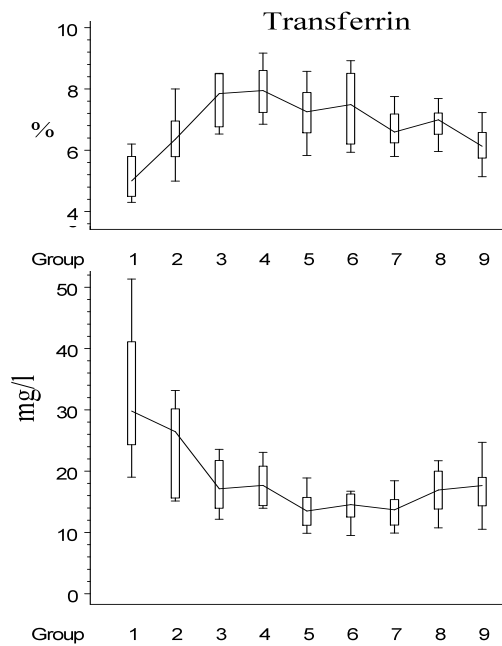


Abb.7 Normalwerte β 1-Globulin

4.2.2.6 γ -Globuline

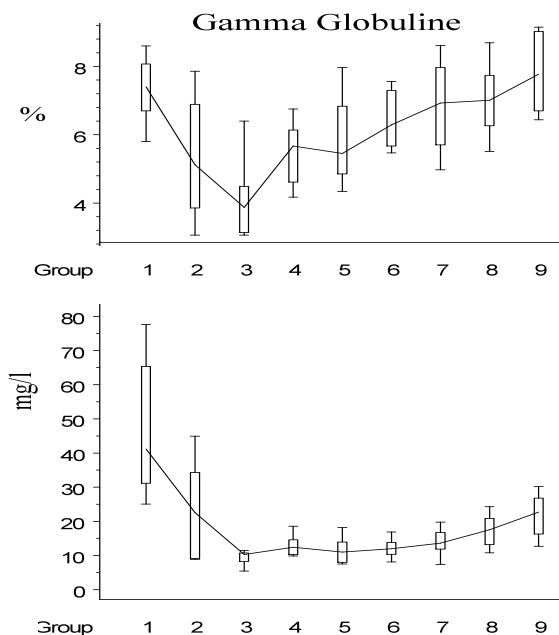


Abb. 8 Normalwerte γ -Globuline

Der obere Teil der Abbildung 7 zeigt die prozentualen, der untere Teil die absoluten Veränderungen des Transferrins abhängig vom Lebensalter. Statistisch signifikante Unterschiede für die absolute Konzentration des Transferrins konnten zwischen der Altersgruppe 1, 2 und 3-9 dargestellt werden ($R^2=0,49$). Verbindet man die einzelnen Alterswerte so erhält man für den absoluten Verlauf der Proteine einen U-förmigen Verlauf mit einem Minimum in der Altersgruppe 5 ($1\frac{1}{2}$ - $2\frac{1}{2}$ Jahre). Im Vergleich dazu zeigt der Altersverlauf des prozentualen Proteingehaltes einen eher glockenförmigen Verlauf mit einem Maximum in der Altersgruppe 4 ($\frac{1}{2}$ - $1\frac{1}{2}$ Jahre).

Der obere Teil der Abbildung 8 zeigt die prozentualen, der untere Teil die absoluten Veränderungen der γ -Globuline in Abhängigkeit vom Lebensalter. Statistisch signifikante Unterschiede für die absolute Konzentration der γ -Globuline konnten zwischen der Altersgruppe 1, 2, 3-6 und 7-9 erkannt werden ($R^2=0,58$). Sowohl die Veränderungen der absoluten als auch der relativen Konzentration des γ -Globulins zeigen einen altersabhängigen U-förmigen Verlauf. Von der Altersgruppe 1 fällt die Konzentration bis zur Gruppe 3 ($\frac{1}{4}$ - $\frac{1}{2}$ Jahr) ab und steigt dann langsam wieder an.

4.2.3 Klinische Auswertung

Exemplarisch werden anhand von fünf für die Pädiatrie relevanten Krankheitsbildern die Veränderungen der Liquorproteine durch entzündliche und nicht entzündliche Erkrankungen des ZNS sowie der Einfluss von Zytostatika und Strahlentherapie auf die BLS dargestellt. Die Auswertung der pathologischen Liquorproteinveränderungen beim Guillain-Barré-Syndrom, der akuten Leukämie sowie dem lymphoblastischen Non-Hodgkin-Lymphom, der Neuroborreliose, der Meningitis und der mentalen Retardierung mit Vergrößerung der Liquorräume erfolgt anhand der altersabhängigen Normalwerte. Jeder Probenparameter wird auf den entsprechenden Altersnormalwert bezogen und wird als Medianwert aller Patienten der jeweiligen Krankheitsgruppe angegeben. Entspricht der normierte Probenwert 1 (als 1 Linie in den Grafiken dargestellt), so bedeutet dieses, der Probenwert und der Normalwert sind identisch, es besteht keine pathologische Veränderung. Ist der normierte Wert größer als 1, zeigt dieser einen multiplen über die Norm erhöhten Probenwert des jeweils auf der x-Achse dargestellten Proteins/ der Proteingruppe auf der y-Achse an (bis 10-fach erhöht), ist der normierte Wert kleiner als 1, zeigt dieser einen gegenüber der Norm multiplen erniedrigten Probenwert auf der y-Achse an (bis 0,1-fach erniedrigt). Beide Werteabweichungen sind pathologisch.

Die Ergebnisse sind in den jeweiligen Krankheitsgruppen zusammengefasst und werden als Boxplots mit dem Median in der Mitte der Box, mit der 25er und 75er Perzentile als unteres und oberes Ende der Box und die 10er und 90er Perzentile als unteres bzw. oberes Ende der Linien für einzelne Proteine bzw. Proteingruppen dargestellt.

4.2.3.1 Guillain-Barré-Syndrom




Aus dem Gesamtpatientenkollektiv der Studie wurden 17 Patienten im Lebensalter von 1-16 Jahren im Verlauf eines Guillain-Barré-Syndroms analysiert. Von 13 Patienten wurden 2 und von 4 Patienten 3 Liquorproben untersucht.

Altersgruppe (Monate)	5 (18 -36)	6 (37 - 59)	7 (61 - 107)	8 (108 - 155)	9 (156 - 210)
Patientenzahl	5	6	3	1	2

Alle Proben wurden auf Veränderungen des Gesamteiweißes, sowie auf absolute und relative Veränderungen der Proteine Transthyretin, Albumin, α 2-Proteine, β 1-Proteine, τ -Fraktion und γ -Globulin (IgG), bezogen auf die Altersnormalwerte, untersucht.

Die Liquorproben wurden im Zeitverlauf analysiert, wobei der höchste Gesamteiweißwert einer Probe der Woche 0 der Liquorproteinveränderung gleichgesetzt wurde. In der Grafik sind diese Werte als Basiswerte in einer Gruppe zusammengefasst (N=17). Proben, die davor abgenommen wurden erhielten eine negative Wochenangabe (0,5 - 3 Wochen vorher, Median 1 Woche) und sind in der Grafik als Prä - Werte dargestellt (N=7). Proben die danach abgenommen wurden erhielten eine positive Wochenangabe (2 - 22 Wochen danach - Median 6 Wochen) und sind in der Grafik als Post - Gruppe zusammengefasst (N=13).

Alle Proben wurden auf Veränderungen des Gesamteiweißes, sowie absolute und relative Veränderungen der Proteine Transthyretin, Albumin, α 2-Globuline, β 1-Globuline (Transferrin), τ -Fraktion und den γ -Globulinen (IgG) in der Agarosegelelektrophorese, untersucht.

In der Grafik sind diese Veränderungen im Zeitverlauf (Prä  Basis  Post ) der Erkrankung dargestellt.

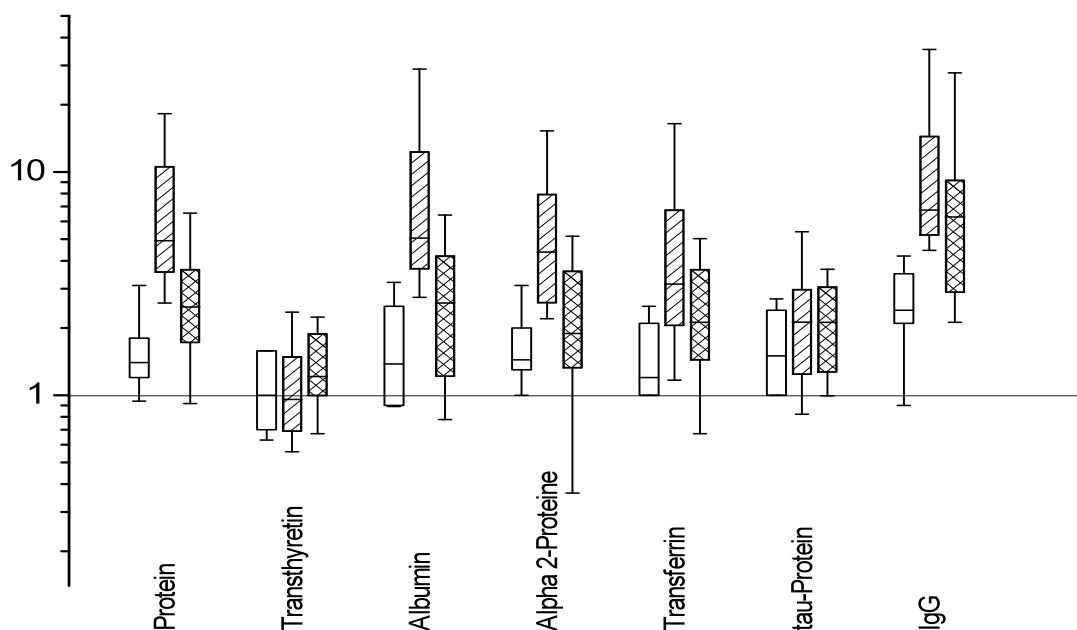





Abb.9 Guillain-Barré-Syndrom: Absolutwerte Prä  Basis  Post  bezogen auf altersabhängige Normalwerte

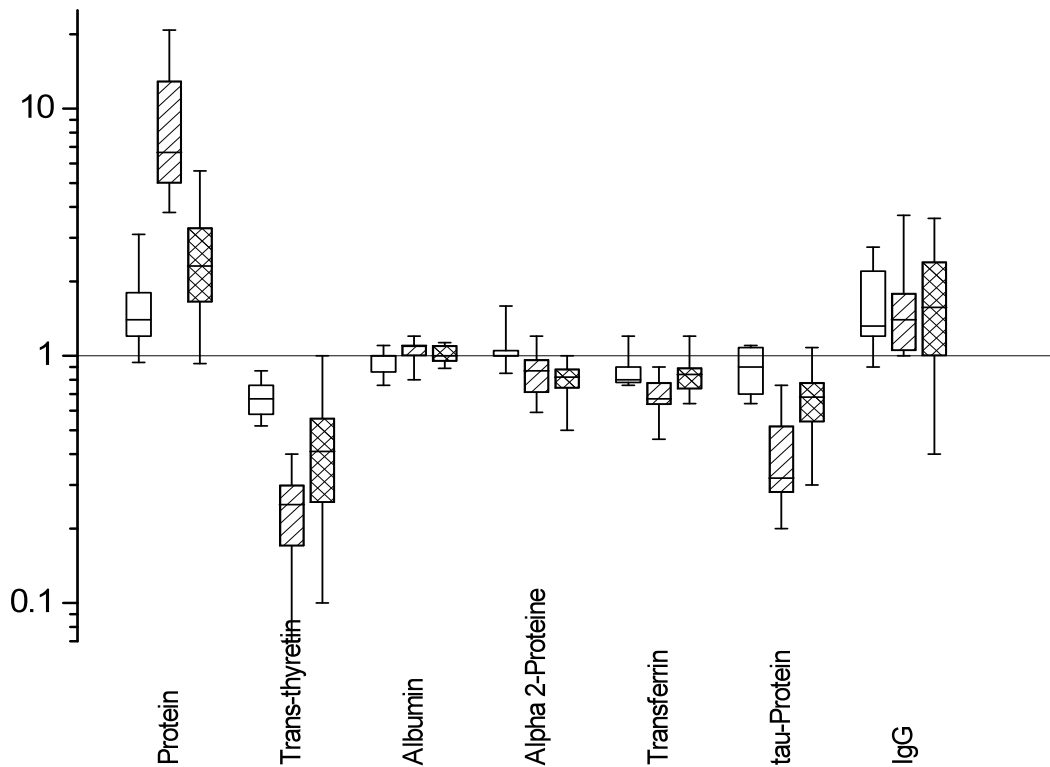





Abb.10 Guillain-Barré-Syndrom: Relativwerte Prä  Basis  Post  bezogen auf altersabhängige Normalwerte

Die Grafik der Absolutwerte zeigt, dass es bereits in der Prä-Phase zu leichten Abweichungen der Liquorproteine von der Norm kommt. Die stärkste Abweichung von den normierten Werte zeigt die IgG-Fraktion durch eine Erhöhung von 2,4-fache über der Norm, wobei alle anderen Parameter bis auf das Transthyretin ebenfalls leicht erhöht sind (1-1,5-fache der Norm). Im Vergleich dazu zeigt die Grafik der Relativwerte in der Prä-Phase die Transthyretin Fraktion (0,7-fache der Norm) die stärkste Abweichung vom Normalwert, sie ist erniedrigt. Alle anderen Parameter liegen fast im Normbereich (1 - 0,8 -fache der Norm) bis auf das IgG-Fraktion (1,3-fache der Norm), die eine leichte Erhöhung zeigt.

In der Basis-Phase sind die Abweichungen von Gesamteiweiß und der Proteinfractionen von der Norm wesentlich deutlicher ausgeprägt als in der Prä-Phase. Das Gesamteiweiß und die Absolutwerte des Albumins, der α 2-Proteine und des Immunglobulins G sind gegenüber der Norm stark erhöht (6,7-8,8 - fache über der Norm), die Erhöhung der IgG-Fraktion (8,8-fache über der Norm) ist am stärksten. Transferrin und die τ -Fraktion sind mäßig erhöht, das Transthyretin liegt im Normbereich.

Die Veränderungen der Relativwerte in der Basisphase zeigen ein Spiegelbildmuster zu den Absolutwerten. Transthyretin bildet eine Ausnahme und ist stark erniedrigt (0,25-fache unter der Norm). Die τ -Fraktion und Transferrin sind ebenfalls gegenüber der Norm erniedrigt. Albumin und die α 2-Proteine zeigen kaum eine Abweichung. Lediglich die IgG-Fraktion zeigt eine geringe Erhöhung seines Relativwertes gegenüber der Norm (1,4-fache über der Norm).

In der Post-Phase kommt es zu einer langsamen Normalisierung der Proteinwerte. Das Gesamteiweiß und die Absolutwerte des Albumins, der α 2-Proteine, des Transferrins und der τ -Fraktion zeigen nur noch leicht erhöhte Werte gegenüber der Norm. Einzig das IgG zeigt ein stark erhöhten normierten Wert (4,4-fache über der Norm). Die Relativwerte streben ebenfalls wieder Normalwerten zu. Transthyretin und die τ -Fraktion sind weiterhin niedriger als die Normalwerte (0,4 - 0,7-fache über der Norm) und IgG zeigt gegenüber der Norm erhöhte Werte (1,6-fache über der Norm).

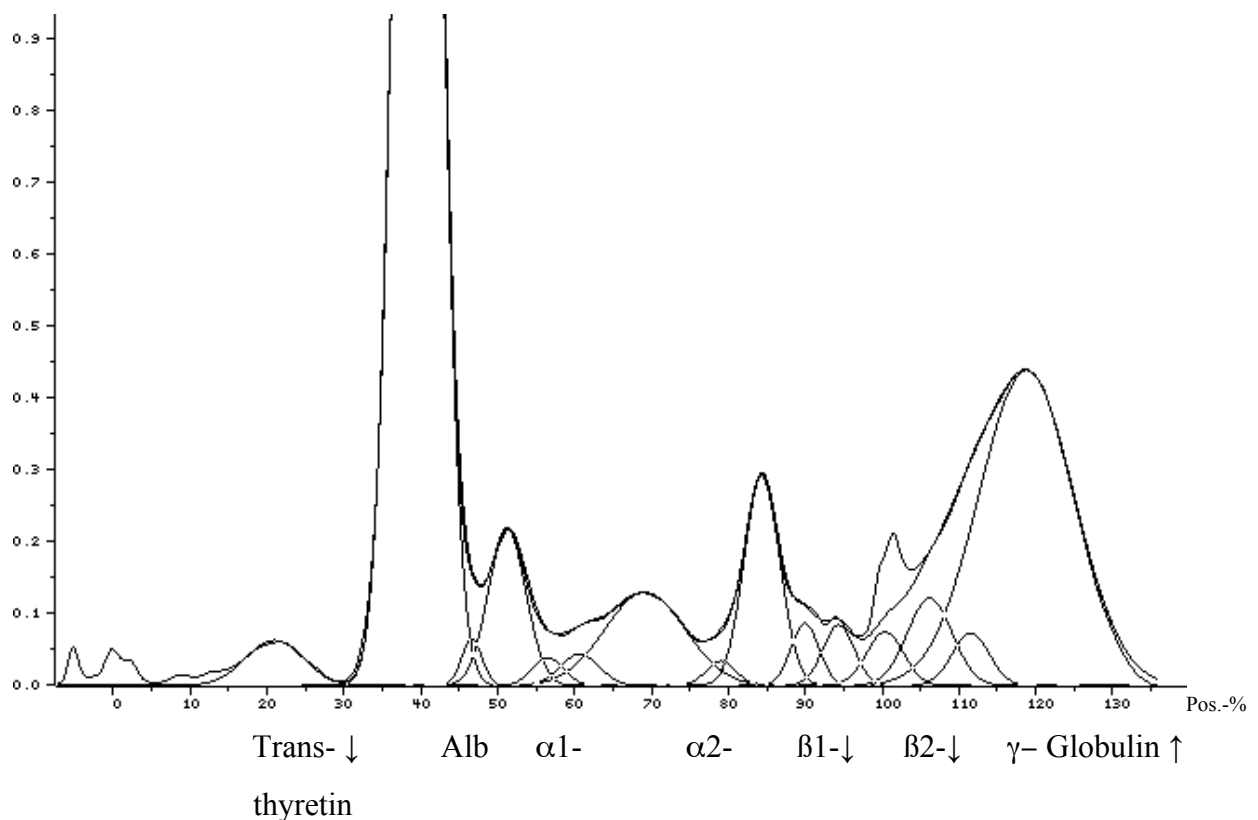


Abb. 11: Beispiel einer Liquorelektrophorese eines Kindes mit Guillain-Barré-Syndrom mit typischen prozentualen Veränderungen in der Basis-Phase .

4.2.3.2 Akute Leukämie und lymphoblastisches Non-Hodgkin-Lymphom

In einem Zeitraum von 2 Jahren (1994 – 1996) wurden 207 Serien - Liquorproben von 42 Kindern in einem Alter von 9 Monaten bis zu 17 Jahren, die an einer akuten Leukämie (26 ALL, 2 AML, 6 lymphoblastisches NHL, 8 ALL-Rezidive) erkrankt waren, untersucht. Keines der Kinder hatte eine klinische vermutete oder erkennbare ZNS-Beteiligung durch die Erkrankung. Die Kinder wurden im Universitätsklinikum Rudolf Virchow, Klinikum der Freien Universität Berlin (ab 1995 der Humboldt Universität, heute Charité - Universitätsmedizin Berlin) entsprechend den ALL-BFM Protokollen 90 und 95 sowie den Protokollen NHL-BFM-90, ALL Rez-BFM 90 und AML-BFM 93 behandelt.

Altersgruppe (Monate)	4 (8-16)	5 (17-36)	6 (37-59)	7 (60-107)	8 (108-155)	9 (156-210)
Patienten	3	7	7	11	10	4

Die Therapie des lymphoblastischen NHL folgt der Therapiestrategie der ALL, die ALL-REZ Therapie ähnelt je nach Art des Rezidivs der ALL-Intensiv-Blocktherapie. Alle Proben der Kinder mit einer ALL, einer AML und einem lymphoblastischen NHL wurden nach Art der Therapie in den folgenden unten dargestellten Gruppen grob zusammengefasst.

