

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin II

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz

Nachweis von Antikörpern gegen zentrales Nervensystem
(ZNS) bei Patienten mit Kollagenerkrankungen und
Charakterisierung der entsprechenden Targetantigene

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Julia Daniela Durban

aus Pforzheim

2013

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Klein

2. Berichterstatter: Professor Dr. A. Melms

Meinen Eltern und Großeltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Autoimmunkrankheiten	1
1.1.1	Allgemeine Mechanismen der Autoimmunerkrankungen	2
1.1.2	Selbsttoleranz vs. Autoreaktivität	2
1.1.3	Pathogenese von Autoimmunkrankheiten	4
1.1.4	Ausgewählte Autoimmunerkrankungen	4
	1.1.4.1 Kollagenosen	4
	1.1.4.1.1 Systemischer Lupus Erythematoses	5
	1.1.4.1.2 Sjögren-Syndrom	6
	1.1.4.1.3 Sharp-Syndrom	6
	1.1.4.2 Vaskulitis	6
	1.1.4.3 Primär-biliäre Zirrhose	7
	1.1.4.4 Fibromyalgie-Syndrom	7
1.2	ZNS-Beteiligung	7
1.3	Fragestellung	10
2	Patienten, Material und Methoden	11
2.1	Patienten	11
2.2	Materialien	13
2.2.1	Labormaterialien	13
2.2.2	Geräte	13
2.2.3	Prokaryontische Zellen (Bakterien)	14
2.2.4	Plasmide	14
2.2.5	Zellkulturmedien für Bakterien und Lösungen	14
2.2.6	Chemikalien und Reagenzien	15

2.2.7	Pufferansätze und Lösungen	16
2.2.7.1	Puffer für die Reinigung Histidin-markierter Proteine an Ni-NTA Matrices	16
2.2.7.2	Puffer für ELISA	17
2.2.7.3	Western Blot-Puffer	17
2.2.8	Antikörper	18
2.3	Methoden	18
2.3.1	Antigengewinnung	18
2.3.1.1	ZNS	18
2.3.1.2	Rekombinantes α -Tubulin	18
2.3.1.3	Rekombinantes K-Alpha-1 Tubulin	19
2.3.2	Proteinbestimmung nach Bradford	20
2.3.3	ELISA (Enzyme linked Immuno Sorbent Assay)	20
2.3.3.1	Testprinzip und Durchführung	20
2.3.3.2	Standardisierung ELISA	21
2.3.4	Gelelektrophorese und Immunoblotting	22
2.3.4.1	Gelelektrophorese	22
2.3.4.2	Transfer	22
2.3.4.3	Inkubation mit Patientenserum	22
2.3.4.4	Inkubation mit Mono- und Polyklonalen Antikörpern	23
2.3.4.5	Darstellung der 6xHis-Tag Proteine im Western Blot	23
2.3.4.6	Amidoschwarzfärbung	24
2.3.5	Molekulargewichtsbestimmung	24
2.3.6	Elektroelution	24

3	Ergebnisse	25
3.1	Detektion des in Bakterien produzierten rekombinanten α -Tubulins im Western Blot mit Ni-NTA Konjugat	25
3.2	Bestimmung des Molekulargewichtes	26
3.3	Darstellung von ZNS-Antigenen im Western Blot	27
3.4	Western Blot	29
3.4.1	Western Blot mit 100 000 g ZNS Überstand	30
3.4.2	Western Blot mit rekombinantem α -Tubulin aus Bakterien	33
3.4.3	Western Blot mit Eluierten Banden aus dem 100 000 g ZNS-Überstand	34
3.5	ELISA	36
3.5.1	Nachweis von Antikörpern im ELISA unter Verwendung der eluierten Banden aus 100 000 g ZNS-Überstand als Antigene	36
3.5.1.1	Häufigkeit von Antikörpern bei allen Patienten	36
3.5.1.2	Häufigkeit von Antikörpern bei Patienten mit PET Untersuchung und gesicherter ZNS Beteiligung	40
3.5.2	Häufigkeit von Antikörpern gegen das rekombinante kommerzielle K-Alpha-1-Tubulin	41
3.6	Korrelation zwischen Western Blot und Elisa	42
3.7	Sequenzierung	45