Die Liquorproben wurden zum Zeitpunkt der Diagnosestellung („Pre“) und bei den therapeutischen Lumbalpunktionen gewonnen, die zur sogenannten ZNS-Prophylaxe während der folgenden Therapieblöcke/ -schritte durchgeführt wurden:

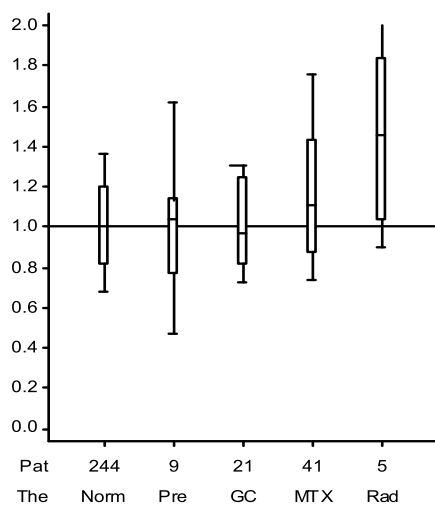
- GC: Induktionstherapie (Vorphase) systemische Glucocorticosteroid (Prednison)-Therapie, Vincristin, Anthracyclin und Daunorubicin mit ZNS-Prophylaxe (intrathekale Methotrexat (MTX)-Gabe). Asparaginase wurde erst nach Abnahme der GC-Probe gegeben. GC entspricht beispielsweise im ALL-BFM-Protokoll dem Block I/1.
- I/2: Erste Re-Intensivierung (Chemotherapie mit Cyclophosphamid, Cytarabin, 6 – Mercaptopurin und mit intrathekaler MTX-Gabe). Während dieses Blocks wurden keine Glucocorticosteroide gegeben.
- MTX: Konsolidierungstherapie mit hochdosierter systemischer und zusätzlich intrathekaler MTX-Gabe sowie 6 -Mercaptopurin

II: Re-Induktionstherapie (Polychemotherapie mit Glucocorticosteroid, Vincristin, Doxycyclin, Asparaginase, Cyclophosphamid, Cytarabin, 6-Thioguanin und intrathekale MTX-Gabe je nach Indikation / Befund mit oder ohne zusätzliche intrathekale Cytarabin- und Glucocorticosteroid-Gabe)

Rad: ZNS-Strahlentherapie je nach Riskogruppenzuordnung des Patienten

In keiner Liquorprobe wurde eine pathologisch erhöhte Zellzahl gefunden. Alle Liquorproben wurden auf ihren Gesamteiweißgehalt hin mit der Nephelometrie und die prozentuale Proteinverteilung hin mittels der Elektrophorese untersucht. Jede Probe wurde mit den altersabhängigen Normalwerten (Norm) und - falls vorhanden - mit der vor Einsetzen der Therapie gewonnenen Liquorprobe (Pre) verglichen. Entsprechend dem Proteingehalt der aktuellen Probe dem der Ausgangsprobe vor Therapiebeginn bzw. dem altersabhängigen Normalwert, so ergab das normalisierte Ergebnis den Wert 1.

Systematische Veränderungen der Konzentration des Gesamteiweißes sowie der prozentualen Verteilung des Transthyretins, Albumins und γ -Globulins wurden während der Leukämitherapie beobachtet. Keine bzw. geringe Abweichungen von den Normalwerten konnten sowohl für die α 1- und 2-Proteine als auch für die Transferrin- und τ -Fraktion festgestellt werden. Betrachtet wurden ausschließlich die relativen Anteile der Proteine am Gesamteiweiß und nicht die absoluten Proteinveränderungen dieser Proteine.



Das Gesamteiweiß im Liquor wie in Abbildung 12 dargestellt stieg im Vergleich zur Altersnorm bei den untersuchten Patienten während der Strahlentherapie (auf das 1,5-fache der Norm) an. Das Gesamteiweiß vor Therapiebeginn war geringfügig statistisch nicht signifikant gegenüber der Norm erhöht und fiel wiederum geringfügig während der Induktionstherapie (GC) ab. Danach stieg das Gesamteiweiß während der Konsolidierungstherapie (MTX) wieder an und zeigte seine deutlichste Veränderung während der Strahlentherapie.

Abb.12: Gesamteiweiß bezogen auf altersbezogene Normalwerte

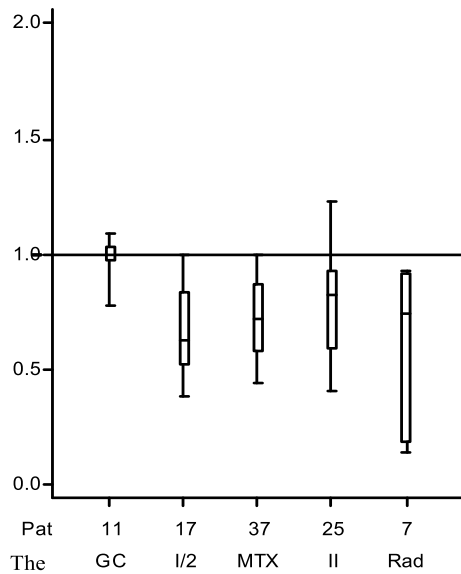


Abb. 13: Transthyretin (%) bezogen auf den Wert bei Diagnosestellung (Pre)

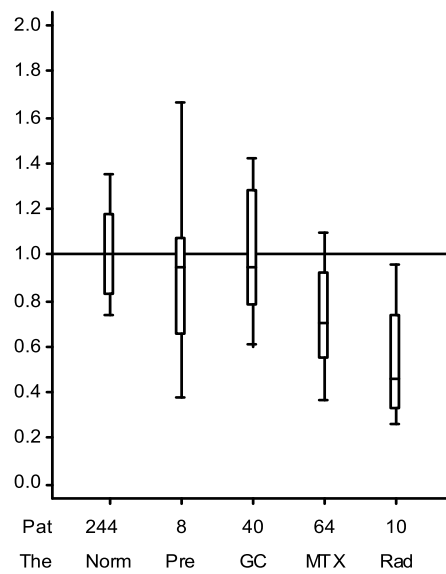


Abb. 14: Transthyretin (%) bezogen auf altersbezogene Normalwerte

Der prozentuale Anteil der Transthyretin-Fraktion sank unter den normierten Prätherapiewert (Abb. 13) während der Therapieschritte Re-Intensivierung- (I/2), Konsolidierung- (MTX), Re-Induktion- (II) und Strahlentherapie (Rad) auf das 0,6 – 0,8-fache des Normalwertes ab. Lediglich während Induktionstherapie bei systemischer Glucocorticosteroid-Gabe (GC) zeigte sich keine Veränderung zum Prätherapiewert. Im Vergleich zu den Altersnormalwerten war der prozentuale Transthyretinwert (Abb. 14) während des Therapieschrittes MTX (0,7-faches der Norm) und der Strahlentherapie (0,5-faches der Norm) erniedrigt. Der Anteil des Transthyretins lag zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und während der Induktionstherapie (GC) geringfügig unter der Norm.

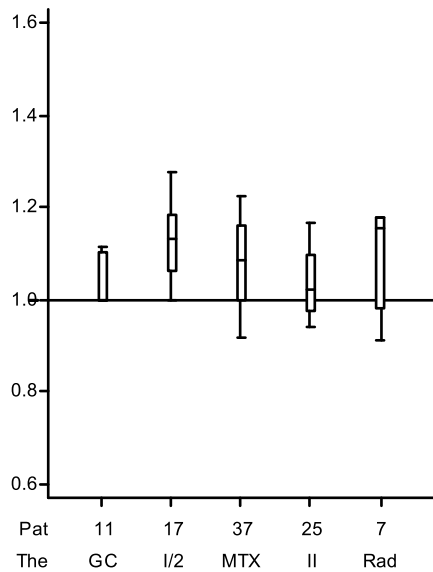


Abb.15: Albumin (%) bezogen auf den Wert bei Diagnosestellung (Pre)

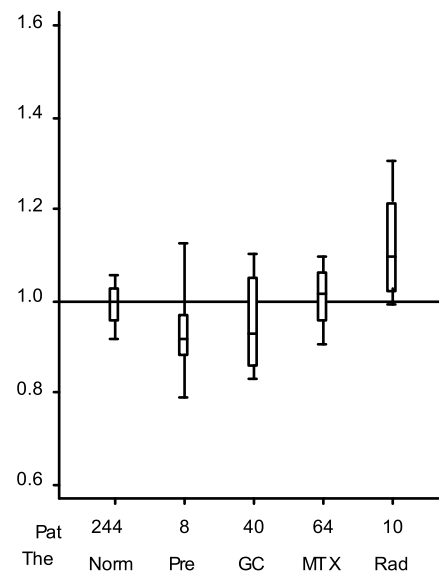
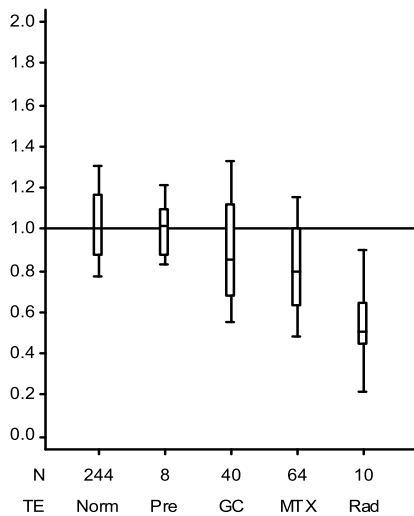


Abb.16: Albumin (%) bezogen auf altersbezogene Normalwerte

Der prozentuale Albuminanteil stieg im Vergleich zu den Prätherapiewerten (Abb.15) während der Therapieschritte Re-Intensivierungs- (I/2), Konsolidierungs- (MTX) und Strahlentherapie (Rad) auf 1,1-fache des Normalwertes an. Fast keinen Unterschied zu den Prätherapiewerten waren bei der Induktions- (GC) und der Re-Induktionstherapie (II) zu beobachten. Im Vergleich zu den Altersnormalwerten (Abb. 16) zeigte sich eine Erniedrigung der prozentualen Albuminfraktion vor Therapiebeginn und unter der systemischen Glucocorticosteroid-Therapie (GC). Ein sehr leichtes Ansteigen des relativen Albumins war während des MTX Schrittes festzustellen und ein deutlicherer Anstieg gegenüber der Norm während der Strahlentherapie (ca. 1,1-fach).



Der prozentuale γ -Globulin Anteil sank im Vergleich zu den Altersnormalwerten (Abb. 17) unter der Glucocorticosteroid Therapie auf 0,8-fache des Altersnormalwertes ab und zeigte einen Tiefstwert während der Strahlentherapie mit 0,5-fache des Altersnormalwertes.

Der Abfall der γ -Globuline im Vergleich zu den Prätherapiewert bei der ersten Re-Intensivierungstherapie und danach ist nicht in einer Abbildung dargestellt.

Abb. 17: Gammaglobuline (%) bezogen auf altersbezogene Normalwerte

4.2.3.3 Neuroborreliose

Aus dem Gesamtpatientenkollektiv der Studie wurden 9 Patienten im Alter von 6 - 14 Jahren mit einer gesicherten Neuroborreliose untersucht.

Altersgruppe	7 (61 - 107 Monate)	8 (108 -155 Monate)	9 (156 - 210 Monate)
Patientenzahl	2	5	2

Alle Proben wurden auf Veränderungen des Gesamteiweißes sowie auf absolute und relative Veränderungen der Proteine Transthyretin, Albumin, α 2-Proteine, β 1-Proteine, τ -Fraktion und γ -Globulin (IgG), bezogen auf die Altersnormalwerte, untersucht.

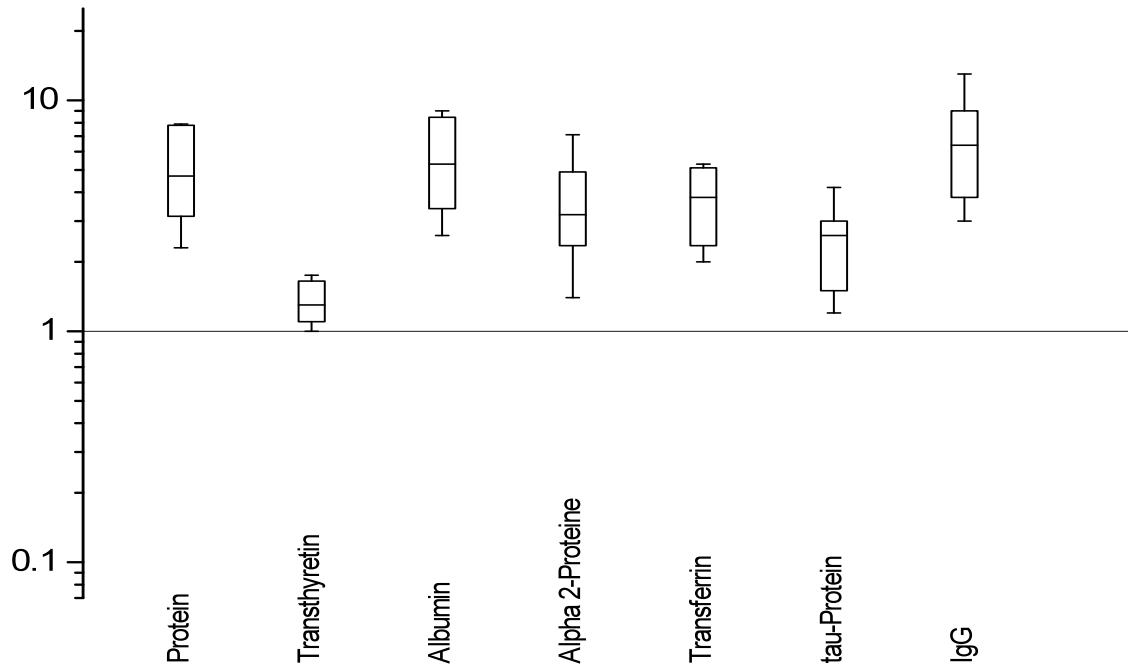


Abb. 18: Neuroborreliose: Absolutwerte bezogen auf altersbezogene Normalwerte

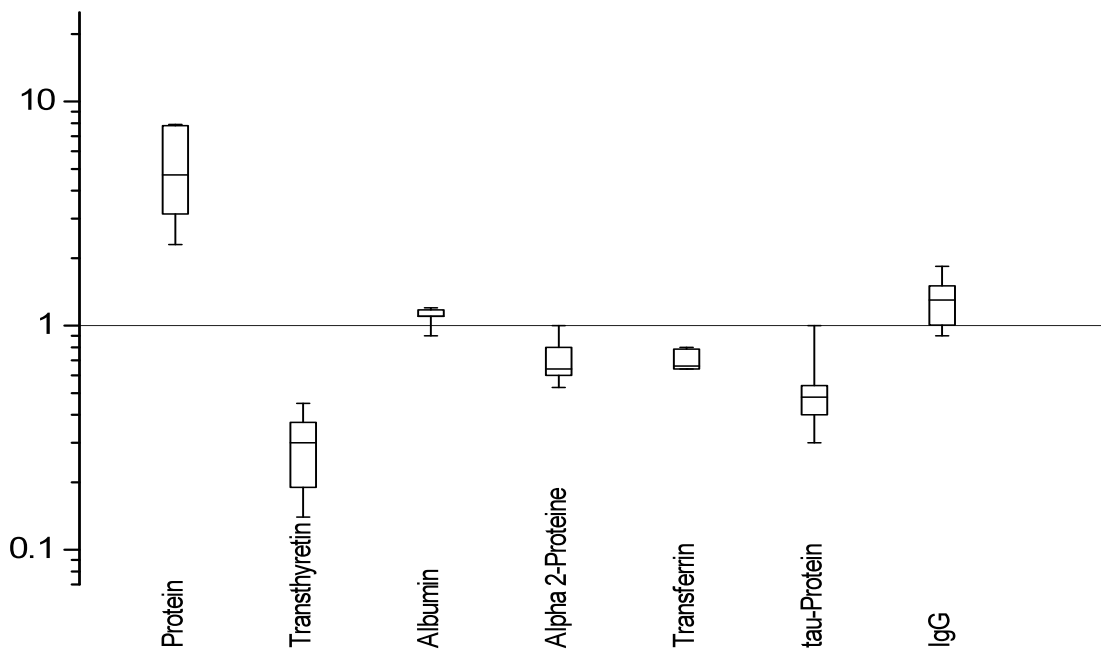


Abb. 19: Neuroborreliose: Relativwerte bezogen auf altersbezogene Normalwerte

Die Grafik der Absolutwerte zeigt eine starke Erhöhung des Gesamteiweißes (4,7-fache über der Norm), des Immunglobulins G (6,4-fache über der Norm) und des Albumins (5,3-fache der über Norm). Die $\alpha 2$ -Proteine und Transferrin sind mit 3,2-3,7-fache der Norm erhöht, gefolgt von

der- τ Fraktion (1,8-fache über der Norm). Transthyretin zeigt einen leichten Anstieg gegenüber dem Normwert (1,3-fache über der Norm).

Im Gegensatz dazu zeigt die Grafik der Relativwerte starke Erniedrigungen gegenüber der Norm für die Proteine Transthyretin (0,3-fache unter der Norm) und der τ -Fraktion (0,5-fache der Norm). Die α 2- Proteine und Transferrin sind leicht erniedrigt (0,6-0,7-fache unter der Norm), wohingegen das Albumin im Normbereich liegt. Lediglich die IgG-Fraktion ist mit 1,3-fache über der Norm leicht erhöht.

4.2.3.4 Bakterielle Meningitis

Aus dem Gesamtpatientenkollektiv der Studie wurden 9 Patienten in einem Lebensalter von 1 Monat - 15 Jahren mit einer gesicherten bakteriellen Meningitis untersucht.

Altersgruppe (Monate)	2 (0,6 - 2,4)	3 (3 - 7)	5 (18 - 36)	8 (108-155)	9 (156 -210)
Patientenzahl	2	1	1	2	3

Alle Proben wurden auf Veränderungen des Gesamteiweißes sowie der absoluten und relativen Veränderungen der Proteine Transthyretin, Albumin, α 2-Proteine, β 1-Proteine, τ -Fraktion und γ -Globulin (IgG) untersucht.

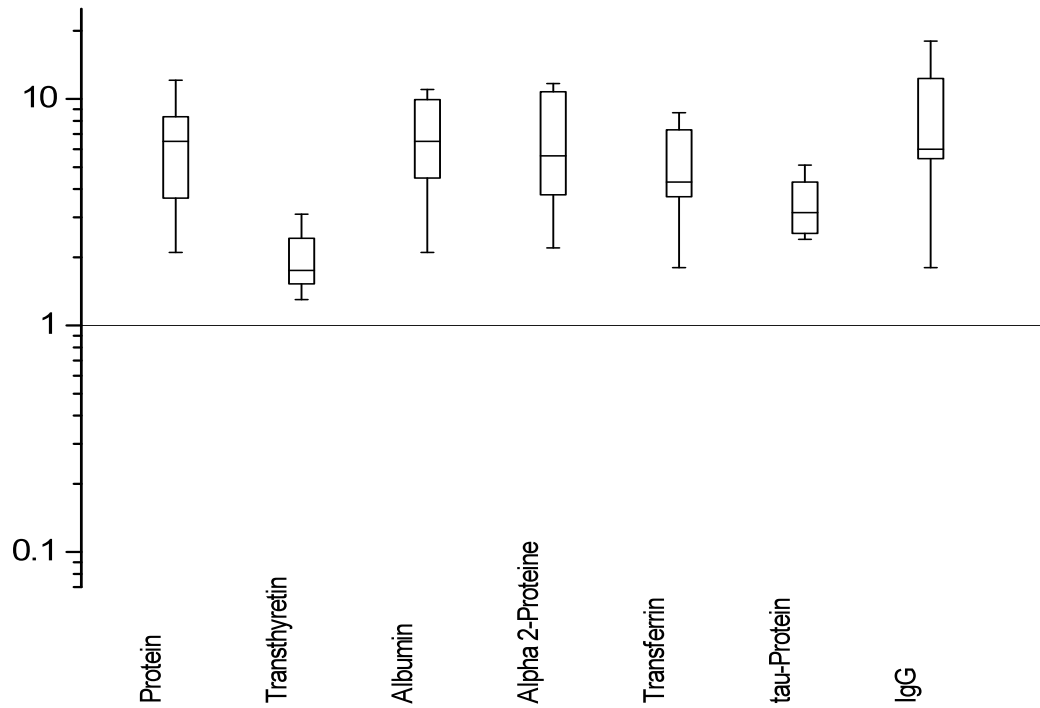


Abb. 20: bakterielle Meningitis: Absolutwerte bezogen auf altersbezogene Normalwerte

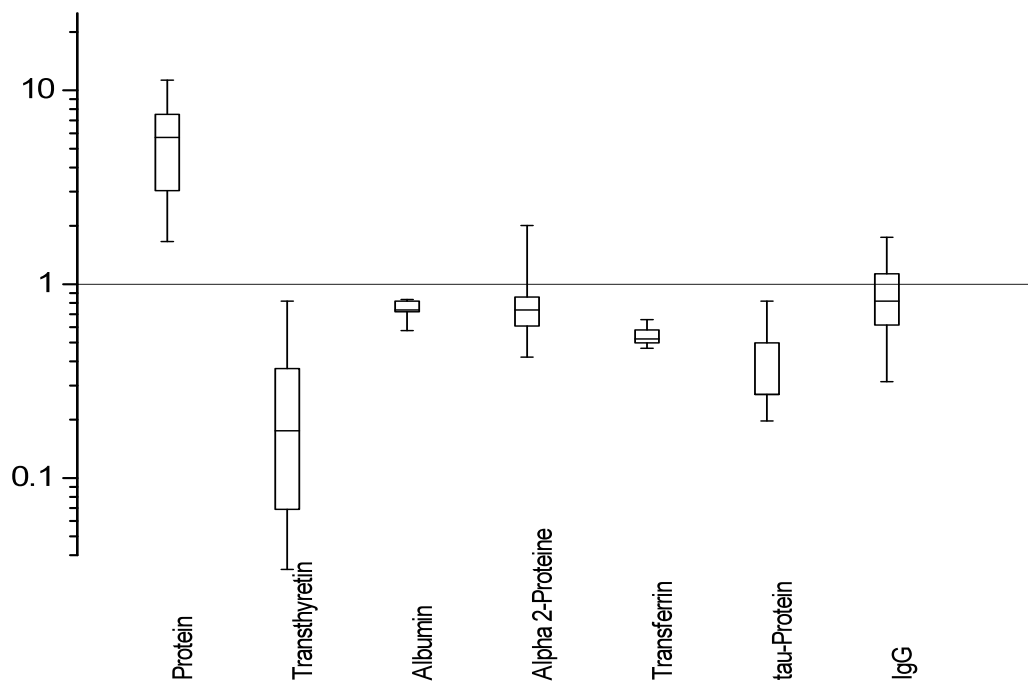


Abb. 21: bakterielle Meningitis: Relativwerte bezogen auf altersbezogene Normalwerte

Die Grafik der Absolutwerte zeigt eine starke Erhöhung aller Proteine und des Gesamteiweißes (4,3-6,5-fache oberhalb der Norm) mit der Ausnahme der Transthyretin Fraktion (1,75-fache über der Norm) und der τ -Fraktion (3,1-fache über der Norm).

Im Gegensatz dazu zeigt die Grafik der Relativwerte starke Erniedrigungen gegenüber der Norm für die Proteine Transthyretin (0,3-fache unter der Norm) und der τ -Fraktion (0,4-fache unter der Norm), Transferrin ist leicht erniedrigt (0,7-fache unter der Norm), wohingegen Albumin, IgG und α 2-Proteine im Normbereich liegen.

4.2.3.5 Globale Retardierung in Verbindung mit erweiterten Liquorräumen

Aus dem Gesamtpatientenkollektiv der Studie wurden 24 Patienten in einem Alter von 4 Monaten - 7 Jahren mit mentaler Retardierung und radiologisch diagnostizierter Vergrößerung der Liquorräume untersucht. Die Altersverteilung zeigt die folgende Tabelle:

Altersgruppe (Monate)	3 (3 - 7)	4 (8 - 16)	5 (18 - 36)	6 (37 - 59)	7 (61 - 107)
Patientenzahl	8	6	5	2	3

Alle Proben wurden auf Veränderungen des Gesamteiweißes sowie der absoluten und relativen Veränderungen der Proteine Transthyretin, Albumin, α 2-Proteine, β 1-Proteine, τ -Fraktion und γ -Globulin (IgG) untersucht.

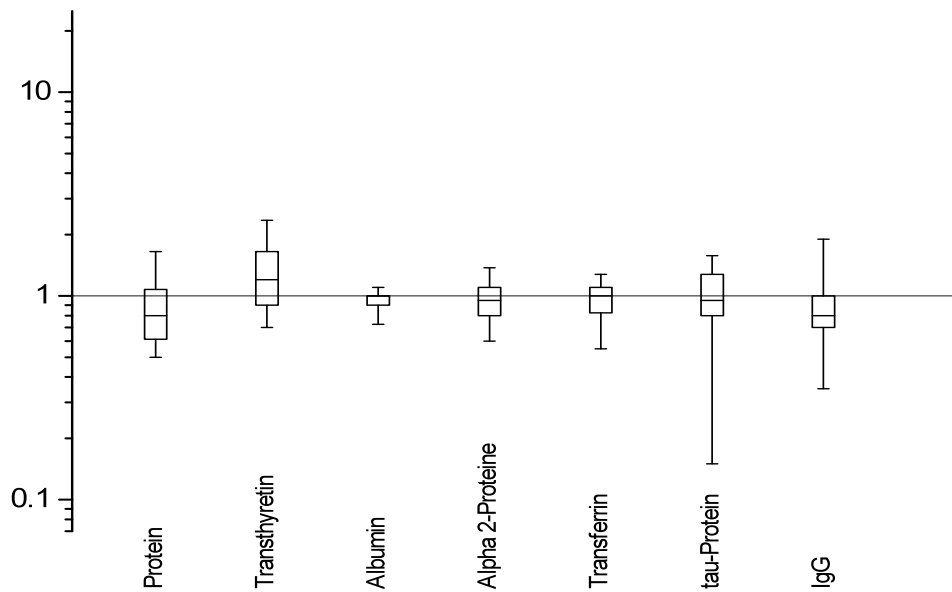


Abb. 22: Retardierung mit Vergrößerung der Liquorräume: Absolutwerte bezogen auf altersbezogene Normalwerte

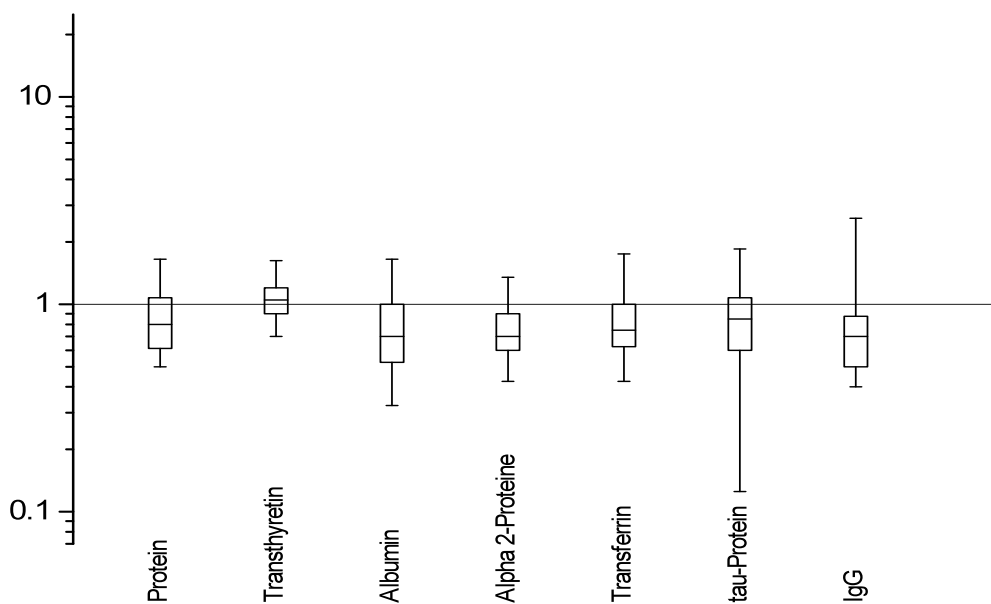


Abb. 23: Retardierung mit Vergrößerung der Liquorräume: Relativwerte bezogen auf altersbezogene Normalwerte

Die Grafik der Absolutwerte zeigt, dass alle Proteinparameter leicht erniedrigt sind (0,7 - 0,9-fache unter der Norm). Ausnahme bildet das Transthyretin, das exakt mit der Norm übereinstimmt. Die Betrachtung der Grafik der Relativwerte zeigt, dass die Proteine Albumin, α 2-

Proteine, Transferrin und τ -Fraktion der Norm entsprechen. Gesamteiweiß und IgG liegen mit 0,8-fache der Norm etwas darunter, wohingegen Transthyretin etwas gegenüber der Norm leicht erhöht ist (1,2-fache der Norm).

4.2.3.6 Tabellarische Übersicht über alle gefundenen Veränderungen

Eine Übersicht über alle bei den untersuchten Krankheitsbildern gefundenen prozentualen und absoluten Proteinveränderungen in der Liquorelektrophorese, bezogen auf die Altersnormalwerte, zeigt die folgende Tabelle, Einzelheiten siehe bei den einzelnen Krankheitsbildern.

Protein	GBS			lymphoblastisches NHL/ akute Leukämie					Neuro- borreliose	Menin- gitis	Retar- dierung
	Prä	Basis	Post	GC	MTX	I/2	II	Rad			
Gesamteiweiß	+	+++	++	0	+	+	(+)	++	++	++++	(-)
Transthyretin %	-	---	--	0	-	--	(-)	---	--	---	(+)
Transthyretin absolut	0	0	0						(+)	+	0
Albumin %	0	0	0	(-)	+	++	(+)	++	(+)	(-)	(-)
Albumin absolut	(+)	+++	++						++	+++	-
α 2 Globulin %	0	(-)	(-)						-	(-)	0
α 2 Globulin absolut	+	++	+						++	+++	-
β 1 Protein %	(-)	-	(-)						-	-	-
β 1 Protein absolut	(+)	++	+						++	++	0
β 2 Protein %	(-)	--	-						--	--	(0)
β 2 Protein absolut	(+)	+	+						+	+	(0)
γ Globulin %	+	+	+	-	--	-	-	---	+	(-)	-
γ Globulin abs.	+	+++	++						++	++	(-)

5 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war die Optimierung der Untersuchung von Proteinen in der Cerebrospinalflüssigkeit mittels der Liquoragarosegelelektrophorese, der Vergleich dieser mit etablierten Liquoranalytikmethoden und die klinische Anwendbarkeit der hier optimierten Analysetechnik in der Pädiatrie, besonders als Ergänzung zu der heutzutage eingesetzten Basisdiagnostik der Liquorproteine.

Die zur Verfügung stehende Liquormenge ist besonders in der Pädiatrie limitiert.

Untersuchungen müssen daher mit möglichst wenig Liquor auskommen und eine große Aussagekraft haben. Für die hier vorgestellte Methode wird weniger als 1 ml Liquor benötigt.

5.1 Methodische Ergebnisse

Die Gesamteiweißbestimmung im Liquor ist eine schwierige Untersuchung. Die Eiweißkonzentration ist niedrig und die Probenvolumina, die zur Verfügung stehen, sind klein. Viele Autoren haben verschiedene Methoden der Gesamteiweißmessung und ihre Vergleichbarkeit zwischen einzelnen Laboratorien untersucht. Die Ergebnisse der einzelnen Methoden variieren stark (Gerbaut 1986, Luxton 1989). Für diese Arbeit wurde die nephelometrische Eiweißbestimmungsmethode benutzt, welche eine Interassay-Variation von unter 9% zeigte. Dieses Ergebnis ist mit anderen Fällungs- und Farbmethode zur Gesamteiweißmessung im Liquor vergleichbar (Cotton 1997, Lott 1989). Die Berechnung der Absolutwerte für einzelne Proteine bzw. Proteinfractionen aus der Elektrophorese basiert auf dem gemessenen Gesamteiweißwerten multipliziert mit dem proportionalen Anteil dieser an der Gesamtelektrophorese. Eine möglichst zuverlässige und genaue Methode der Gesamteiweißmessung für weitere Aussagen über den Absolutgehalt von einzelnen Proteinen/ Proteinfractionen ist daher besonders wichtig.

Die Einzelbestimmungen der Proteine Albumin, α 1-Antitrypsin und Immunglobulin G wurden ebenfalls nephelometrisch durchgeführt. Die Variationskoeffizienten zeigten mit 3 - 7,7% eine gute Präzision der Methode, die vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Autoren sind (Joseph 1979).

Der Gesamteiweißgehalt im Liquor ist, wenn die Elektrophorese quantitativ ausgewertet werden soll, nicht ausreichend, um diesen nativ, zur Durchführung einer Elektrophorese, aufzutragen. Es ist daher nötig, die Liquorproben vor der Elektrophorese zu konzentrieren. Eine Proteinmenge von 60 μ g pro Elektrophorese wurde als optimale Auftragungsmenge gefunden. Die opti-

mierte computergestützte Probenvorbereitung und die computergesteuerte Probenauftragung erwiesen sich als große Zeitersparnis zur Bearbeitung größerer Probenzahlen.

Das für diese Arbeit genutzte bis heute einzigartige Konzentrierungsgerät wurde von Siegert entwickelt, um eine Methode zu besitzen, welche schnell und ohne hohen Gesamtproteinverlust arbeitet sowie ungewollte Proteinverluste minimiert, die zu spezifischen Eiweißverlusten führen und somit die Ergebnisse der Liquorelektrophorese verfälschen können. Die im Zuge dieser Arbeit durchgeführten umfangreichen Untersuchungen zur Konzentrierung mit dem hier beschriebenen Ultrafiltrationssystem zeigten eine relativ gute Präzision für die Konzentratmenge und Konzentratiweißgehalt mit einem Variationskoeffizienten von 9% bzw. 9,4% für ein Verfahren, das methodisch an sich wenig präzise ist. Der Gesamtproteinverlust durch die Konzentrierung betrug 20%, welcher mit anderen Methoden, wie zum Beispiel dem Amicon Zentricon System, vergleichbar ist (Christenson 1989). Der Gesamtproteinverlust des hier vorgestellten Ultrafiltrationsgerätes könnte wahrscheinlich entscheidend reduziert werden, wenn die Geräte nicht als Mehrweg- sondern als Einweggeräte genutzt werden würden, denn die Desinfektion greift die Oberfläche des Plexiglases an und verursacht so wahrscheinlich einen höheren unselektiven Proteinverlust an der Oberfläche der Geräte.

Zur quantitativen Untersuchung der einzelnen Liquorproteine müssen spezifische Eiweißverluste durch die Konzentrierung ausgeschlossen werden. Zur Überprüfung des hier beschriebenen Ultrafiltrationsgerätes wurden die gleichen Serumproteine sowohl verdünnt direkt, als auch stark verdünnt und dann wieder konzentriert der Elektrophorese unterzogen. Anschließend wurden die Eiweißmuster der Pherogramme – Serumeiweißprofile ohne und mit Konzentrierungsschritt miteinander verglichen. Es zeigte sich ein identisches Proteinmuster für die Proteinfractionen Albumin, β - und γ -Globuline. Ausnahme bildeten die α 1- und α 2-Proteine, wobei die Veränderungen der α 2-Proteingruppe klein waren. Die Veränderungen der α 1-Proteinergebnisse hängt höchstwahrscheinlich mit der Überlappung dieses Proteins mit der Albuminbande zusammen, was in einer hohen Messungsvariabilität der α 1-Fraktion in der Elektrophorese resultiert (Keren 1986). Die γ -Globulin Fraktion (IgG), die in der Elektrophorese eine besondere Bedeutung zum Nachweis von oligoklonalen Banden im Liquor hat, zeigte vor und nach der Konzentrierung keine Veränderung der Proteinproportionen in der Elektrophorese, weder für das Standardserum noch für das Serum eines Patienten mit Gammaglobulinämie. Veränderungen der Proteinzusammensetzung des Liquors durch Konzentrierungsprozesse sind oft Resultate von Adsorptionsvorgängen an der Filtermembran des Konzentrierungsgerätes oder von Denaturierungsprozessen (Fishman 1992).

Die eigenen Resultate bedeuten, dass das einzigartige Konzentrierungsgerät in der Routine zur Liquorkonzentrierung vor der Elektrophorese eingesetzt werden kann.

Die Analyse von Liquorproteinen und anderen Proteingemischen in Körperflüssigkeiten kann schnell, sicher und quantitativ durch elektrophoretische Trenntechniken erfolgen (Kleinert 1990, Siegert 1977). Als Trägermedien der Elektrophorese werden heutzutage hauptsächlich Polyacrylamidgel, Zelluloseacetat und Agarosegel eingesetzt. Die Agarosegelelektrophorese ist anderen Elektrophoresetechniken zur Detektion und Quantifizierung von Proteinen überlegen. Die Hauptvorteile des Agarosegels sind:

1. Völlige Transparenz der Gelträger, welche eine Auswertung mittels Extinktionsmessung ermöglicht.
2. Eine Porengröße, welche die Trennung auch hochmolekularer Proteine erlaubt.
3. hohe Auflösungsstärke.
4. fehlende Toxizität.

Nachteile der Agarosegelelektrophorese sind die Sensitivität der Gele gegenüber der sich durch die Elektrophorese entwickelnden Hitze und die Elektroendosmose. Mit der hier beschriebenen Methode wurde das Problem der Überwärmung der Gelträger optimal gelöst, indem diese von Petroläther bei konstanter Temperatur umgeben werden und so die entstehende Stromwärme sofort abgeführt werden kann (Siegert 1977). Der sogenannte Nachteil der Elektroendosmose wird bei der Liquorelektrophorese als Vorteil genutzt, da durch die Wahl einer geeigneten Agarose, die γ -Globuline in Richtung der Kathode aufgetrennt werden können. Dies ist besonders zur Identifikation von oligoklonalen Banden im Liquor wichtig.

Vorraussetzung für die Quantifizierung von elektrophoretisch getrennten Proteinen ist erstens, dass die Färbung aller zu analysierenden Proteine linear erfolgt. Aus diesem Grund wurde zur Färbung der Gelträger für diese Arbeit der Farbstoff Amidoschwarz eingesetzt, der Proteine in einem großen Konzentrationsbereich linear anfärbt. Andere Farbstoffe wie Silbernitrat oder Coomassie blue sind zwar sensitiver, färben jedoch Proteine nur in einem sehr kleinen Konzentrationsbereich linear an. Coomassie blue zeigt außerdem eine höhere Affinität zu dem Albumin als zu anderen Proteinen, färbt also Proteine unproportional an, was eine quantitative Auswertung schwer macht (Keren 1986, Siegert 1977). Unter Anwendung des Amidoschwarzfarbstoffes konnte eine lineare Anfärbung (lineare Korrelation $r^2 > 0,991$) der Serumproteinfraktionen Albumin, α 1-Proteine, α 2-Proteine, β - und γ -Proteine in der Agarosegelelektrophorese in einem Konzentrationsbereiche von 8 - 72 μ g Protein erreicht werden. Die sichere Quantifizierung von elektrophoretisch getrennten Proteinen hängt zweitens davon ab, dass alle Einzelschritte der Elektrophorese und die anschließende Auswertung mit einer hohen Reproduzierbarkeit durchge-

führt werden. Aus diesem Grund wurde in dem hier optimierten Analysesystem, auch die Probenauftragung und die Elektrophorese der Proteine so standardisiert, dass für jede Probenanalyse eine optimale Elektrophorese und Auswertung dieser gewährleistet wird. Hierzu tragen folgende Faktoren bei: exakte Gesamteiweißbestimmung und Konzentrierung der Proben, gleiche Schichtdicke der Agarosegelplatten, Wahl der Auftragsstelle, Probenauftragung mit konstanter Proteinmenge, Elektrophoresebedingungen und Auswertung der Pherogramme. Fehler in diesen Einzelschritten können in nicht quantitativ auswertbaren Ergebnissen resultieren. Gründe hierfür sind vor allem schlechte Auftrennung der Proteinbanden und zu geringe Probenmenge zur Quantifizierung der Proteine (Kleinert 1990).

Die Kontrolle der Reproduzierbarkeit des optimierten Elektrophoresesystems zeigte durch Wiederholungsmessungen einzelner Proteinfractionen in der Elektrophorese, dass die Interassay-Variation der Analyseverfahren niedrig war ($VK = 1,3 - 7,7\%$). Die höchste Variation von Proteinfractionen zeigte die Gruppe der α 1-Proteine. Dieses ist auf Schwierigkeiten der optischen Auswertung dieser Fraktion zurückzuführen, da sie schwer von der überlappenden Albuminfraktion abzugrenzen ist (Keren 1986). Eine höhere Trennschärfe beider Proteine könnte durch die Wahl eines anderen Agarosegels mit niedrigerer Elektroendosmose erreicht werden. Dieses würde sich jedoch nachteilig auf die Auftrennung der γ -Globuline auswirken.