4	Diskussion	47
4.1	Methodik	47
4.2	Western Blot	47
4.2.1	α- Tubulin	47
4.2.2	Ergebnisse Western Blot	48
4.3	Ergebnisse ELISA	49
4.4	Korrelation Ergebnisse ELISA / Western Blot	49
4.5	Sequenzierung	50
4.5.1	MAP	50
4.5.2	NA/ K+ ATPase Alpha 1	51
4.6	Schlussfolgerung	52
5	Zusammenfassung	54
6	Literaturverzeichnis	57
7	Abkürzungsverzeichnis	65
8	Abstract	67
9	Danksagung	69
10	Lebenslauf	70

1 EINLEITUNG

1.1 Autoimmunkrankheiten

Unter dem Begriff Autoimmunkrankheiten werden chronische nicht-infektiöse entzündliche Erkrankungen zusammengefasst, die mit autoreaktiven T- und/oder B-Zellen einhergehen. Sie betreffen bevorzugt das weibliche Geschlecht. Autoimmunerkrankungen werden in folgende drei Gruppen unterteilt: Systemische Autoimmunopathien, vorwiegend lokalisierte Autoimmunopathien mit systemischer Komponente (Mischformen) und organspezifische Autoimmunopathien.

Die Ätiologie dieser Erkrankungen ist noch weitgehend ungeklärt, man hat jedoch festgestellt, dass neben umweltbedingten [83] auch immungenetische Faktoren eine Rolle spielen und die einzelnen Autoimmunerkrankungen mit bestimmten MHC-Typen assoziiert sind [51]. Die Gene des Major Histocompatibility Complex sind auf Chromosom 6 lokalisiert und codieren für die Histokompatibilitätsantigene des Menschen, die auf der Oberfläche fast aller Zellen vorkommen, das sogenannte HLA System (human leucocyte antigen system). Die MHC-Klasse-I-Gene kodieren für HLA-A-, -B-, -C-, -H- und –CG1-Moleküle, die auf allen Körperzellen vorkommen. MHC-Moleküle dieser Klasse präsentieren endogene Proteine der Zelle den CD8⁺-T-Zellen. Die MHC-Klasse-II-Gene kodieren für HLA-DR-, -DP- und –DQ-Moleküle und werden auf den Zellen des Immunsystems exprimiert. Diese Klasse an MHC-Molekülen präsentiert durch APC exogen aufgenommene und in Phagolysosomen zerkleinerte Proteine den CD4⁺-T-Helferzellen. Jean Dausset gewann 1980 für die Beschreibung des Major Histocompatibility Complex den Nobelpreis [22].

1.1.1 Allgemeine Mechanismen der Autoimmunerkrankungen

Für die physiologische Funktion des Immunsystems ist die Toleranz gegen körpereigene Antigene von großer Bedeutung. Frank M. Burnet, ein australischer Mediziner, erhielt 1960 zusammen mit dem Engländer Peter Brian Medawar den Nobelpreis für Physiologie/Medizin „für ihre Entdeckung der erworbenen immunologischen Toleranz“ [14] [53].

Im Gegensatz dazu greift der Körper bei den Autoimmunopathien eigene „Antigene“ aufgrund mangelnder Selbsttoleranz an. Dieses Szenario schloss Paul Ehrlich ursprünglich aus, er benannte es „horror autotoxicus“ [66]. Es hat sich gezeigt, dass sowohl autoreaktive B-Zellen und ihre Antikörper, sowie auch T-Zellen für die Pathogenese verantwortlich sind und dass bei einer Autoimmunreaktion, genauso wie bei einer normalen Immunreaktion, viele verschiedene Prozesse und Effektoren des Immunsystems beteiligt sind [64].

Bei protektiven Immunreaktionen wird das pathogene Antigen eliminiert und die Reaktion kommt zum Stillstand. Da bei Autoimmunreaktionen die körpereigenen Antigene unbegrenzt vorhanden sind, bleibt die Immunreaktion chronisch erhalten.

1.1.2 Selbsttoleranz vs. Autoreaktivität

Die Entwicklung der Selbsttoleranz im menschlichen Körper findet zuerst zentral in den primären lymphatischen Organen statt, welche für die meisten T-Zellen der Thymus und für die meisten B-Zellen das Knochenmark ist, sowie danach peripher in den sekundären lymphatischen Organen und im Blut.

Zwischen 20% und 50% der T-Zell- und B-Zell-Rezeptoren, die mit VDJ Rekombination generiert wurden, binden mit einer potentiell gefährlichen Affinität an ein Selbstantigen [29]. Es hat sich gezeigt, dass im Falle eines autoreaktiven Lymphozyten-Rezeptors vier mögliche Bewältigungsstrategien zur Verfügung stehen [29].

Erstens, bindet der Lymphozyt Selbst-Antigene, folgt die klonale Deletion, meistens durch Apoptose, dieser autoreaktiven Zelle [15].

Zweitens kann aber auch der autoreaktive Rezeptor durch weitere Rekombination so verändert werden, dass er nicht mehr selbstreaktiv ist [16, 55].

T-Zellen unterscheiden sich von B-Zellen unter anderem darin, dass sie Peptid-Fragmente, die ihnen über MHC-Moleküle der APC präsentiert werden, erkennen müssen. B-Zellen wiederum erkennen das native Antigen. Aus diesem Grund werden T-Zellen im Thymus zusätzlich zur negativen Selektion auch einer positiven Selektion unterzogen, d.h. nur die T-Zellen, die das passende MHC Molekül auf der Thymusepithelzelle mit einer korrekten Bindungsstärke erkennen und nicht gegen Autoantigene gerichtet sind, reifen aus und gelangen als funktionsfähige Lymphozyten in die Zirkulation [45, 68, 69]. Eine Studie [10] hat jedoch gezeigt, dass 25-40% der selbst-reaktiven T-Lymphozyten der negativen Selektion entgehen können und somit wahrscheinlich nur die sehr stark selbst-reaktiven T-Zellen im Thymus eliminiert werden.

Drittens können intrinsische biochemische und Veränderungen der Genexpression die Fähigkeit der autoreaktiven Zelle herabsetzen, auf Selbst-Antigene zu reagieren; dieser Zustand ist als Anergie bekannt [29, 61]. Das vierte potentielle Schicksal von autoreaktiven Zellen ist der Status der immunologischen Ignoranz. Mittels extrinsischer Kontrollmechanismen, die die essentiellen Wachstumsfaktoren, Kostimuli, inflammatorische Mediatoren und andere Faktoren limitieren, und durch die aktive Suppression durch regulatorische T-Zellen reagieren diese Lymphozyten vorerst nicht autoreaktiv [29].

Trotz der vielen Mechanismen, die zur Unterscheidung zwischen Selbst- und Fremd-Antigen beitragen sollen, ist der Prozess der Selbsttoleranzentwicklung fehleranfällig. Dies ist der Preis der Balance zwischen Immunität, d.h. dem Schutz vor Krankheiten, und Selbsttoleranz. Deshalb kann es geschehen, dass körpereigenes Gewebe als pathogen identifiziert wird, und dies kann zur Entstehung einer Autoimmunerkrankung führen [28].

1.1.3 Pathogenese von Autoimmunkrankheiten

Die Mechanismen der Gewebsverletzungen bei vorliegender Autoimmunität können mit Hilfe des Schemas für Hypersensibilitätsreaktionen eingeordnet werden, mit dem Unterschied, dass die Typ I IgE vermittelte Immunantwort bei Autoimmunreaktionen keine große Rolle spielt. Bei Typ II vermittelten Autoimmunantworten reagieren IgG oder IgM Antikörper mit Zelloberflächen- oder Matrixantigenen. In einem anderen Fall von Autoimmunität, der Typ III Reaktion, werden Immunkomplexe aus Autoantikörpern und löslichen Autoantigenen gebildet. Typ IV Reaktionen werden durch T-Zell vermittelte Gewebeschäden verursacht. Bei den meisten Autoimmunkrankheiten sind mehrere Mechanismen für den Defekt verantwortlich.