Die Identifizierung der Proteine in der Agarosegelelektrophorese erfolgt aufgrund ihrer Positionen auf der X-Achse des Pherogrammes. Die Positionen konnten für alle untersuchten Proteine/Proteinfractionen mit einer geringen Standardabweichung festgelegt werden. Man muss bei der Beurteilung von Proteinpositionen jedoch berücksichtigen, dass bestimmte Erkrankungen zu Veränderungen der Ladung von Eiweißen führen können (Gaillard 1993, Laurell 1972). Somit gelten die hier aufgelisteten Proteinpositionen auf der X-Achse nur für gesunde Patienten. Die pathologischen Verschiebungen sind jedoch meist gering. Ferner sind die Positionen der Proteine von dem verwendeten Agarosegel abhängig. Das bedeutet, wird eine neue Gel-Charge eingesetzt, so muss die Positionierung der Proteine überprüft werden. Ursache hierfür sind kleine Veränderungen der Elektroendosmose des Agarosegels, welche darauf zurückzuführen sind, dass Agarosegel ein aus Algen gewonnenes Naturprodukt ist (Chrambach 1985).

Die Auswertung der Agarosegelelektrophorese erfolgt immer optisch. Eine qualitative Analyse des Pherogrammes mit der Fragestellung, ist eine Bande vorhanden oder nicht, kann per Auge erfolgen, sollen jedoch Proteine durch die Elektrophorese quantifiziert werden, so muss eine optische Scan-Auswertung durchgeführt werden.

In dieser Arbeit wurde die etablierte Photometrie mittels Spektrogrammphotometer und anschließender Gaußapproximierung durch den Analogrechner (Siegert 1977) mit der hochauflösenden Densitometrie durch das speziell entwickelte Elscript 500 Hochgeschwindigkeitsdensitometer (Hirschmann-München) und anschließender Computer Gaußapproximierung (Elscript-Hirschmann München) verglichen. Eine Starke lineare Korrelation ($r^2 > 0,88$) beider Methoden zeigten sich für die Proteine Transthyretin, Albumin und γ -Globuline, eine gute Korrelation ($r^2 > 0,66$) für die α 2- Protein Gruppe, Transferrin und die τ -Fraktion und eine schlechte Korrelation ($r^2 = 0,39$) für die α -1 Protein Gruppe. Diese starke Abweichung beider Methoden in der α 1-Fraktion ist wiederum durch die oben erwähnte schlechte Abgrenzbarkeit des Albuminpeaks von der α 1-Fraktion zu erklären (Keren 1986).

Insgesamt zeigte der Methodenvergleich und insbesondere die Überprüfung des neuen Auswertesystems in Hinsicht auf die lineare Korrelation der Proteinfärbung ($r^2 > 0,991$) und die Präzision der Ergebnisse genügend genaue Resultate, um die Methode der Densitometrie mit dem Elscript 500 Gerät und der anschließenden Gaußapproximierung mit dem Elscript - Computerprogramm in die Routine der Liquorproteinanalyse zu übernehmen. Dieses Resultat wurde in einem letzten Schritt auf ihre Richtigkeit überprüft, indem Proteineinzelbestimmungen für die Proteine Albumin, α 1-Antitrypsin, Transferrin und IgG sowohl mit der Nephelometrie als auch mit der Agarosegelelektrophorese und anschließender Densitometrie durchgeführt wurden. Die lineare Korrelation zwischen beiden Methoden zeigte Werte von 0,72 - 0,94 und bestätigte somit, dass die Agarosegelelektrophorese und densitometrische Auswertung zur Quantifizierung von Liquorproteinen eingesetzt werden kann. Ebenso zeigte der Vergleich der durch immunochemische Einzelbestimmungen und Elektrophorese gewonnene Liquor-Serum-Quotient des Albumins und des Immunglobulins G zur Beurteilung der BLS-Funktion bzw. der intrathekalen Produktion von Immunglobulin G, dass beide Methoden äquivalent zur Bestimmung dieser Quotienten geeignet sind (lineare Korrelation 0,94 für Albumin-Quotient und 0,96 für IgG-Quotient). Die Quantifizierung des Immunglobulins G im Liquor durch die Liquoragarosegelelektrophorese wurde ebenfalls von Keren (1986) beschrieben, welcher jedoch ein kommerzielles Elektrophoresesystem für seine Untersuchungen benutzte.

Das hier vorgestellte Auswertesystem mittels computergestützter Gaußapproximierung ist in der Analyse von Elektrophoresephogrammen des Liquors einzigartig. Normalerweise erfolgt die Auswertung von Pherogrammen bei kommerziell erhältlichen Densitometern durch Lotfällung. Die Pherogramme werden so in Sektoren eingeteilt, die durch prozentuale Auswertung des Flächenintegrals zwischen den Loten den ungefähren Anteil der Proteingruppe an dem Gesamtintegral angibt. Durch die computergesteuerte Gaußapproximierung ist es möglich wesentlich ge-

nauer die Konzentration von einzelnen Proteinen bzw. Proteingruppen in dem Pherogramm, durch bessere Simulation der natürlichen Überlappung von Proteinen in der Elektrophorese, auswerten zu können. Es wurde gezeigt, dass einzelne Proteine im Liquor, wie das Transthyretin, das Albumin und das Immunglobulin G, quantitativ durch das hier beschriebene Elektrophoreseverfahren ausgewertet werden können.

Folgende Fragenstellungen können beantwortet werden:

Ist das hier vorgestellte optimierte Agarosegelelektrophorese-System zur quantitativen Analyse der Liquorproteine geeignet?

Ja, durch die optimierte Agarosegelelektrophorese und anschließende optische Auswertung sowie computergestützter Gaußapproximierung können einige Proteine bzw. Proteingruppen im Liquor relativ und absolut unter Einbezug des Gesamteiweißes quantifiziert werden. Neben den im allgemeinen Routinelabor im Liquor immunchemisch quantifizierten Proteinen Albumin und IgG, können zusätzlich durch die Agarosegelelektrophorese die Proteine Transthyretin, α 2-Proteine, β 1-Fraktion (Transferrin) und β 2-Fraktion (τ -Fraktion) zur quantitativen Auswertung und Diagnosefindung herangezogen. Die α 1-Proteinfraktion wird in dieser Arbeit für die diagnostische Analyse des Liquors ausgeschlossen, da durch die Überlappung dieser Fraktion mit der wesentlich größeren Albumin Fraktion, die Ergebnisse zu ungenau sind.

Könnte die Agarosegelelektrophoresemethode als Ergänzung zu immunchemischen Verfahren in dem Basisuntersuchungsprogramme der Liquorproteindiagnostik eingesetzt werden?

Die optimierte Agarosegelelektrophorese und anschließende optische Auswertung sowie computergestützter Gaußapproximierung könnte eine aussagekräftige Ergänzung zu dem zur Zeit genutzten Basisprogramm der Liquorproteindiagnostik durch die immunchemisch bestimmten Liquor-Serum-Quotienten des Albumins und des Immunglobulins G und anschließende Interpretation durch das "Reiber- Diagramm" sein. Die Quotienten könnten auch mittels Liquor- und Serumelektrophorese, wie in unserem System gezeigt, gebildet werden. Durch Berücksichtigung des gesamten Proteinprofils im Pherogramm würde man zusätzliche Informationen mittels der Proteine Transthyretin, α 2-Globuline, β -Globuline und γ -Globuline gewinnen, welche besonders die Basisdiagnostik erweitern könnte. Zur Diagnose der BLS-Störung könnte nicht nur der Liquor-Serum-Quotient des Albumins herangezogen werden, sondern zusätzlich, das für die Beurteilung der Schrankenfunktion wichtige Transthyretin, die α 2-Fraktion und die β -Fraktionen (Transferrin und Tau-Fraktion) (Gruber 1997). Alle Ergebnisse würden für pädiatrische Patien-

ten automatisch auf die hier bestimmten Altersnormalwerte bezogen. Die Auswertung der γ -Globulin Fraktion mit diesem Verfahren könnte neben der Bestimmung des Liquor-Serum-Quotientens des Immunglobulins G auch optische Hinweise auf eine intrathekale Immunreaktion geben.

Thompson (1991) weist darauf hin, dass bei ZNS-Erkrankungen das Gesamteiweiß im Liquor noch Normalwerte haben kann, obschon in der Elektrophorese, wie zum Beispiel der PAGE-Elektrophorese, Abweichungen beobachtet werden können. Hiraoka (2000) quantifizierte durch die SDS-Kapillarelektrophorese die Proteine Albumin und α 2-Makroglobulin und nutzt ihre Liquor-Serum-Quotienten zur Beurteilung der BLS Schrankenfunktion. Auch Keir (1986) beschreibt eine höhere Sensitivität der Messung der BLS-Funktion mittels Polyacrylamidgелеlektrophorese, als durch eine alleinige Messung des Albumins im Liquor und Serum. Sein Fazit ist, dass die Liquoruntersuchung zur Feststellung der BLS-Funktion aus der Verteilung der Liquorproteine erfolgen sollte. Garna (2007) untersuchte den Nutzen der Agarosegelelektrophorese für die Beurteilung der Liquorproteine in der Veterinärmedizin und stellte eine erhöhte Aussagekraft dieser Untersuchung fest.

Besonders in der Pädiatrie sind die Liquorprobenmengen klein und deren optimale Nutzung essentiell. Das hier optimierte Analysesystem benötigt in der Regel maximal 1000 μ l Liquor für Gesamteiweißbestimmung und Elektrophorese. Hiermit können, wie oben ausgeführt, mehr Informationen gewonnen werden, als momentan in der Routine der Basisliquorproteindiagnostik erlangt werden.

Das hier vorgestellte Liquorproteinelektrophoresesystem sollte die jetzige Basisdiagnostik ergänzen. Neben den Parametern, die bei der jetzigen immunchemischen Basisdiagnostik gemessen werden (Liquor-Serum-Quotient des Albumins und des Immunglobulins G mit Reiberauswertung), können weitere Parameter zur Beurteilung der Liquorproteine (Transthyretin, Alpha 2 Proteine, Transferrin und Tau Fraktion) herangezogen werden. Diese können automatisch auf Normalwerte für pädiatrische Patienten bezogen werden. Mit einer präzisen Methode kann schon mit der Basisdiagnostik ein Maximum an Information für den Kliniker bereitgestellt werden.

Ein Nachteil der Nutzung der Liquorelektrophorese zur Basisuntersuchung der Liquorproteine ist, dass eine Konzentrierung des Liquors vor der Elektrophorese erfolgen muss und die elektrophoretische Untersuchung von Proteinen längere Zeit in Anspruch nimmt als die nephelometrische.

Um das hier beschriebene Verfahren der Elektrophorese zu vereinfachen, könnte ein kommerzielles Elektrophoresesystem wie zum Beispiel das Hydrasis System der Firma Sebia, bei dem

ebenfalls die aufgetrennten Proteine mit Amidoschwarz gefärbt werden, nach Testung der Eignung, genutzt werden. Das Sebia-System wird heutzutage routinemäßig hauptsächlich für die Quantifizierung von Serumproteinen mittels Elektrophorese und für Spezialuntersuchungen im Serum und Urin eingesetzt. In der Diagnostik wird das Sebia-System zusätzlich zur Identifikation des β 2-Proteins in Flüssigkeiten außerhalb der Liquorräume z.B. zur Diagnostik Liquorrhoe eingesetzt. Diese wird von Saunders (2004) als empfindlicher, jedoch auch als zeitaufwendiger gewertet, als die Messung des β -Trace-Proteins mittels der Nephelometrie zur Diagnostik der Liquorrhoe.

Spezialuntersuchungen sollten sich, abhängig von den Ergebnissen des Basisprogramms und der klinischen Fragestellung der Liquoragarosegelelektrophorese anschließen. Zur Sicherung einer intrathekalen Immunreaktion sollte beispielsweise immer eine isoelektrische Fokussierung in Agarosegel mit Immunblotting als goldener Standard an die Normalelektrophorese des Liquors und Serums angeschlossen werden (Friedman et al 2005).

5.2 Klinische Ergebnisse

Die optimierte Agarosegelelektrophorese mit anschließender Auswertung mittels der automatischen Gaußapproximierung wurde eingesetzt, um die Liquorproteine von 1800 Kindern von der Geburt bis zu einem Lebensalter von 18 Jahren zu analysieren. Die Gründe für die Liquorpunktion waren vielfältig. Es wurden diejenigen Kinder für die Analyse der Normalwerte sowie von pathologischen Veränderungen im Liquor ausgewählt, deren Diagnosen retrospektiv gesichert werden konnten.

In einem ersten Schritt wurden die Normalwerte für Liquorproteine im Kindesalter anhand eines im Vergleich zu vorherigen Untersuchungen (Siemes 1975) größeren Patientenkollektives reevaluiert und erweitert. In einem zweiten Schritt wurden diese Normalwerte eingesetzt, um die Liquoreiweißveränderungen bei fünf Erkrankungen, die eine hohe Relevanz in der Pädiatrie haben, zu beurteilen.

5.2.1 Normalwertermittlung

Zur Ermittlung von Liquorproteinnormalwerten wurden die Liquorproteine von 202 Kindern mittels der in dieser Arbeit optimierten quantitativen Agarosegelelektrophorese untersucht. Alle Kinder hatten, soweit bekannt, keine Erkrankung, welche die Liquorproteinkonzentrationen be-

einflussen konnten. Die Gruppe wurde retrospektiv ausgewählt, indem andere Laborwerte, radiologische Untersuchungen und der klinische Krankheitsverlauf einbezogen wurden. Die Kinder waren wegen eines Verdachtes auf eine ZNS-Erkrankung lumbal punktiert worden. Durchgeführte radiologische und laboranalytische Untersuchungen sowie das EEG zeigten keine abnormalen Ergebnisse, so dass eine ZNS-Erkrankung weitgehend ausgeschlossen werden konnte. Die Kinder wurden in 9 Altersgruppen eingeteilt. Die Altersspanne der Gruppen im Kleinkindalter sind wesentlich enger als die im späteren Kindesalter gewählt, um so den schnellen Veränderungen der Liquorproteinkonzentration im frühen Kindessalter Rechnung zu tragen. Insgesamt wurden die früheren Untersuchungsergebnisse des Labors (Siemes 1975) durch die hier erstellten Ergebnisse bestätigt und erweitert (Barnard 1996).

Die Tabelle der Normalwerte wendet rein statistische Regeln zur Gruppierung der Normalwerte nach ihrer Bedeutung im Multiple Range Test an. Im Unterschied dazu zeigen die Abbildungen der Normalwertverläufe der einzelnen Proteine die eigentliche Verteilung der Werte im Altersverlauf. In der Diskussion der Normalwerte werden diese eigentlichen Verteilungen der Proteinkonzentrationen interpretiert, da diese eher die physiologischen Veränderungen der Liquorproteine widerspiegeln sollten.

Die Gesamteiweißkonzentration fällt stark bis zur Altersgruppe 3 (3-7 Monate) nach Geburt ab, danach bleiben die Werte über die nächsten 17 Jahre niedrig, wie es auch von anderen Autoren gefunden wurde (Häfli 1985, Bachmann 1990, Biou 2000). Biou (2000) schließt aus seinen Untersuchungen des Gesamteiweißes im Liquor, dass die Reifung der BLS ihr Maximum im 3. Lebensmonat hat. Ein Minimum der mittleren Proteinkonzentration im Liquor wird in der Altersgruppe 5-6 (1½ - 5 Jahre) gefunden. Dieses entspricht dem von Häfli (1985) beschriebenen Anstieg des Gesamteiweißes im Liquor nach dem 4. Lebensjahr. Die untere Grenze der Gesamteiweißkonzentration (10te Perzentile) in dieser Arbeit blieb vom 2. Lebensmonat an konstant 149 mg/l. In früheren Arbeiten wurde eine Konzentration von unter 200 mg/l als abnormal gering angesehen und ging mit Erkrankungen wie Hyperthyreoidismus, erhöhtem intrakraniellen Druck und Leukämie einher (Fishman 1992).

Die Proteinzusammensetzung im Liquor ist einerseits von der Permeabilität der Gefäße, welche sich mit dem Lebensalter des Kindes verändert (Häfli 1985, Wiederkehr 1991) und andererseits vom Liquorfluss (Reiber 1994) abhängig. Zur Beurteilung der Permeabilität der BLS werden in der Literatur oft die Proteine Albumin und α 2-Proteine benutzt (Statz 1983, Mucci 1993).

Die relative und absolute Konzentration des Liquoralbumins, welches ausschließlich aus dem Serum in den Liquor übertritt, nimmt kontinuierlich während der ersten vier Lebensmonaten ab. Der starke Abfall der absoluten Liquoralbuminkonzentration in diesem Zeitraum zeigt eine ra-

sche Reifung der BLS an, die bei einem reifen Neugeborenen somit mindestens vier Monate nach der Geburt andauert. Der Zeitverlauf der absoluten und relativen Konzentrationsveränderungen des Liquoralbumins weist Tiefstwerte in der Altersgruppe 5-6 (1½ - 5 Jahre) auf, das Minimum wird im Lebensalter von 3 Jahren erreicht.

Die β 1-Fraktion, die das Transferrin beinhaltet, und Transthyretin sind Transportproteine für Eisen, Thyroxin und Retinol (Bell 1991, Schreiber 1993). Beide Proteine werden im ZNS und in der Leber gebildet (Espinosa 1990, Herbert 1986). Der Anteil des zentral gebildeten Transthyretins wird mit 90% beschrieben (Zettl 2005). In der hier untersuchten Gruppe von Kindern zeigte sich, dass der Altersverlauf der Konzentration beider Proteine sehr ähnlich ist, welches auf dieselben Aufgaben und Syntheseorte dieser Proteine schließen lässt. Im Vergleich zu den Relativwerten der beiden Proteine, die bis zu einem Lebensalter von zwei Jahren ansteigen, fallen die Absolutwerte dieser Proteine bis zum 3. Lebensjahr ab. Gruener (1991) beschreibt einen Abfall der absoluten mittels ELISA gemessenen Liquortransferrinkonzentration von 18,8 +/- 12 mg/l in der Altersgruppe 1 - 60 Tage auf 13,5 +/- 4,5 mg/l in der Altersgruppe 2 Monate - 12 Jahre.

Diese Resultate entsprechen den unseren, der absolute Gehalt des β 1-Peaks in der Elektrophorese sank von 26 mg/l im Lebensalter bis zu 2,4 Monaten auf 15 mg/l im Lebensalter von 3 Monaten - 18 Jahren ab.

Die relativen und absoluten Veränderungen der Transthyretin- und Transferrinkonzentrationen sind in den ersten 7 Monaten nach Geburt am stärksten, danach fallen sie nach dem Wendepunkt im dritten Lebensjahr geringer aus. Die starken Veränderungen dauern über die Periode der vom Albumin angezeigten Reifung der BLS an (Statz 1983, Felgenhauer 1993). Dies ist möglicherweise durch ein unterschiedliches Wachstum des ZNS und der Liquorräume zu erklären.

Die α 2-Fraktion zeigt einen starken absoluten Abfall in den ersten 4 Lebensmonaten, ähnlich dem der Albuminfraktion. Danach sind die Veränderungen gering. Relativ steigt das α 2-Globulin leicht bis zur Altersgruppe 6 (3-6 Jahre) an und fällt danach wieder kontinuierlich ab. Dieser Verlauf weicht von dem des Albumins ab und legt die Vermutung nahe, dass auch die Proteine dieser Fraktion ebenso wie das Transthyretin und Transferrin an dem Reifungsprozess des Gehirnes beteiligt sind.

Veränderungen der γ -Globuline, die bei Gesunden ausschließlich aus dem Blut in den Liquor cerebrospinalis übertreten, zeigen die stärksten altersabhängigen Veränderungen. Ein Minimum der absoluten und relativen γ -Globulinfraktion tritt im Lebensalter von 5 Monaten auf, welches mit dem häufig beschriebenen Konzentrationsminimum der γ -Globuline im Serum übereinstimmt (Gerbaut 1981, Lischka 1994, Rust 1988). Die tiefste Konzentration des Immunglobu-

lins G im Liquor von kranken Kindern ohne ZNS Beteiligung wurde bisher zwischen 6 und 12 Monaten beschrieben (Statz 1983).

Die unteren Grenzen der γ -Globulinfraktion (IgG) ist ebenfalls wichtig, da es bei Leukämie, neurodegenerativen Erkrankungen und Glucocorticosteroid Therapie auch zu Verringerung dieses Wertes kommt (Statz 1983, Felgenhauer 1993). Sie wird bis heute selten in die Beurteilung der Basisliquorproteindiagnostik eingeschlossen.