1.1.4 Ausgewählte Autoimmunerkrankungen

1.1.4.1 Kollagenosen

Die zum Formenkreis der rheumatoiden Erkrankungen gehörenden Kollagenosen umfassen eine Krankheitsgruppe systemischer Autoimmunerkrankungen mit chronisch entzündlichen Prozessen, vorwiegend an Bindegewebe und Blutgefäßen. Untergruppen sind der Systemische Lupus erythematoses (SLE), das Sjögren-Syndrom (SS), das Antiphospholipidsyndrom, die systemische Sklerose (PSS), die Dermato- und Polymyositis (DM/PM) sowie die Overlap-Syndrome (mixed connective tissue disease [MCTD]) und die undifferenzierten Kollagenosen (undifferentiated connective tissue disease [UCTD]). Den meisten rheumatischen Erkrankungen fehlt ein einzelnes spezielles Merkmal zur Diagnosestellung und so werden sie gewöhnlich durch die Kombination von klinischen und laborchemischen Ergebnissen identifiziert [75].

1.1.4.1.1 *Systemischer Lupus Erythematodes*

Der Systemische Lupus Erythematodes ist eine Multisystemerkrankung der Haut und der Gefäße zahlreicher Organe, verbunden mit Immunkomplexablagerungen. In der Geschichte des SLE wurde zuerst die Hautveränderung beschrieben, später wurden die verursachten Organmanifestationen entdeckt. Die 1948 von Dr. Malcolm Hargraves entdeckte LE-Zelle [33] galt bis in die 60er Jahre als der diagnostische Marker für den SLE, bis Holman und Kunkel im Jahre 1957 auf der Suche nach der Ursache für die LE-Zellen-Bildung Immunglobuline gegen Zellkernstrukturen fanden [37]. Im weiteren Verlauf wurden die beim SLE vorkommenden Untergruppen der antinukleären AK entdeckt: Antikörper gegen Doppelstrang-DNS und extrahierbare nukleäre Antigene (ENA). Spezifische AK für den SLE sind Anti-dsDNS-AK und Anti-Sm-AK [70]. Des Weiteren können Anti-nRNP-AK [36] und Anti-SSA/SSB AK [17, 50] vorkommen. Da der SLE mit einer verstärkten B-Zell-Stimulation einhergeht [48], ist es möglich, dass noch eine Vielzahl anderer Autoantikörper vorliegt, wie z.B. gegen Phospholipide, zelluläre Blutbestandteile und ZNS-Antigene.

Der Systemische Lupus erythematodes kommt weltweit in territorial unterschiedlicher Häufigkeit vor. Die Erkrankung hat eine Inzidenz von ca. 1,8-7,6/ 100 000 und eine Prävalenz von ca. 12,5-50/ 100 000. Frauen erkranken 10-mal häufiger als Männer. Das Prädilektionsalter liegt zwischen dem 15. und 30. Lebensjahr.

Die elf Diagnosekriterien des ACR (American College of Rheumatology) für den SLE, von denen mindestens vier erfüllt sein müssen, beinhalten Hautveränderungen (Schmetterlingserythem, discoide Hautveränderungen, Photosensitivität), orale/nasale Ulzerationen, nichterosive Arthritis, Serositis, Nierenerkrankungen, neurologische Erkrankungen, hämatologische Erkrankungen (hämolytische Anämie, Leukozytopenie, Thrombozytopenie), immunologische Laborveränderungen (Anti-dsDNS-AK, Anti-Sm-AK, Antiphospholipidantikörper), und antinukleäre Antikörper im

Immunfloreszenztest [35, 71]. Trotzdem ergeben sich aufgrund des vielfältigen klinischen Erscheinungsbildes und der wechselhaften Symptomatik je nach Aktivitätszustand oft Schwierigkeiten bei der Diagnosestellung, vor allem zu Beginn der Erkrankung [27]. Aktuell sind für das Management des SLE neue Leitlinien erarbeitet worden [6].