Folgende Frage konnte beantwortet werden:

Lassen sich mittels der Liquoragarosegelelektrophorese pädiatrische Normalwerte ermitteln? Sind diese mit den Werten aus der Literatur vergleichbar?

Ja, altersabhängige Normalwerte konnten für die Liquoragarosegelelektrophorese mit statistischer Relevanz aufgestellt werden. Diese Werte sind mit früheren Ergebnissen anderer Autoren und des eigenen Labors (Siemes 1975) vergleichbar, jedoch umfassender. Neben oberen Grenzen für die Proteinnormalwerte werden auch untere Grenzen, die auch klinisch relevant sein können, aufgestellt. Es konnte gezeigt werden, dass mit einer Methode 7 Proteine/ Proteinfaktionen bewertet und zur Analyse von Liquorproteinen genutzt werden können. Die Altersgruppen schließen in dieser Arbeit einen größeren Altersbereich (Häfli nur bis zu einem Lebensalter von 6 Monaten) als bisher beschrieben ein. Hiermit ergibt sich eine größere Einsetzbarkeit der Liquoragarosegelelektrophorese Normalwerte als Fundament der Diagnostik neuropädiatrischer Krankheiten. In der Basisdiagnostik eines Routinelabores wird meist lediglich das Albumin im Liquor altersabhängig beurteilt und für die Liquor-Serum-Quotienten Diagnostik eingesetzt.

5.2.2 Erkrankungen des ZNS

Besonders im Kindesalter können Erkrankungen des ZNS schwerwiegende Auswirkungen durch bleibende Schäden auf die weitere Entwicklung des Kindes zur Folge haben. Daher ist eine schnelle exakte Diagnose für eine möglichst frühzeitige Therapie von äußerster Wichtigkeit. Da die Zusammensetzung der Proteine im Liquor cerebrospinalis eine Erkrankung des ZNS häufig widerspiegelt, ist die Untersuchung der Liquorproteine ein wichtiges Instrument in der Diagnostik neuropädiatrischer Krankheiten.

Exemplarisch wurden für diese Arbeit fünf in der Pädiatrie relevante Erkrankungen ausgewählt, die aufgrund verschiedener Pathomechanismen mit einer Störung der BLS-Funktion, einer Änderung des Liquorflusses und/oder lokaler Bildung von Gammaglobulinen einhergehen und dadurch zu einer Veränderung der Liquorproteinzusammensetzung führen.

Ausgewählt wurden:

- 1) Das Guillain-Barré-Syndrom - Entzündung der dorsalen Wurzelganglien mit der Folge einer lokalen Undichte der BLS und einer Liquorflussbehinderung
- 2) Akute Leukämie und lymphoblastisches NHL ohne ZNS-Beteiligung - Veränderung der BLS-Funktion durch unterschiedliche Therapieschritte.
- 3) Neuroborreliose - Einwandern von Krankheitserregern und Lymphozyten in den Liquor mit der Folge der Veränderung der BLS-Funktion und des Gammaglobulinbereiches
- 4) Akute bakterielle Meningitis - Veränderung der BLS-Funktion bzw. des Liquorflusses durch Entzündung der Meningen
- 5) globale Retardierung mit Erweiterung der Liquorräume - Veränderung der Liquorproteine im Sinne einer Abdichtung der BLS-Funktion oder einer Erweiterung der zentralen Liquorräume mit erhöhtem Liquorfluss

Die Veränderungen von bis zu sieben Liquorproteinen bzw. Liquorproteingruppen in Zusammenhang mit diesen Erkrankungen wurden durch die optimierte Liquoragarosegelelektrophorese untersucht und auf die neu erstellten altersabhängigen Normalwerte bezogen.

Es wird gezeigt, dass durch die optimierte Liquoragarosegelelektrophorese mehr Parameter (Transthyretin, Albumin, Alpha 2-Proteine, Transferrin, Tau Fraktion und Gamma Globuline) zur Beurteilung der Funktion der BLS zur Verfügung stehen, als es bei der herkömmlichen immunchemischen Analyse der Liquor-Serum-Quotienten des Albumins und Immunglobulins G in der Basisdiagnostik der Fall ist. Durch die Liquoragarosegelelektrophorese können Störungen der BLS sensitiver erkannt werden und so dem Kliniker mehr Hinweise auf Erkrankungen geben werden.

Guillain-Barré-Syndrom

Bei dem Guillain-Barré-Syndrom (GBS) kommt es zu einer Entzündung der Markscheiden der Nervenwurzeln und peripheren Nerven, die zu schlaffen Lähmungen führt. Die genaue Ursache der Erkrankung ist noch unbekannt, jedoch wird eine Autoimmunogenese infolge infektiöser Erkrankungen oder Impfungen angenommen (Wallesch 2005, Korinthenberg 1992).

Spätestens 10 Tage nach Erkrankungsbeginn treten Veränderungen der Liquorproteine auf, wobei es charakteristischerweise zu keiner oder nur einer geringen Veränderung der Liquorzellzahl kommt (Gonzalez 2009). Diese Liquorproteinveränderungen sind beim GBS, abhängig von dem Zeitpunkt der Liquorabnahme, unterschiedlich stark ausgeprägt.

Ziel dieser Arbeit war es, die Liquorproteinveränderungen von Patienten mit einem GBS während des Krankheitsverlaufes zu verfolgen und zu überprüfen, ob charakteristische Proteinveränderungen in den einzelnen Phasen der Erkrankung darstellbar sind.

Es wurden drei Krankheitsphasen unterschieden.

1. Präphase: Die Patienten haben Symptome der Erkrankung, die zu einer Klinikeinweisung führten, jedoch zeigten die Liquorproteine fast keine Veränderung.
2. Basisphase: Starke Veränderungen der Liquorproteine, ausgeprägte klinische Symptome.
3. Postphase: Klinische Besserung des Patienten jedoch noch anhaltende Veränderungen der Liquorproteinelektrophorese.

In der **Präphase** der Erkrankung zeigen das Gesamteiweiß und der Absolutwert der α 2-Proteine eine leichte Erhöhung. Die γ -Globulinfraktion ist im Vergleich zur Norm relativ und absolut erhöht. Alle anderen Fraktionen (Transthyretin, Albumin, Transferrin und τ -Protein) zeigen fast keine Abweichung von den Normalwerten. Allein der Relativwert der Transthyretinfraktion zeigt einen erniedrigten Wert. Diese Veränderungen der Liquorproteine in der Präphase geben einen ersten Hinweis auf eine frühe Störung der BLS, die mit alleiniger immunchemischer Messung des Liquor-Serum-Quotienten des Albumins und des Immunglobulins G nicht erfassbar wäre. Das selektive hohe Ansteigen der γ -Globulinfraktion scheint auf eine lokale Synthese dieses Proteins hinzudeuten, was in der jüngeren Literatur bisher nicht beschrieben ist. In älteren Arbeiten beschreiben Autoren ein frühes Ansteigen der Immunglobuline im Liquor (Link 1973). Besonders der altersbezogene prozentuale Abfall der Transthyretin Fraktion kann hier als sensibler Marker der BLS-Funktion genutzt werden.

Die klinische Diagnose eines GBS ist nicht immer eindeutig. Daher ist es besonders in diesen Fällen wichtig durch Laboruntersuchungen, wie beispielsweise mit der Liquoragarosegelelektrophorese, eine Hilfestellung für die Diagnose der Krankheit zu geben. Durch die Schwere der Störung der BLS-Funktion am Beginn der Krankheit können nach Gonzalez (2009) prognostische Aussagen über den Verlauf des GBS gegeben werden. Je stärker die anfängliche Störung der BLS – Funktion ist, desto schwerer ist der Verlauf der Erkrankung.

In der **Basisphase** kommt es zu einem Anstieg des Gesamteiweißes und der Absolutwerte aller Proteine, bis auf das hauptsächlich im ZNS gebildete Transthyretin, das keine Abweichung von der Normalkonzentration zeigt. Chiang (2009) fand hingegen eine absolute Erhöhung des Transthyretins bei dem GBS und erklärt dieses entweder mit einer erhöhten Produktion des Proteins als ZNS-Protektivum, einer verlangsamten Liquorzirkulation oder einer gestörten BLS-Funktion. Andere Autoren wiederum berichten von einem Abfall des Transthyretins bei einem

gleichzeitigen Anstieg der Expression unter anderem des Haptoglobulins und des Immunglobulins G Kappa (Jin 2007, Lehmsiek 2007).

Die absolute Konzentration der τ -Fraktion, welche liquorspezifisch ist, zeigt nur einen leichten Anstieg gegenüber der Norm.

Im Vergleich zu den liquorspezifischen Proteinen steigen die Proteine, die unter physiologischen Bedingungen allein aus dem Blut in den Liquor übergehen (Albumin, α 2-Proteine und IgG) stark an, wobei das IgG als Hauptbestandteil der γ -Globulinfraktion die stärkste Erhöhung gegenüber der Norm aufweist. Delank (2004) beschreibt eine mäßige IgG-Erhöhung im Liquor in dem Verlauf der Erkrankung.

Die Ergebnisse der Relativwerte der Elektrophorese zeigen eine starke Erniedrigung des hauptsächlich im ZNS gebildeten Transthyretins und der τ -Fraktion sowie eine leichte Erniedrigung der β 1- Fraktion gegenüber der Norm. Gonzalez (2009) zeigte ebenfalls ein Absinken der Transthyretinfraktion in der PAGE-Elektrophorese bei dem GBS. Fishman (1991) beschreibt ein Absinken der relativen τ -Fraktion bei Undichte der BLS.

Die aus dem Serum stammenden Proteine zeigen fast keine Abweichung ihrer Relativwerte von der Norm mit Ausnahme des Immunglobulins G, das leicht erhöht ist. Etwa 80% der Liquorproteine stammen aus dem Serum, daher sind geringe Veränderungen der Relativwerte dieser aus dem Serum stammenden Proteine bei einer BLS - Störung zu erwarten. Der starke prozentuale Abfall der hauptsächlich im ZNS gebildeten Proteine ist auf einen Verdünnungseffekt durch die zunehmend eindringenden Serumproteine zurückzuführen. Der alleinige Anstieg des Immunglobulins G gibt wiederum einen Hinweis auf eine lokale IgG Veränderung.

In der **Postphase**, die mit der klinischen Besserung der Patienten einhergeht, zeigt sich weiterhin eine Erhöhung des Gesamteiweißes sowie der Absolutwerte aller Proteine. Die IgG-Fraktion ist wiederum am stärksten erhöht. Die Relativwerte des Transthyretins und der τ -Fraktion normalisieren sich, sind jedoch weiterhin gegenüber der Norm erniedrigt. Das IgG ist das einzige relativ gegenüber der Norm erhöhte Protein. Diese Ergebnisse zeigen, dass trotz deutlicher klinischer Besserung der Patienten die totale Wiederherstellung der BLS-Funktion langsam erfolgt, was auch von anderen Autoren beschrieben wird (Wildemann 2006, Gonzalez 2009).

Eine Erklärung für die überproportionale Erhöhung der γ -Globulinfraktion im Liquor könnte die Lokalisation der Erkrankung bieten. Es kommt neben der Entzündung der Markscheiden der peripheren Nerven zu einer Entzündung der Spinalganglien. Lagern sich hier vermehrt Plasmazellen an, so ist vorstellbar, dass vermehrt von den Plasmazellen produzierte Immunglobuline lokal in den Lumballiquor übertreten und es so zu einer stärkeren Erhöhung dieser Proteine ge-

genüber den anderen aus dem Plasma stammenden Proteinen kommt (Hadden 2002). Die fehlende oder nur leichte Erhöhung der Liquorzellzahl würde einer solchen Theorie nicht widersprechen (Vedeler 1986).

Die konstante absolute Konzentration des hauptsächlich zentral synthetisierten Transthyretins spricht ebenfalls für eine lokale lumbale Schrankenstörung. Der vermehrte Einstrom des Transthyretins aus dem Blut, der durch eine allgemeine Störung der BLS-Funktion zu erwarten wäre (Felgenhauer 1999), scheint beim GBS gering und erst in der Postphase erkennbar zu sein. Lehmensiek (2007) fand einen Anhalt für eine erniedrigte Konzentration des Transthyretins. Besonders bei dem Absolutwerten der β 2-Fraktion, welche liquorspezifisch ist, würde man ebenfalls aus dem Grund einer lokalen lumbalen BLS - Störung keine oder nur eine geringe Zunahme erwarten. Tatsächlich ist auch diese Fraktion vergleichsweise schwach gegenüber der Norm erhöht. Ein Grund für den Anstieg der β 2-Fraktion könnte jedoch eine Erhöhung der Konzentration der in dieser Fraktion liegenden Immunglobuline A und M, die normalerweise sehr gering ist, sein.

Als Ursache der Liquorproteinveränderungen bei dem GBS kann somit eine lokale lumbale Störung der BLS-Funktion durch eine lokale Entzündung mit einem erhöhten lokalen Übertreten der Immunglobuline aus den die Spinalganglien umgebenden Plasmazellen vermutet werden. Ein solcher krankheitsbezogener Mechanismus in Form der BLS-Störung durch das GBS wird auch von anderen Autoren angenommen (Brettschneider 2005). Zettel (2005) beschreibt beim GBS lediglich Hinweise auf eine systemische Immunreaktion mit identischen oligoklonalen Banden im Liquor und Serum. Eine intrathekale Immunreaktion, die durch das Auftreten von oligoklonale Banden im Liquor und nicht im Serum charakterisiert wird, konnte nicht gefunden werden .

Folgende Fragestellung kann beantwortet werden:

Gibt es Muster der Proteinveränderungen, die zur Diagnosefindung und Verlaufsbeurteilung des Guillain-Barré-Syndroms beitragen können?

Das Muster eines unveränderten absoluten Transthyretin und einer nur leicht erhöhten β 2-Fraktion gegenüber der Norm, gepaart mit erhöhten Werten für Gesamteiweiß, Albumin und α 2-Proteine, sowie einer überproportionalen Erhöhung der Gammaglobuline und einer starken Abnahme des relativen Transthyretins und der β -Globuline gegenüber der Norm könnte einen starken diagnostischen Hinweis auf das Vorliegen eines GBS geben. Dieses Ergebnis sollte durch weitere Untersuchungen bestätigt werden.

Im Verlauf eines GBS kommt es zu stadienabhängigen Veränderungen der Liquoragarosegelelektrophorese. Diese äußern sich wie oben beschrieben in verschiedenen starken Veränderungen

des Gesamteiweißes und des gesamten Elektrophoresemusters (Transthyretin, Albumin, α 2-, β - und γ -Globulin). In der Präphase der Liquorveränderungen des GBS, in der sich die Patienten mit klinischen Symptomen der Erkrankung präsentieren, zeigt sich eine leichte Störung der BLS-Funktion mit einer überproportional relativen und absoluten Erhöhung der IgG Fraktion. Die Agarosegelelektrophorese kann somit dem Kliniker besonders bei unsicheren klinischen Symptomen einen ersten Hinweis auf diese Erkrankung geben. Basis- und Postphase der Liquorproteinveränderungen sind durch eine BLS-Störung mit einer überproportionaler polyklonalen Erhöhung des γ -Globulins charakterisiert. Die absolute Konzentration des Transthyretins ist in der Prä- und Basisphase unverändert gegenüber der Norm.

Eine genaue Messung der BLS-Funktion durch die Liquorgarosegelelektrophorese besonders am Anfang der Erkrankung kann zur Diagnosefindung beitragen und kann unter Umständen Aussagen über den prognostischen Verlauf der Erkrankung geben. Gonzalez (2009) stellt eine Verbindung zwischen dem zeitlichem Auftreten sowie der Schwere der BLS-Funktionsstörung und dem prognostischen Verlauf der Erkrankung dar.

Besonders in der Basisdiagnostik der Liquoranalyse würde daher eine altersbezogene Liquorproteinagarosegelelektrophorese eine klinische Relevanz als Ergänzung der bisherigen immunchemischen Bestimmung des Liquor-Serum-Quotientens des Albumins und des Immunglobulins G für die Beurteilung der BLS-Funktion bei dem GBS haben.

Akute Leukämie und lymphoblastisches Non-Hodgkin-Lymphom

Nach dem Deutschen Kinderkrebsregister in Mainz erkranken jährlich in Deutschland etwa 500 Kinder in einem Alter bis zu 14 Jahren neu an einer ALL, ca. 90 Kinder an einer AML und 30 - 40 Kinder an einem lymphoblastischen Non-Hodgkin-Lymphom.

Die akute Leukämie ist im Kindesalter mit 34 % aller bösartigen Erkrankungen die häufigste maligne Erkrankung.

Selten kommt es heutzutage bei der akuten Leukämie während und nach der Leukämietherapie zu einer Beteiligung des ZNS (als mögliche Nische der Leukämie), da das ZNS im Zuge der Leukämietherapie prophylaktisch behandelt wird. Eine ZNS-Prophylaxe durch intrathekale Zytostatikagabe wird bei allen Kindern, die an einer akuten Leukämie oder an einem lymphoblastischen Non-Hodgkin-Lymphom erkrankt sind, durchgeführt, da zwar eine erkennbare Beteiligung des ZNS bei Diagnosestellung selten ist, jedoch ohne prophylaktische Therapie ein Rezidiv der Leukämie häufig im ZNS vorkommt (bis zu 60 %).

Am Anfang der Einführung der ZNS-Prophylaxe wurde neben der intrathekalen Chemotherapie die Bestrahlung des Kopfes für unverzichtbar gehalten. Zwar hatte diese einen guten klinischen Erfolg, jedoch litten viele Kinder lebenslang an den unerwünschten Folgen wie z.B. einer chronischen Enzephalopathie. In der weiteren Entwicklung der Leukämiebehandlung konnte die Bestrahlung des Kopfes weitgehend reduziert oder durch eine alleinige intrathekale Chemotherapie ersetzt werden. Die Bestrahlung wird heute nur bei einer geringen Zahl von Patienten mit hohem Risiko für eine ZNS-Beteiligung eingesetzt (Mörücke 2010, Schlegel 2003).

Veränderungen der Liquorproteine bei Kindern mit einer Leukämie wurden in vorherigen Arbeiten durch den kombinierten Einfluss von Strahlentherapie und intrathekalen Chemotherapie dargestellt (Rating 1978, Siemes 1980). Der Anstieg des Gesamteiweißes sowie des Anteiles des Albumins und des α 2-Makroglobulins zeigten eine Undichte der BLS an, wohingegen der Anteil der Gammaglobuline sich nicht veränderte (Ludwig 1987).

In dieser Arbeit wurde die Auswirkung der Leukämiebehandlung auf die Konzentrationen der Proteine im Liquor anhand des Gesamteiweißes und von 7 Proteinen /Proteinfraktionen in der Liquoragarosegelelektrophorese untersucht. Es kann aufgrund der Komplexität der Leukämiebehandlung (Polychemotherapie) der Einfluss einzelner Medikamente nicht sicher dargestellt werden. Vielmehr sollte die Frage beantwortet werden, welche Auswirkung die Therapieschritte der Polychemotherapie (insbesondere solcher mit oder ohne Glucocorticosteroidtherapie) auf die Aufrechterhaltung der BLS-Funktion haben.

Es wurden Serienproben von 42 Kindern mit akuter Leukämie oder lymphoblastischem NHL im Lebensalter von 9 Monaten bis zu 17 Jahren gewonnen. Veränderungen des Gesamteiweißes, des Transthyretin, des Albumins und der γ -Globuline konnten während der gesamten Therapie gemessen werden. Bei den Proteinen der α 1-, α 2- und β -Fraktion waren die relativen Veränderungen gegenüber der Norm nicht statistisch relevant.

Bei der Analyse der Liquorproteinelektrophorese wurden nur die Veränderungen der Relativwerte der Proteinfraktionen berücksichtigt. Grund hierfür war, dass ein verändertes Gesamteiweiß automatisch zu einer Veränderung der Absolutkonzentrationen der Proteinfraktionen führt. Die Verschiebungen der relativen Anteile der Proteinfraktionen sollten also einen hinreichenden Aufschluss über den Zustand der BLS geben können. Daher wurden bei der akuten Leukämie exemplarisch nur die relativen Elektrophoresewerte ausgewertet.

Es zeigte sich, dass die für die Beurteilung der Funktion der BLS relevanten Proteine das Gesamteiweiß sowie die relativen Veränderungen des Transthyretins und Albumins sind. Die γ -Globulin-Veränderungen wurden nicht bei der Bewertung der BLS-Funktion berücksichtigt, da

die Produktion und damit die Konzentration des Immunglobulins G durch die Chemotherapie im Serum und dementsprechend im Liquor stark herabgesetzt sind (Ludwig 1987).

Bei dem Therapieschritt GC (Induktionstherapie - Glucocorticosteroid mit intrathekalen MTX Therapie) zeigte sich keine Veränderung des Liquorgesamteiweißes und der relativen Konzentration der Liquorproteine gegenüber den altersbezogenen Normalwerten oder den vor Therapie untersuchten Werten, welche auf eine undichte BLS hinweisen würden. Im Gegensatz dazu konnte eine undichte der BLS bei den Therapieschritten MTX (Konsolidierungstherapie - MTX systemisch und intrathekal), I/2 (Re-Intensivierungstherapie - Polychemotherapie mit intrathekalen MTX-Gabe), II (Re-Induktionstherapie - Polychemotherapie, Glucocorticosteroid, intrathekal MTX-Gabe mit oder ohne zusätzliche Cytarabin- und Glucocorticosteroid-Gabe) und Bestrahlung beobachtet werden. Das Gesamteiweiß und der Albuminprozentwert, bezogen auf die Norm, waren leicht bis stärker erhöht, die relative Transthyretin-Fraktion leicht bis stark gegenüber der Norm erniedrigt. Die Strahlentherapie hatte den stärksten Einfluss auf die BLS in Form einer wesentlich erhöhten Durchlässigkeit, wie auch von Siemes (1980) beschrieben. Re-Intensivierungstherapie und Konsolidierungstherapie hatten eine etwas weniger ausgeprägte Durchlässigkeit der BLS als die Strahlentherapie zur Folge. Die Re-Induktionstherapie hatte nur einen geringen Einfluss auf die BLS-Funktion. Lediglich Transthyretin war proportional leicht gegenüber der Norm verringert. Dieses deutet darauf hin, dass die Glucocorticosteroid-Therapie als Teil der Induktions- und Re-Induktionstherapie einen stabilisierenden Einfluss auf die BLS-Funktion zu haben scheint. Eine solche stabilisierende Wirkung auf die BLS durch die Glucocorticosteroid Therapie wurde von Rosenberg (1996) auch bei der Behandlung der Multiplen Sklerose beschrieben. Ludwig (1987) fand, dass sich die BLS-Funktion bei Kindern mit einer akuten lymphoblastischen Leukämie während der Chemotherapie mit Dexamethason schneller normalisiert, also die Glucocorticosteroid-Therapie einen stabilisierenden Einfluss auf die BLS hat.

Auffällig war, dass die proportionale Albuminfraktion vor Beginn der Therapie und während der Induktionstherapie gegenüber den Normalwerten erniedrigt war. Dieses würde auf eine Verdichtung der BLS vor Therapiebeginn deuten, was auf einen natürlichen Schutz des Gehirnes vor einer Einwanderung von Leukämiezellen hindeuten könnte.

Die Therapieschritte, die eine ausschließliche Applikation von Chemotherapeutika ohne Glucocorticosteroide beinhalten (I/2 Re-Intensivierungs- und MTX Konsolidierungstherapie), gehen mit einer erhöhten Durchlässigkeit der BLS einher, die durch ein Ansteigen des Gesamteiweißes sowie des prozentualen Albumins und dem Abfall des prozentualen Transthyretins im Liquor angezeigt wird. Während der Strahlentherapie sind die stärksten Veränderungen der Liquorpro-

teine zu beobachten, was mit den klinischen neurologischen Symptomen im zeitlichen Zusammenhang steht. Die Konzentration des Immunglobulins G sank kontinuierlich während aller Therapieschritte ab und erreichte ein Minimum während der Strahlentherapie.

Insgesamt sind die Veränderungen der Liquorproteine weniger ausgeprägt als bei anderen neurologischen Erkrankungen wie zum Beispiel bei der Meningitis. Umso wichtiger ist es, Reihenuntersuchungen der Liquorproteine während der Leukämietherapie durchzuführen, damit Abweichungen von dem hier gefundenen Muster als Warnhinweise für Infektionen oder einen Leukämierebefall des ZNS gefunden werden können.

In einer weiterführenden Arbeit könnte mittels der Liquorelektrophorese untersucht werden, inwieweit die BLS-Funktion bei Kindern mit einem ZNS-Befall der Leukämie geschädigt ist und in welcher Weise das Liquorproteinmuster von dem abweicht, das hier für Kinder ohne ZNS-Befall durch die Leukämie gefunden wurde. Außerdem müsste genauer untersucht werden, wie sich die einzelnen Leukämietherapieschritte auf die BLS auswirken. Hierfür könnte ein einheitlicheres Patientenkollektiv und zahlreicher gewählte Liquorproteinuntersuchungszeitpunkte dienen.

Bei der normalen Basisdiagnostik der Liquorproteine mit der Analyse des Liquor-Serum-Quotienten des Albumins und Immunglobulins G, könnte der Einfluss der Glucocorticosteroidtherapie auf die BLS während der gesamten Leukämietherapie nicht so genau beurteilt werden, weil die Transthyretin-Fraktion als sensitiver Parameter zur Beurteilung der BLS-Funktion konventionell nicht ermittelt wird, es wird auch immunchemisch kein Liquor-Serum-Quotienten des Proteins Transthyretin bestimmt.

Baber (2008) fand erhöhte und erniedrigte Gesamteiweißwerte während der Leukämieerkrankung von Kindern. Trotzdem sollte die Analyse der Liquorproteine nicht routinemäßig durchgeführt werden, da nach Baber diese Veränderungen keinen Einfluss auf das Behandlungsprogramm der Kinder haben.

Folgende Fragenstellung kann beantwortet werden:

Gibt es bestimmte Liquorproteinveränderungen im Verlauf der Therapie der akuten Leukämie und des lymphoblastischen NHL?

Ja, es kommt zu unterschiedlich ausgeprägter Erhöhung des Gesamteiweißes sowie des relativen Albumins und einer Abnahme des relativen Transthyretin sowie der Gammaglobuline während der einzelnen Therapieschritte. Die stärksten Veränderungen der Liquorproteine sind unter der Strahlentherapie zu beobachten. In den Therapieschritten, in denen die Polychemotherapie und

intrathekale Therapie mit einer Glucocorticosteroidtherapie verbunden ist, zeigt die BLS eine geringere Störung als bei alleiniger Polychemotherapie und intrathekaler Therapie.

Die leichte Erhöhung des Gesamteiweißes und des Albumins und die leichte Erniedrigung des Transthyretins und die starke Abnahme der Gammaglobuline bilden ein typisches Muster der Proteinveränderungen unter der Leukämietherapie. Abweichungen von diesen Veränderungen der Liquorproteine könnten Hinweise auf pathologische Prozesse geben, die nicht durch die Chemotherapie ausgelöst sind, z.B. durch Infektionen oder Leukämiebefall.

Neuroborreliose

Die Labordiagnostik der Borreliose beruht auf verschiedenen Untersuchungsverfahren: Serologische Bestimmung von Antikörpern, Detektion der zellulären Immunantwort, Mikroskopie, Kultivation, Differenzierung des Bakteriums *Borrelia burgdorferi*, Polymerase-Kettenreaktion zur Detektion der Bakterien-spezifischen DNA, Detektion Borrelien-spezifischer Antigene (Hammann Brand 1995). Die Diagnostik der Neuroborreliose ist wesentlich schwieriger als die der Borreliose. Neben den klinischen Symptomen gelten oligoklonale Banden im Liquor als charakteristisch. Der mikrobielle Nachweis des Erregers oder der spezifische Antikörpernachweis im Liquor cerebrospinalis gilt als beweisend.

Die Veränderungen der Liquorproteine sind stark vom Stadium der Erkrankung abhängig. Zeichen der BLS-Störung und oligoklonale Banden im Liquor sind vornehmlich im Stadium 2 (Wochen bis Monate nach der Infektion) der Erkrankung sichtbar (Logigian 1991).

In dieser Arbeit wurden weitere Liquorproteinveränderungen neben dem Auftreten von oligoklonalen Banden, die nicht in allen untersuchten Proben in der Elektrophorese sichtbar waren, untersucht. Alle analysierten Patienten zeigten eine starke Störung der BLS-Funktion, mit den in der Elektrophorese typischen absoluten und relativen Veränderungen des Proteinmusters. Diese sind charakterisiert durch eine starke Erhöhung der Absolutkonzentration der aus dem Serum stammenden Proteine (Albumin, α 1-, α 2- und γ - Globuline) und nahezu konstanter relativer Werte dieser Proteine gegenüber der Norm. β 1-Proteine sind leicht absolut erniedrigt und relativ erhöht, da diese sowohl aus dem Serum als auch aus dem ZNS entstammen. Das fast ausschließlich im ZNS gebildeten Transthyretin und die liquorspezifische τ - Fraktion steigen absolut gering gegenüber der Norm an, fallen jedoch deutlich gegenüber der Norm relativ ab.

So zeigt das Gesamteiweiß und alle anderen Proteinwerte der Elektrophorese der hier untersuchten Patienten mit einer Neuroborreliose eine leichte bis starke absolute Erhöhung gegenüber der Norm. Eine Erklärung hierfür ist der vermehrte Eintritt von Serumproteinen in den Liquorraum.

Transthyretin und die τ -Fraktion zeigten die geringste (jedoch relevante) absolute Erhöhung gegenüber der Norm, da sie zum größten Teil intrathekal gebildet werden. Das Immunglobulin G zeigt die stärkste absolute und relative Erhöhung gegenüber der Norm, welches auf die intrathekale Bildung dieses Proteins hinweist. Dieses wird auch durch den Befund bestätigt, dass das auf den Normwert bezogene IgG relativ eine überproportionale Erhöhung gegenüber der Albuminfraktion und dem Gesamteiweiß zeigt, also stärker erhöht ist als es bei einer reinen Schrankenstörung zu erwarten wäre. Die Proteine Transthyretin und die τ -Fraktion, die ausschließlich bzw. hauptsächlich intrathekal gebildet werden, aber auch aus dem Blut in den Liquor übertreten, sind in ihren Relativwerten stark und Transferrin, das hauptsächlich aus dem Blut stammt, leicht gegenüber der Norm erniedrigt. Diese für eine Störung der BLS-Funktion typische Konstellation sind auf einen Verdünnungseffekt dieser Proteine durch die eintretenden Serumproteine zurückzuführen.

Wiederum erhält man durch die Liquorproteinelektrophorese mehr Parameter zur Beurteilung der BLS-Funktion im Vergleich zur immunchemischen Basisdiagnostik (Liquor-Serum-Quotient des Albumins und Immunglobulins G). Der Kliniker kann hierdurch mehr Hinweise die Erkrankung erhalten.

Folgende Fragenstellung kann beantwortet werden:

Gibt es Muster der Proteinveränderungen, die zur Diagnosefindung der Neuroborreliose beitragen können?

Bei der Neuroborreliose kann man nicht über ein charakteristisches Bild der Liquorproteinveränderungen, jedoch von einem typischen Bild einer eingeschränkten BLS-Funktion und einer überproportionalen Erhöhung des Gammaglobulins als Zeichen einer intrathekalen Immunreaktion in der Agarosegelelektrophorese sprechen. Die Diagnose Neuroborreliose beruht auf Klinik, Elektrophoreseprofil, dem Nachweis von oligoklonalen Banden und dem Antikörpernachweis. Dieses bedeutet, dass neben der Eiweißelektrophorese, die nur oligoklonale Banden des IgG mit einer Sensitivität von 60% (Fortini 2003) nachweisen kann, immer auch ein Immundetektionsverfahren angewendet werden sollte, um oligoklonale IgG-, IgM- oder IgA-Antikörper nachzuweisen. Im Stadium zwei der Neuroborreliose werden zu 86% oligoklonale IgM-Antikörper nachgewiesen, jedoch nur zu 30% IgG und 53% IgA (Pohl 1986). Als absolute Sicherung der Diagnose Neuroborreliose gilt der Nachweis von Borrelien-spezifischen Antikörpern oder des Erregers im Liquor (Hansen 1991).

Bakterielle Meningitis

Die Diagnose der bakteriellen Meningitis stützt sich auf vier Kriterien: typische Klinik, stark erhöhte Werte von Zellzahl und Gesamteiweiß im Liquor und dem Erregernachweis. Die bakterielle Meningitis geht mit einer starken Erhöhung der Gesamteiweißkonzentration und stark ausgeprägter Veränderungen des Elektrophoreseprofils im Liquor einher (Isenberg 1999). Eine relative Erniedrigung der Albumin- und der β -Globuline Fraktion sowie eine Erhöhung der $\alpha 2$ -Fraktion wird durch Isenberg (1999) beschrieben. Eine absolute Erhöhung von Albumin und Transferrin in Liquor wird von Przyalkowski (1996) dargestellt.

Die Analyse des hier untersuchten Patientenkollektives ergab eine absolute Erhöhung aller Proteine im Liquor, wobei die aus dem Serum stammenden Proteine Albumin, $\alpha 2$ -Proteine und das Immunglobulin G am stärksten erhöht waren. Eine starke Erhöhung des $\alpha 2$ -Makroglobulins bei Patienten mit einer infektiösen Meningitis wird von Kanah (2008) beschrieben. Transthyretin weist wiederum die geringste absolute Erhöhung gegenüber der Norm auf, gefolgt von der τ - und Transferrin-Fraktion. Der Anstieg des Transthyretins ist durch einen vermehrten Anstieg des aus dem Blut stammenden Anteils dieses Proteins entlang der Neuroaxis zu erklären.

Relativ ist Transthyretin dagegen am stärksten erniedrigt gefolgt von der τ -Fraktion und dem Transferrin. Albumin und $\alpha 2$ -Proteine zeigen eine minimale Erniedrigung gegenüber der Norm an. Lediglich das Immunglobulin G hat sich nicht gegenüber der Norm verändert. Das Elektrophoresebild bei der bakteriellen Meningitis stellt eine allgemeine Undichte der BLS ohne Anhalt für eine intrathekale Immunreaktion dar. Die starke relative Erniedrigung der Transthyretinfraktion kann durch einen Verdünnungseffekt dieses Proteins durch die Proteine, die vermehrt aus dem Serum in den Liquor einwandern, erklärt werden (Felgenhauer 1999).

Folgende Fragenstellung kann beantwortet werden:

Gibt es Muster der Proteinveränderungen, die zur Diagnosefindung der bakteriellen Meningitis beitragen können?

Es tritt das klassische Bild einer alleinigen starken Störung der BLS-Funktion ohne Erhöhung der Gammaglobuline auf. Die Elektrophoreseveränderungen sind nicht charakteristisch für eine bakterielle Meningitis, könnten jedoch ein weiterer Puzzelstein in der Diagnosefindung bei unklaren Verläufen der Erkrankung sein.

Entwicklungsretardierung mit Vergrößerung der Liquorräume

Globale Retardierungen der Entwicklung im Kindesalter haben multiple Ursachen. So können eine ZNS-Blutung, eine intrauterine Infektion, Geburtstraumen und Infektionen post partum in den nachfolgenden Jahren zu dem Bild der globalen Retardierung führen. Oft wird bei den am Anfang der Diagnostik stehenden bildgebenden Untersuchungen eine mehr oder weniger ausgeprägte Vergrößerung der internen und externen Liquorräume festgestellt. Laboruntersuchungen besonders des Blutes und des Urins schließen sich zum sogenannten Stoffwechselscreening an. Hierdurch können zwar einige Erkrankungen diagnostiziert werden, jedoch viele andere nicht ausgeschlossen werden. Daher folgen Spezialuntersuchungen des Liquors und Biopsien zum Beispiel der Haut. Im Liquor werden besonders Veränderungen der Aminosäuren, organischer Säuren und Neurotransmitter analysiert.

Untersuchungen über Veränderungen der Liquorproteine in dieser Patientengruppe sind bisher selten durchgeführt worden. Die Ergebnisse und besonders die Frage, ob es ein typisches Proteinmuster im Liquor von Kindern mit einer Retardierung und Vergrößerung der Liquorräume gibt, sind äußerst strittig. Eindeutiger sind die Untersuchungen der Proteinveränderungen bei einem Hydrozephalus. So fand Schmidt (1991) bei Patienten mit einem Hydrozephalus und zunehmendem mentalen Abbau eine Erhöhung der β -Proteine in der Liquelektrophorese. Der Hydrozephalus internus wird mit einer Erhöhung der γ -Globulinfraktion beschrieben. Hydrozephalien, die durch Veränderungen an den Gefäßen entstanden sind, gehen in Schmidts Studie mit einer Erhöhung des Gesamteiweißes und der Proteine Albumin und IgG einher. Nicht gefäßbedingte Hydrozephalien zeigten dagegen lediglich eine Erhöhung der α -Proteine und ein akzentuiertes IgG.

Cerda (1980) fand, dass bei Patienten mit einer extraventrikulären Obstruktion des Liquorflusses ein Anstieg des lumbalen Transthyretins zu beobachten ist, dass es jedoch bei Patienten mit einem intraventrikulären Verschluss zu einem Abfall dieser Fraktion im Lumballiquor kommt (Stopliquor).

Hierase (1984) beschreibt ein so genanntes degeneratives Liquorproteinmuster bei Patienten mit einer Muskeldystrophie vom Typ Duchenne, das mit einer Erhöhung der Transthyretin Fraktion und einer Erniedrigung der γ -Globuline einhergeht. Bei allen von ihm untersuchten Patienten wurde zusätzlich ein pathologisches EEG und CT, sowie eine verminderte Intelligenz, gefunden. Ziel dieser Arbeit war es, erste Hinweise darüber zu erlangen, ob es ein so genanntes Retardierungsmuster der Liquorproteine bei Patienten mit globaler Retardierung und Vergrößerung der Liquorräume gibt.

Das Gesamteiweiß im Liquor war leicht erniedrigt. Die Veränderungen des Liquoragrosegelelektrophoreseprofils waren gering ausgeprägt. Die aus dem Serum stammenden Proteine Albumin, α 2-Proteine und die γ -Globuline zeigten einen leichten relativen und absoluten Abfall gegenüber der Norm. Transthyretin zeigte als einziges Protein einen leichten relativen und absoluten Anstieg gegenüber der Norm, β 2-Globulin und β 1-Globulin (Transferrin) blieben in dem Normalbereich. Die Erhöhung des Transthyretins und die Erniedrigung der γ -Globulinfraction bestätigt somit die Ergebnisse von Hierase (1984). Eine Erhöhung der β -Proteine wie Schmidt (1991) sie fand, konnte nicht nachgewiesen werden.

Diese Befunde sprechen für eine „Verdichtung“ der BLS. Aus welchem Grund diese Veränderung auftritt, muss weiter analysiert werden.

Eine Basisuntersuchung der Liquorproteine in einem Routinelabor würde keine Veränderungen anzeigen, da besonders das Transthyretin hier nicht untersucht wird und keine unteren Normalwerte für Proteinveränderungen berücksichtigt werden. Gerade das Transthyretin wird von vielen Autoren in Zusammenhang mit degenerativen Erkrankungen gebracht.

Folgende Fragenstellung kann beantwortet werden:

Gibt es Muster der Proteinveränderungen, die zur Diagnosefindung bei Kindern mit Retardierung und erweiterten Liquorräumen beitragen können?

Das Elektrophoresebild zeigt eine Erniedrigung des Gesamteiweißes, eine erhöhte Transthyretinfraction und eine erniedrigte γ -Globulinfraction. Diese Konstellation könnte charakteristisch für Kinder mit einer Retardierung sein. Es ist empfehlenswert, weitere Untersuchungen zur Klärung der Ursache der Retardierung und der Vergrößerung der Liquorräume, die in vorherigen radiologischen Untersuchungen diagnostiziert wurde, zu veranlassen.

Die zweidimensionale Elektrophorese mit anschließender Massenspektrometrie und oder die immunchemische quantitative Bestimmung von Proteinen mittels der ELISA-Technik wird besonders zur Untersuchung unklarer Entwicklungsstörungen empfohlen. Proteine wie die so genannten Prozessmarker, wie 14-3-3-Protein, die τ -Fraktion und Neuronen-spezifische Enolase, sowie die Aktivitätsmarker S100b und andere Marker sollten analysiert werden (Wallesch 2005).

Käme es bei dem hier beschriebenen Liquorproteinbild zu einer ausgeprägten relativen Erhöhung der γ -Globuline, so würde dieses auf eine subakute oder chronische Entzündung hinweisen. In weiteren diagnostischen Schritten sollte dann besonders eine entzündliche Genese der Erkrankung berücksichtigt werden. Die Liquoragrosegelelektrophorese kann eine Hilfestellung geben, ob weitere Untersuchungen in Richtung entzündlicher oder nicht entzündlicher Genese der Erkrankung erfolgen sollten.

Abschließend lässt sich die Frage:

“Welche Bedeutung kann die Liquoragarosegelelektrophorese für die Diagnose von neuropädiatrischen Erkrankungen haben?“ beantworten.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mittels der optimierten quantitativen Liquoragarosegelelektrophorese altersabhängige Normalwerte für das Gesamteiweiß sowie die Proteine Transthyretin, Albumin, α 2-Globuline, Transferrin, τ -Fraktion und γ -Globuline gebildet werden können. Die Wichtigkeit besonders der Transthyretin-Fraktion, die bei der herkömmlichen immunchemischen Basisdiagnostik nicht zu der Analyse der BLS-Funktion herangezogen wird, ist dargestellt worden.

Es wurde gezeigt, dass die Berücksichtigung des gesamten elektrophoretischen Proteinmusters eine zusätzliche klinische Bedeutung für die Diagnose neuropädiatrischer Krankheiten in der Basisdiagnostik hat und zur sensitiven Analyse BLS-Funktion genutzt werden kann.

Die Auswertung der relativen Ergebnisse der Elektrophorese gibt einen eindeutigen Aufschluss über die Funktion der BLS. Der Kliniker erhält jedoch eine größere Interpretationshilfe über den Zustand der BLS-Funktion durch die relativen und die absoluten Ergebnisse der Elektrophoreseauswertung. Bei gleichgerichteten Veränderungen von Absolut- und Relativwerten zeigen die Absolutwerte deutlich stärkere Normabweichungen an, wie es z.B. beim Albumin der Fall sein kann. Bei entgegengesetzten Veränderungen der Relativ- und Absolutwerte wie z.B. beim Transthyretin zeigen sich hingegen geringere Normabweichungen der Absolutwerte und höhere Abweichungen der Relativwerte. Daher ist eine Analyse der Absolut- und Relativwerte der Elektrophorese für die klinische Interpretation der Funktion BLS optimal.

Mit einer geringen Menge Liquor können mittels der optimierten Liquorproteinagarosegelelektrophorese die BLS-Funktion genau beurteilt werden, der Liquor-Serum-Quotient für die Proteine Albumin und IgG gebildet werden, wenn eine Serumprobe gleichzeitig analysiert wird und die γ -Globulinfraktion kann orientierend auf oligoklonale Banden untersucht werden.

Somit könnte das herkömmliche Basisprogramm der Liquorproteindiagnostik mit Messung des Liquor-Serum-Quotientens des Albumins und des Immunglobulins G und anschließender Interpretation durch das Reiber Diagramm durch die Liquoragarosegelelektrophorese erweitert werden. Hierdurch würden bis zu sieben Parameter mit ihren altersabhängigen Normalwerten für eine sensitivere Basisdiagnostik der Liquorproteine und somit zur Beurteilung der BLS-Funktion zur Verfügung stehen.

Hierfür könnte das hier vorgestellte Elektrophoresesystem auf ein kommerzielles System, wie zum Beispiel das der Firma Sebia, adaptiert werden. Die Elektrophoresetechnik hat gegenüber immunochemischen Methoden den Vorteil, dass ein reproduzierbares Bild der Liquorproteine zur Beurteilung der BLS - Funktion gewonnen wird. Sie nimmt jedoch mehr Zeit in Anspruch. Es muss beachtet werden, dass besonders zu der Beurteilung der Gammaglobulinfraktion mit der Fragestellung intrathekale Immunreaktion neben der Liquorelektrophorese eine Serumelektrophorese durchgeführt werden sollte.

Nach dem gleichen Prinzip der hier optimierten Zonenelektrophorese sollte auch ein quantitatives Verfahren für die isoelektrische Fokussierung entwickelt werden. Ziel hierbei wäre es, quantitative Proteinprofile der isoelektrischen Elektrophorese in verschiedenen pH-Bereichen zu generieren und diese bestimmten Erkrankungen zuzuordnen. Die Ergebnisse könnten weiter zur Klärung neurologischer Krankheiten genutzt werden. Vorversuche in unserem Labor zeigten, dass auch die IEF in Agarosegel quantitativ genutzt werden kann. Die Technik der Zonenelektrophorese und der IEF könnten miteinander oder mit anderen Techniken wie der Massenspektrometrie verbunden werden, um so genauere Informationen über einzelne Proteine/Proteingruppen zu erhalten.

Ziel bei allen elektrophoretischen Untersuchungen sollte es sein, ein reproduzierbares quantitatives Muster zu erhalten, umso Proteinprofile bestimmten Krankheiten zuzuordnen und Patienten genau im Verlauf ihrer Erkrankung beobachten zu können.

6 Zusammenfassung

Veränderungen der Proteinkonzentrationen des Liquors cerebrospinalis sind einerseits abhängig von physiologischen Faktoren wie Lebensalter und Abnahmeort, andererseits spiegeln sie pathologische Prozesse wider. Um diese pathologischen Vorgänge zu erkennen, wird ein Stufenprogramm, bestehend aus Erst-, Basis- und Spezialdiagnostik, zur Liquoranalytik eingesetzt.

Für die Basis- und Spezialdiagnostik der Liquorproteine stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Grundsätzlich kann man diese in immunochemische Methoden und elektrophoretische Techniken unterteilen. Die ersteren haben das Ziel Liquor-Serum-Quotienten zu bilden und damit die Funktion der Blut-Liquor-Schranke (BLS) zu beurteilen sowie erste Hinweise auf eine Produktion von Immunglobulin im ZNS - einer intrathekalen Immunreaktion - zu erhalten. Diese Methode wird heutzutage zur Basisdiagnostik der Liquorproteinanalyse angewandt. Elek-

trophoretische Techniken werden selten zur Untersuchung BLS – Funktion jedoch oft zur Diagnose der intrathekalen Immunreaktion genutzt.

In dieser Arbeit wird ein im Zuge dieser Arbeit optimiertes und hochauflösendes Liquoragarosegelelektrophoresesystem eingesetzt, mit dem es möglich ist, sechs Liquorproteine bzw. Proteingruppen quantitativ zu analysieren. Basis hierfür sind: Liquorproteinkonzentrierung ohne spezifischen Eiweißverlust, Reproduzierbarkeit aller Einzelschritte der Elektrophorese sowie lineare Proteinanfärbung mit computergesteuerter quantitativer optischer Auswertung mittels Hochgeschwindigkeitsdensitometrie und Gaußapproximierung.

Um die mögliche Bedeutung dieses optimierten Liquoragarosegelelektrophoresesystems für die Liquorprotein Basisdiagnostik neuropädiatrischer Erkrankungen zu untersuchen, wurden zunächst Normalwerte für die Liquorelektrophorese anhand von 202 Kindern ohne Erkrankungen, welche die Liquorproteine beeinflussen können, erstellt. Gesamteiweiß und die absolute Konzentration des Albumins und des γ -Globulins sanken stark von der Geburt bis zum siebten Lebensmonat ab. Ein Minimum wurde in einem Lebensalter von 1½ bis 5 Jahren erreicht. Danach stiegen die Konzentrationen dieser Proteine wieder an. Die γ -Globulin-Fraktion sank relativ bis zum 7. Lebensmonat ab und stieg dann wieder an. Die Albuminkonzentration zeigte hingegen einen relativen Abfall bis zu einem Lebensalter von ca. 3 Jahren. Der prozentuale Anteil des Transthyretins, der Transferrin-Fraktion und bedingt auch der α 2-Fraktion stieg bis zum 3. Lebensjahr an und fiel danach wieder ab. Absolut sank die Konzentration dieser Proteine bis zum Lebensalter von ca. 3 Jahren und stieg danach wieder an. Diese Veränderungen der Liquorproteine spiegeln physiologische Vorgänge, insbesondere Veränderungen der BLS-Funktion, des Liquorflusses und des Wachstums der Liquorräume in der Kindheit wider.

Die neu aufgestellten Normalwerte galten als Referenz und als Normalabgleich bei der Untersuchung von fünf Erkrankungen bzw. Erkrankungsgruppen, die in der Pädiatrie eine große Rolle spielen. Neu ist hierbei, dass sieben altersbezogene Liquorproteinwerte zur Diagnostik neuropädiatrischer Erkrankungen genutzt werden können. In der normalen immunchemischen Basisliquorproteindiagnostik werden lediglich das Gesamteiweiß, Albumin und IgG untersucht. Meist wird nur der Liquor-Serum-Quotient des Albumins altersbezogen zur Beurteilung der BLS-Funktion analysiert.

Alle hier untersuchten Krankheitsbilder unterschieden sich im Liquoragarosegelelektrophoresemuster. Gemeinsam waren dem GBS, der Neuroborreliose und der bakteriellen Meningitis eine Störung der BLS-Funktion mit einer starken absoluten Erhöhung der Proteine Albumin, α 2-Globuline, β 1- Globuline und Gammaglobuline gegenüber den Normalwerten. Proportional waren das Transthyretin, die β 1- und β 2-Globuline bei diesen drei Krankheiten erniedrigt. Abwei-

chend zeigt sich bei dem Guillain-Barré-Syndrom ein nicht von der Norm abweichendes absolutes Transthyretin und ein proportional und absolut am stärksten erhöhtes Gammaglobulin. Diese Konstellation könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Veränderungen der Liquorproteine ihren Ursprung in pathologischen Prozessen im Bereich der Spinalganglien haben. Dort könnte es zu einer lokalen lumbalen BLS-Störung und einem vermehrten Einstrom von Immunglobulinen aus den sich dort angesammelten Plasmazellen kommen. Indikator hierfür ist das fehlende Ansteigen der absoluten Transthyretinkonzentration und somit des Transthyretinanteils im Liquor aus dem Blut. Im Vergleich dazu zeigt die Neuroborreliose über den Befund der BLS-Störung hinaus eine absolute und proportionale Erhöhung der Gammaglobuline. Alle anderen Proteine inklusive des absoluten Transthyretins sind im Sinne einer BLS-Störung verändert. Dieses gibt einen starken Hinweis auf eine zentrale intrathekale Immunreaktion. Bei der bakteriellen Meningitis zeigt sich eine klassische BLS-Störung ohne relative Erhöhung des Immunglobulins G. Bei dem Guillain Barré Syndrom (GBS) konnten Unterschiede in den einzelnen Stadien der Erkrankung gefunden werden, die mit einer leichten BLS-Störungen und polyklonaler IgG Erhöhung begannen, in eine ausgeprägtere Form übergingen und trotz klinischer Besserung weiterhin andauerten. In der Gruppe der Kinder mit akuten Leukämien (Akute lymphatische Leukämie, Akute myeloische Leukämie, Leukämie bei lymphoblastischem Non-Hodgkin-Lymphom) wurden die relativen Veränderungen des Elektrophoreseproteinmuster im Verlauf Polychemotherapie untersucht. Die Liquorproteinveränderungen zeigten, dass die Therapieschritte der Polychemotherapie mit einer intrathekalen ZNS-Prophylaxe, während denen auch eine Glucocorticosteroidtherapie durchgeführt wurde, mit geringeren Störungen der BLS-Funktion einhergingen, als diejenigen Therapieschritte mit Polychemotherapie und intrathekaler ZNS-Prophylaxe, jedoch ohne Glucocorticosteroid. Der Therapieschritt Bestrahlung ging mit der stärksten Störung der BLS-Funktion einher. Veränderungen der Liquorproteine spiegelten sich im Gesamteiweiß sowie der Transthyretin- und der Albuminfraktion wider. Nicht erhöht war jedoch die γ -Globulinfraktion, da diese - in Abhängigkeit vom Serum IgG- durch die Leukämietherapie stark reduziert war.

Die Gruppe der Kinder mit Entwicklungsretardierung und radiologisch diagnostizierter Vergrößerung der Liquorräume zeigte leichte Veränderungen im Sinne einer „Verdichtung“ der Schrankenfunktion mit einer Zunahme der hauptsächlich im ZNS synthetisierten Proteine Transthyretin und τ -Protein. Fehlende Veränderungen der Gammaglobuline sprechen gegen eine subakute oder chronische entzündliche Genese der Erkrankung. Durch die Elektrophorese würde die Richtung der nachfolgenden Spezialuntersuchungen im Liquor vorgegeben werden.

Es wurde gezeigt, dass die Berücksichtigung des gesamten elektrophoretischen Proteinmusters mit seinen altersbezogenen Parametern Transthyretin, Albumin, alpha 2-Proteine, Transferrin, Tau-Fraktion und dem IgG relevante klinische Bedeutung für die Liquorbasisdiagnostik neuropädiatrischer Krankheiten gewinnen kann und zur Analyse BLS-Funktion genutzt werden könnte. Das herkömmliche Basisprogramm der Liquorproteindiagnostik könnte durch die Liquoragarosegelelektrophorese erweitert werden. Mit dieser präzisen Methode könnten sieben Parameter für die Basisdiagnostik neuropädiatrischer Erkrankung in Bezug auf ihre Altersnormalwerte genutzt werden. Der Kliniker hätte so ein Mehr an Informationen als Basis für seine Diagnose, um weitere Untersuchungen zu veranlassen und den Verlauf von Erkrankungen zu beurteilen.

Die Isoelektrische Fokussierung in Agarosegel könnte ebenfalls zu einem quantitativen Diagnosesystem weiterentwickelt werden und mit anderen Techniken wie der Massenspektrometrie verbunden werden.

Ziel aller elektrophoretischen Untersuchungen sollte es sein, reproduzierbare quantitative Proteinmuster zu erhalten, um so der Diagnose und der Verlaufsbeobachtung von neurologischen Krankheiten dienen zu können.

7 Literaturverzeichnis

Aldred AR, Dickson PW, Marely PD, Schreiber G: dem Gesamteiweiß Distribution of transferrin synthesis in brain and other tissues in the rat. *J. Biol Chem* 1987; 262: 5293-5297

Alper C, Johnson A: Immunofixation-electrophoresis a technique for the study of proteopolymorphism. *Vox Sang* 1969; 17: 445-452

Amtrop O: Transfer of ¹²⁵I albumin from blood into brain and cerebrospinal fluid in newborn and juvenile rats. *Acta Physiol.Scand.*1976; 96: 399 - 406

Asbury AK, Arnason BG, Adams RD: The inflammatory lesion in idiopathic polyneuritis. *Medicin* 1969; 48: 173 -215

Baber A, Lovato J, Hill G, McLean TW: Measurement of CSF protein is unnecessary in children with leukaemia. *Pediatr Blood Cancer* 2008; 51 (3): 428 - 30

Bachmann KD, Ewerbeck H, Joppich G, Kleihauer E, Rossi E, Stadler GR: Pädiatrie in Praxis und Klinik. Fischer/Thieme 1990; Normalwerte im Liquor

Barnard K, Herold R, Siemes H, Siegert M: Quantification of Cerebrospinal Fluid Proteins in Children by High-Resolution. *Journal of Child Neurology* 1998; 13: 51-58

Bell JE, Fryer AA, Collins M, Marshall T, Jones PW, Strange R, Hume R: Developmental profile of plasma proteins in human foetal cerebrospinal fluid and blood. *Neuropathology and applied Neurobiology* 1991; 17: 441-456

Biou D, Benoist JF, Huong CN, Morel P, Merchand M: Cerebrospinal Fluid Protein Concentration in Children: Age-related Values in Patients without Disorders of the Central Nervous System. *Clinical Chemistry* 2000; 46:3: 399-403

Blennow K, Friedman P, Wallin A, Gottfries CG, Skog I, Wiikhelso L, Svannelolm I: Protein analysis in CSF III: Relation of blood cerebrospinal fluid function for formulas

for quantitative determination of intrathecal IgG production. *Eur Neurol* 1993; 33 (2): 134-42

Bonate PL: Quantification of Albumin in Cerebrospinal fluid; *Analytic Biochemistry* 1988;175: 300-304

Brettschneider J, Claus A, Kassubeck J, Tumami H: Isolated blood-brain-barrier dysfunction, prevalence and associated diseases. *J. Neurol.* 2005; 252: 1067-73

Cavuoti D, Baskin L, Jialal I: detection of oligoclonal bands in cerebrospinal fluid by immunfixation electrophoresis. *American Journal of Clinical Pathology* 1998; 109: 585 - 8

Chrambach A: Advanced methods in the biological sciences. The practise of quantitative gel electrophoresis. VCH Verlagsgesellschaft 1985

Chiang HC, Lyu Rk, Tseng MY, Chang KH, Chang HS, Itsu WS et: Analysis of transthyretin concentration in the cerebrospinal fluid of patients with Guillain-Barré-Syndrom and other neurological disorders. *Clin Chim Acta* 2009; 405 (1-2): 143 -7

Christenson RH, Russell ME, Hassett BJ: Cerebrospinal fluid: Electrophoresis and methods for determining Immunglobulin G Compared. *Clin Biochem* 1989; 22: 429 - 432

Cotton F, Delobbe E, Gullis B: Assessment of a biuret method without concentration step for determination in CSF. *Clin Biochem* 1997; 30 (4): 313-14

D'Agunno S, Del Boccio P, Bernardini S, Bullone, Di Ilio C, Frederici G, Urbani A: Electrophoretic separation of cerebrospinal fluid proteins in clinical investigations. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45 (4): 437-49

Davson, Welch, Segal: *Physiology and Pathophysiology of the Cerebrospinal fluid*; Churchill Livingstone 1985

Depleche B, Lichtblau E: Etude quantitative de Immunglobulines G et de l' albumin du liquide cephalo rachidien. Clin Chim Acta 1872; 37:15-23

Dziegielewska K, Saunders N, Schegter E, Zakut H, Zevin-Senkin D, Zisling R, Soreg H, Synthesis of plasma proteins in foetal, adult and neoplastic human brain tissue. Dev Biol 1986; 115 (1): 93-104

Eeg-Olsson O, Link H, Wigertz A.: Concentration of the CSF proteins as a measure of blood brain barrier function and synthesis of IgG within the CNS in "normal" subjects from the age of 6 months to 30 years . Acta Paediatr Scand 1981;70: 167-170

Epstein D J, Neely WE: High Resolution Densitometry: Analysis of stained bands as a model for electrophoresis of serum proteins, Clin.Chem.1984; 30/6:847-850

Epinosa de los Monteros A: Does transferrin have a special role in the nervous system? J. of Neuroscience Research 1989; 24: 125-36

Epinosa de los Monteros A, Kumar S, Scully S et al: Transferrin gene expression and secretion by rat brain cells in vitro. J. Neurosci. Res. 1990; 25:25:576-580

Felgenhauer K: Protein size and cerebrospinal fluid composition. Klin Wochenschr 1974; 70: 289-95

Felgenhauer K, Beuche W: Labordiagnostik neurologischer Erkrankungen. Thieme Verlag 1999)

Fishman RA, Ransohoff J, Osserman EF. Factors influencing the concentration gradient of protein in cerebrospinal fluid. J Clin Invest 1958; 37: 1419-24

Fishman R: Cerebrospinal fluid in diseases of the nervous system, ed 2. Philadelphia, Saunders, 1992.

Forsberg P, Fryden A, link H: Ig abnormalities in CSF during bacterial Meningitis. J. Neuroimmunol. 1986; 12 (4): 299-310

Fortini AS, Sander EL, Weinshenker BG, Katzmann JA: Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in the diagnosis of multiple sclerosis. Isoelectric Focusing with IgG immunoblotting compared with high resolution gel electrophoresis. *Am J Clin Pathol* 2003; 120: 672 - 675

Friedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, Giovanni G, Grimsley G, Keir G et al: Recommended Standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *Arch Neurol.* 2005; 62 (6): 865 - 70

Fuchs A, Rosenthal R: Physikalisch-chemische, zytologische und anderweitige Untersuchungen des Liquors cerebrospinalis. *Wien.med.Presse* 1904; 45/44: 2081

Gailard M, Reichsberg S, Noguera C, Kilroe-Smith T: Differences in Elastase binding activity of α 1 protease inhibitor and α 2 macroGlobulin for asthmatic patients and control subjects with various α 1 protease inhibitor phenotypes. *Clin Chem* 1993; 39/4: 675-679

Gallo P, Bracco F, Morara S, Battistin L, Tavolato B: The CSF transferrin/ τ proteins. A study by two dimensional polyacrylamid gel electrophoresis (2D) and agarose gel isoelectric focusing (IEF) followed by double-antibody peroxidase labelling and avidin-biotin amplification. *J. Neurol. Sci.* 1985; 70 (1): 81 -92

Gama FG, Santana AE, Filho EC, Noguera CA: Agarose gel electrophoresis of cerebrospinal fluid proteins of dogs after sample concentration using membrane microconcentration technique. *Vet Clin Pathol* 2007; 36 (1): 85-88

Garton MJ, Keir G, Vijaya Lakshmi M, Thompson EJ: Age related changes in cerebrospinal fluid protein concentration. *Journal of Neurological Sciences* 1991; 104: 74-80

Gaut M, Elzer E, Gabe A: Prediction of haptoglobin and α 2 Macroglobulin concentration from electrophoretic patterns of α 2 Globulin. *Clin Chem* 1970; 16(11): 925-930

Gebicke-Haerter P, Bauer J, Brenner A, Gerck W: α 2 Macroglobulin synthesis in astrocyt subpopulation. *J. Neurochemistry* 1987; 49: 1139-1145

Gerbaut L, Ponsot G, Dulac O et al: The pattern of cerebrospinal fluid proteins in infants and children. Determination of normal values. Arch. Fr. Pediatr. 1981; 38: 3-9

Gerbaut I, Macart M: Is standardization more important than methodology for assay of total protein in cerebrospinal fluid? Clin.Chem. 1986; 32 :353-355

Goldmann EE: Die äußere und innere Sekretion des gesunden und kranken Organismus im Licht der vitalen Färbung. Beitr. Klin. Chir. 1909; 64: 192-265

Gonzalez - Quevedo A, Carriera RF, O'Farrill ZL, Luis IS, Becquer RM, Luis Gonzalez RS: An appraisal of blood cerebrospinal fluid barrier dysfunction during the course of Guillain-Barré-Syndrom. Neurol India 2009; 57 (3): 288 - 94

Greitz D, Greitz T, Hundmarsh T: A new view on the CSF-circulation with the potential for pharmacological treatment of childhood hydrocephalus. Acta Paediatr. 1997; 86:125-32

Griffin DE, Griffels J: Study of protein characteristics that influence entry into the cerebrospinal fluid of normal mice and mice with encephalitis. L Clin Invest 1982; 70: 289-95

Gruber W, Eder H, Kerbl R, Lackner H, Barnard K, Urban C: Opticusgliom: Liquoraszites bei ventrikuloperitonealem Shunt. Monatszeitschrift der Kinderheilkunde 1997; 145 (1): 26-29

Gruener N, Gozian O, Goldstein T, Davis J, Besner I, Iancu TC: Iron, Transferrin, and Ferritin in Cerebrospinal fluid of children. Clin Chem 1991; 37/2: 263-265

Hadden RDM, Gregson NA, Gold R, Smith KJ, Hughes RAC: Accumulation of immunoglobulin across the 'blood nerve barrier' in spinal roots in adoptive transfer experimental autoimmune neuritis. Neuropathol and Appl Neurobiol 2002; 28: 489-97

Hamann-Brand A, Breitner S, Schulze J, Brade V: Laboratory diagnosis of Lyme disease. Biotest Bulletin 1995; 5: 127-142

Hansen K, Lebech A-M: Lyme neuroborreliosis: a new sensitive diagnostic assay for intrathecal synthesis of *Borrelia burgdorferi*-specific immunoglobulins G, A and M. *Ann. Neurol.* 1991; 30: 197- 205

Häfli WE, Rieder HP, Kaeser HE: Perinatal relation of blood-cerebrospinal fluid barrier and its effect on protein composition of cerebrospinal fluid. *Monatsschr.Kinderheilk.* 1985; 133: 749-753

Heisel, Jürgen: *Neurologische Differentialdiagnose, Praxiswissen Halte- und Bewegungsapparat*; Georg Thieme Verlag; 2007

Hesselvik: An electrophoretical study of normal and pathological fluids. *Acta med. Scand.* 1939; 101: 461

Herbert J, Wilcox JN, Pham KT et al: Transthyretin: a choroid plexus-specific transport protein in human brain. *Neurology* 1986; 36:900-911

Hiraoka A, Toinaga I, Hori K: Sodium dodecylsulfate capillary gel electrophoretic measurement of the concentration ratios of albumin and $\alpha 2$ Macroglobulin in cerebrospinal fluid and serum of patients with neurological disorders. *J Chromatogr A* 2000; 895 (1-2): 339-44

Hirase T, Arseki S: CSF proteins in muscular dystrophy patients. *Brain Dev* 1984; 6: 10-16

Hühmer AF, Biringer RG, Amato H, Fontheh An, Harington MG: Protein analysis in human cerebrospinal fluid: Physiological aspects, current progress and future challenges. *Dis Markers* 2006; 22: (1-2) 3-26

Hung KL, Chang MT, Tsai-ML, Chen WC: Study on the concentration of cerebrospinal fluid immunoglobulin G and Albumin in children; *Acta Paediatr-Sin.* 1992,33(5):325.31

Isenberg H: *Meningitis im Kindesalter und Neugeborenen-Sepsis*, ed2. Darmstadt, Steinkopff 1990

Jin T, Hul S, Chang M, Wu J, Winbla UB, Zhu J: Proteomic identification of potential markers in cerebrospinal fluid of Guillan Barré Patients. *Eur J Neurol* 2007; 14 (5): 563 - 8

Joseph J, Bermes E: Comparison of protein values in CSF by nephelometry and radial immunodiffusion. *Annals of clinical and laboratory science* 1979; 9: 408-415

Kacher D, Kevenyl L, Lowenthal A in Kleine TO (Editor): *Neue Labormethoden für die Liquordiagnostik*. Thieme Verlag Stuttgart, New York, 1980: 44-60

Kafka V: Die ungefärbte und gefärbte Normomastixreaktion der Rückenmarksflüssigkeit. *Dtsch med Wschr* 1921;47:1422

Kanah Y, Ohara T, Kanoh M, Akahoshi T: Serum metalloproteinase 2 levels indicate blood- CSF barrier damage in patients with infectius meningitis. *Inflammation* 2008; 31 (2) 99-104

Keren DF, Di Sante AC, Bordine SL: Densitometric scanning of high-resolution electrophoresis of serum: methodology and clinical application. *Am. J. Clin. Pathol.* 1986;85: 348-352

Keir G, Barrio S, Thompson EJ: Discrepancies between qualitative and quantitative analysis of cerebrospinal fluid IgG: densitometric comparison of nephelometry silver versus immuno enzymes. *Ann Clin Biochem* 2008; 45: 404 -8

Keir G, Thompson EJ: Proteins as parameters in discrimination between different blood -CSF barriers. *J Neurol Sci* 1986; 75: 245-53

Kleinert T: *Elektrophoretische Methoden der Proteinanalytik*. Deutscher Verlag der Wissenschaften 1990

Korinthenberg R, Sauer M: Das Guillain-Barré-Syndrom im Kindesalter. *Monatsschr Kinderheilkd* 1992; 140: 792 - 798

Lange C: Über die Ausflockung von Goldsol durch Liquor cerebrospinalis. Berl klin Wschr 1912; 19: 879

Larsen PD, DeLallo: Cerebrospinal fluid transthyretin in the neonate and blood CSF barrier Permeability. Ann Neurology 1989; 25 (6): 628-30

Laurell C: Composition and Variation of the Gel Electrophoretic Fractions of Plasma, Cerebrospinal Fluid and Urine. Scand. J. clin. Lab. Invest. 1972; 29: 71-82

Laurell C: Quantitative estimation of proteins in agarose gel containing antibodies. Anal Biochem 1966; 15: 45

Le Cross Clark W: On the Pacchionion bodies. J Anat 1920; 55: 40-48

Lehmensiek V, Süßmuth SD, Brettschneider J, τscher G, Felt S, Gillardon T, Tumani H: Proteome analysis of cerebrospinal fluid in Guillain-Barré-Syndrom. J Neuroimmunol 2007; 185 (1-2): 190-4

Link, H: ImmunoGlobulin abnormalities in the Guillain-Barré-Syndrom. J.Neurol. 1973b; Sci.18: 11-23

Link, H: Demonstration of oligoclonal immunoGlobulin G in Guillain-Barré-Syndrome. Acta neurol. scand. 1975; 52:111

Logigian EL, Stere AC: Lyme borreliosis. In Lambert HP (ed): Infection of the central nervous system. Philadelphia, B.C. Decker, 1991, pp218- 228

Lott J, Warren P: Estimation of reference intervals for total protein in CSF. Clinical Chemistry 1989; 35 (8): 1766-1770

Lowenthal A, Crols R, De Schutter F, et al. : Cerebrospinal fluid proteins in neurology. Int Rev Neurobiol 1984 ; 25: 95-138

Lowenthal A: Agar gel electrophoresis in neurology. Elsevier Publishing Company, Amsterdam-New York-London 1964

Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R: Protein measurement with the folin phenol reagent; J Biol Chem 1951; 193: 265-275

Ludwig R, Kretzmann R., Burger R, Brandeis WE: Changes of the blood CSF barrier for Serum Proteins in Children with acute lymphoblastic Leukaemia. Klin Wochenschr 1987; 65: 76 -81

Luxton RW, Patel P, Keir G, Thompson EJ: A micro method for measuring total protein in cerebrospinal fluid by using benzethonium chloride in microtiter plate wells. Clin.Chem. 1989; 35: 1731-1734

Mancini G, Carbonara AO, Heremans IF: Immunochemical quantification of Antigens by sile radial immunodiffusion. Immunochemistry, Pergamon Pres 1965 Vol 2: 235

Michaelis L: Elektrische Überführung von Fermenten.1. Das Invertin. Biochem. Z. 1909; 16:81

Möricke A, Zimmermann M, Reiter A, Henze G, Schrauder A, Gadner H, Ludwig WD, Ritter J, Harbott J, Mann G, Klingebiel T, Zintl F, Niemeyer C, Kremens B, Niggli F, Niethammer D, Welte K, Stanulla M, Odenwald E, Riehm H, Schrappe M. Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. Leukemia. 2010 Feb; 24(2): 265-84.

Mollgard K, Saunders NR: The development of human blood-brain and blood CSF barriers. Neuropath and Appl Neurobiol 1986; 12: 3337 - 358

Mucci G, Rossi G, Bettini R, Montarano D, Gironelli L, Voci L, Bianchi F: Laser nephelometric evaluation of albumin, IgG and $\alpha 2$ Macroglobulin: Applications to the study of alterations of the blood-brain barrier. Journal of the neurological Sciences 1993; 118: 73 - 78

Mollgard K, Dziegielewska KM, Saunders NR, Zakut H, Soreq H: Synthesis and localization of plasmaproteins in the developing human brain. Integrity of the foetal

blood brain barrier to endogenous proteins of hepatic origin. *Dev-Biol.* 1988; 128 (1): 207-21

Neuhoff V, Stamm R, Pardowik I, Eckardt W, Taube D: Essential problems in quantification of proteins following colloid staining with Coomasi Brilliant Blue dyes on polyacrylamid gels and their solution. *Electrophoresis* 1990; 11:101-117

Nonne M, Appelt F: Über die fraktionierte Eiweißausfällung in der Spinalflüssigkeit von Gesunden, Luetikern, funktionell und organisch Nervenkranken und über ihre Verwertung zur Differentialdiagnose der Dementia paralytika, Tabes dorsalis, tertiären und abgelaufenen Syphilis. *Arch Neurol Psychiat* 1908; 43: 433-460

Ouchterlony O: Antigen-Antibody reactions in gels. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 1949; 26: 507

Pandy K: Über eine neue Eiweißprobe der Cerebrospinalflüssigkeit. *Neurol Zbl* 1910; 29: 915-919

Pearl GS, Mullins RE: α 1 Antitrypsin in Cerebrospinal fluid of patients with neurological diseases. *Archives of Neurology* 1985; 42: 775-777

Pohl P, Schmutzhard E, Stanek G: Cerebrospinal fluid findings in neurological manifestation of Lyme disease. *Zbl. Bakt. Hyg.* 1986; A 263: 314- 320

Prosiegel M, Neu S, Pelka R, Fateh-Moghadam A: Multivariate analysis of the serum-cerebrospinal fluid-protein-relation for the diagnosis of neurological diseases of the central nervous system. *Acta Neurol Scand.* 1983; 68: 405-412

Przyjalkowski W, Lipowski D, Kolasa T, Issa E, Olejnik Z: Blood-cerebrospinal fluid barrier in purulent cerebrospinal meningitis. *Neurologia i Neurochirurgia Polska* 1996; 30 (1): 39-48

Quincke H: Über die Lumbalpunktion. *Berl Klin Wochenschr* 1895; 32: 889-891

Reiber H, Felgenhauer K: Protein transfer at the blood cerebrospinal fluid barrier and quantification of the humoral immune response within the central nervous system. *Clin Chim Acta* 1987; 163: 319

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

Reiber H: External quality assessment in clinical neurochemistry: Survey of analysis for cerebrospinal fluid (CSF) proteins based on CSF/Serum quotients. *Clin Chem* 1995; 41: 256 -63

Renz H: *Integrative klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin*. Walter de Gruyter 2003

Rosenberg G, Dencoff J, Correa N, Ford C: Effect of steroids on CSF matrix metalloproteinases in multiple sclerosis: relation to blood brain barrier injury. *Neurology* 1996; 46 (6): 1926-32

Rust R., Jr, Dodson WE, Trotter JL.: Cerebrospinal Fluid IgG in Childhood: The Establishment of Reference Values. *Ann Neurol* 1988; 23:406-410

Saunders E, Clark RJ, Katzmann CJ: Cerebrospinal fluid leakage: Agarosegel electrophoresis detection of β_2 Transferrin and nephelometric quantification of β trace protein. *Clinical Chemistry* 2004; 50: 2401-03

Schlegel U.: *Neuroonkologie: Tumoren des Nervensystems im Kindesalter*. Georg Thieme Verlag 2003

Schreiber G, Aldred A.: Pathophysiological aspects of plasma protein formation in the choroid plexus. *Pathophysiology of the blood brain barrier - Fernstroem Foundation* B.B.Johansson, Elsevier

Schreiber G, Aldred RA: Origin and Function of proteins in the cerebrospinal fluid. *CNS Barriers and modern CSF diagnosis* 1993. VCH Publishers: 229 - 246

Schliep G, Felgenhauer K: The α 2 Macroglobulin level in Cerebrospinal fluid; a parameter for the condition of the Blood CSF-Barrier. *J. Neurol* 1974; 207: 171-181

Schmidt RM: *Der Liquor Cerebrospinalis*. Gustav Fischer Verlag 1987

Siegert M, Schützler G, Jarofke R: The effect of various stains on quantitative agarose-gel-electrophoresis: evaluation of the results with the aid of an analog computer. *Clin.Chim. Acta* 1976; 73: 423-430

Siegert M, Siemes H: Agarose Gel Electrophoresis of Cerebrospinal Fluid Proteins and Analysis of the Pherogram Profiles by Analog Computer. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1977; 15:635-644

Siegert M, Siemes H: Agarose gel electrophoresis of cerebrospinal fluid proteins and analysis of the pherogram profiles by analog computer. *J Clin. Chem. Cli. Biochem.* 1977; 15:635-644

Siemes H, Siegert M, Rating D: The relationship between age and the cerebrospinal fluid protein profile of normal children. Cellulose acetate and agarose gel electrophoric studies. *Neuropädiatrie* 1975;6:383-397

Siemes H, Trischler J, Paul F, Siegert M: Diagnose entzündlicher Erkrankungen des ZNS im Kindesalter mit Hilfe der Liquoreiweisselektrophorese. *Klin Paediatr* 1980;192:217-228

Siemes H, Rating D, Siegert M, Hanefeld F, Müller St, Gardner H, Riehm H: Changes of CSF-protein pattern in children with acute lymphoblastic leukemia during prophylactic CNS therapy (Berlin protocol). *Medical and Pediatric Oncology* 1980; 8: 25 - 34

Statz A, Felgenhauer K: Development of the Blood - CSF Barrier. *Dev Med Child Neurol* 1983; 152 -161

Steer AC: Lyme disease. *New England Journal of Medicine* 2001; 345: 115 -125

Takeoka T, Shinohara Y, Furumi K, Mori K.: Brain Res. 1980; 198: 147

Thompson EJ: The diagnostic significance of CSF analysis. CNS Barriers and modern CSF diagnosis 1993. VCH Publishers: 229 - 246

Thompson EJ, Keir G: Laboratory investigation of cerebrospinal fluid proteins. Ann Clin Biochem. 1990; 27:425-435

Tibbling G, Link H, Ohman S: Principles of albumin and IgG analyses in neurological diseases 1. Scand J. Clin Lab Invest 1977; 37: 385-90

Tourtelotte WW: On cerebrospinal fluid IgG quotients in multiple sclerosis and other diseases. A review and new formula to estimate the amount of IgG synthesized per day by the central nervous system. J. Neurol. Sci. 1970; 10: 279

Vedeler C, Make R, Nyland H: Ig in serums and CSF from patients with GBS. Acta Neurol Scand 1986; 73: 388-93

Vermes LM: Cerebrospinal fluid proteins: II. Normal values of protein fractions obtained by electrophoresis (variation related to race, sex and age). Arq. Neurol. 1983; 25: 152-161

Virji MA, Diven WF, Kelly RH: CSF α 2 macroGlobulin and C reactive protein as aids to rapid diagnosis of acute bacterial meningitis. Clinica Chimica Acta 1985; 148: 31- 37

Wallesch C W (Hrsg.): Neurologie: Diagnostik und Therapie in Klinik und Praxis; Elsevier GmbH: S. 109 -125

Warburton M, Coles B, Dundas S, Gusterson B, O'Hare M: Hydrocortison induces the synthesis of α 2 MacroGlobulin in rat mammary myoepithelial cells. Eur J Biochem 1993; 214: 803-809

Warburton M, Guterson B, O'Hare M: The synthesis of α 2 MacroGlobulin by rat mammary myoepithelial cells is regulated by a synergism between Glucocorticosteroids and cytokins; Federation of European biochemical societies FEBS 1993; 332 (1,2): 57-60

Weisner B., Bernhardt W.: Protein fractions of lumbar, cisternal and ventricular-cerebrospinal fluid. Journal of the Neurological Sciences 1978; 37:205-214

Weisner B, Kauerz U: The influence of the choroid plexus on the concentration of prealbumin in CSF. Journal of the Neurological Sciences 1983; 61: 27-35

Weisner B, Roethig HJ: The concentration of prealbumin in cerebrospinal fluid (CSF), indicator of CSF circulation disorders. Eur. Neurol. 1983; 22: 96-105

Wiederkehr F: Analysis of cerebrospinal fluid proteins by electrophoresis. J. Chromatogr. 1991; 569: 281-269

Wieme JR: Agar gel electrophoresis. Amsterdam/London/New York: Elsevier Publishing company, 1965

Wildemann B, Oschmann P, Reiber O: Neurologische Diagnostik 2006; Thieme Verlag

Wong M, Schlaggar BL, Buller RS, Stoch GA, Landt M: Cerebrospinal fluid protein concentration in pediatric patients: defining clinical relevant reference values. Arch Pediatr Adolesc Med 2000; 154 (8): 827-31

Yang YR, Liu L, Qin ZY, Ziu FJ, Qin YJ, Bai SM, Chen ZY: Comparative proteomics analysis of cerebrospinal fluid proteins with Guillain-Barré-Syndrom. Cell Mol Neurobiol 2008; 28 (5): 734- 44

Zettl U, Lahmitz R, Mix E: Klinische Liquordiagnostik 2005. Walter De Gruyter Verlag

8 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

9 Publikationen

Quantification of Cerebrospinal Fluid Proteins in Children by High-Resolution Agarose Gel Electrophoresis. Barnard K.; Herold R.; Siemes H.; Siegert M. Journal of Child Neurology 1998

Opticusgliom: Liquoraszites bei ventrikuloperitonealem Shunt. Gruber W.; Eder H.; Kerbl R.; Lackner H.; Barnard K. ; Urban C.: Monatszeitschrift der Kinderheilkunde 1997

Ascites after ventriculoperitoneal shunting associated with elevated CSF protein. Eder H.; Gruber W.; Leber K.; Barnard K.; Reikate H. BNI Quarterly 1997

10 Danksagung

Herzlich danke ich Herrn Prof. Dr. Siemes für die Überlassung des Themas und die andauernde Unterstützung und Beratung.

Besonders möchte ich Prof. Dr. Siegert, meinem Vater, für die jahrelange Zusammenarbeit in seinem Labor danken, ohne welche diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Außerdem möchte ich Herrn Dr. Ralf Herold für die Zusammenarbeit und Hilfe bei statistischen Auswertungen der Ergebnisse herzlich danken.

Herrn Schulz von der Björn Schulz Stiftung sei gedankt für die finanzielle Unterstützung des Labors.

11 Selbstständigkeitserklärung

Erklärung

„Ich, Karin Barnard, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Optimierung der Liquorproteinelektrophorese in Agarosegel. Mögliche Bedeutung für die Diagnose neuropädiatrischer Erkrankungen; selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum 20.10.2010

Unterschrift