1.1.4.1.2 *Sjögren-Syndrom*

Das Sjögren-Syndrom ist eine chronisch-progressive Autoimmunerkrankung der exokrinen Drüsen und wurde nach dem Augenarzt Henrik Sjögren benannt (1899-1986), der intensive Studien zur Keratokonjunktivitis sicca betrieb.

Neben seiner primären Form findet sich das SS auch als sekundäre Erkrankung bei einer Vielzahl weiterer Autoimmunerkrankungen. Des Weiteren existiert eine nicht-autoimmune Sicca-Symptomatik bei weiteren Erkrankungen.

Die sechs Diagnosekriterien für SS beinhalten klinische Befunde wie Keratokonjunktivitis sicca und Xerostomie, Funktionsteste die Sicca-Symptomatik betreffend, histologische Biopsiefunde (Lippenspeicheldrüsenbiopsie) [21] und Nachweis von Anti-SSA(Ro)- und/oder Anti-SSB(LA) Antigenen [75].

1.1.4.1.3 *Sharp-Syndrom*

Gordon C. Sharp beschrieb 1972 das Sharp-Syndrom, welches er als „mixed collagen disorder“ bezeichnete. Das klinische Bild bietet eine Überlappungssymptomatik aus SLE, Sklerodermie und Polymyositis [62]. Typisch für diese Erkrankung ist der Nachweis von Antikörpern gegen Ribonukleoproteine [63].

1.1.4.2 Vaskulitis

Unter dem Begriff Vaskulitis versteht man immunreaktiv ausgelöste Gefäßentzündungen. Es kommt zur Schädigung der beteiligten Organe. Nach der Chapel Hill Consensus Conference von 1992 werden die primären Vaskulitiden je nach Gefäßbeteiligung in 3 Gruppen eingeteilt: kleine, mittelgroße oder große Gefäße.

1.1.4.3 Primär-biliäre Zirrhose

Der Begriff PBC steht für primär-biliäre Zirrhose und beschreibt das Spätstadium einer chronischen nichteitrigen destruierenden Cholangitis. Bei fast allen Patienten treten antimitochondriale Antikörper auf, insbesondere Anti-M2 ist spezifisch für die PBC [5, 41].

1.1.4.4 Fibromyalgie-Syndrom

Das Fibromyalgie-Syndrom (FMS) wird laut des „American College of Rheumatology“ diagnostiziert durch ausgedehnte Muskelschmerzen in Kombination mit erhöhter Druckschmerzhaftigkeit mindestens 11 der spezifischen 18 “tender points” [80]. Die gängigen Labor und Röntgenuntersuchungen sind unauffällig. Es fällt jedoch auf, dass zum Teil eine beträchtliche Erhöhung der Substanz P im Liquor cerebrospinalis [59] sowie eine Erniedrigung von Serotonin und Tryptophan in Serum und Liquor auftritt [84]. Eine 1992 durchgeführte Studie zeigte bei 74 % der getesteten Patienten Antikörper gegen Serotonin und Ganglioside [43].

1.2 ZNS-Beteiligung

Eine neuropsychiatrische Beteiligung bei Patienten mit SLE wurde bereits 1872 von M. Kaposi beschrieben [39]. Inzwischen haben mehrere Studien bei Patienten mit SLE und anderen Kollagenosen ein gehäuftes Auftreten neuropsychiatrischer Veränderungen gezeigt. In älterer Literatur werden je nach Diagnosekriterien in 10 – 80 % der Patienten mit SLE ein Auftreten neuropsychiatrischer Symptome beschrieben [12, 25, 38, 65, 81]. Im Jahre 1999 wurden vom American College of Rheumatology 19 neuropsychiatrische Manifestationsformen bei SLE klassifiziert, sowie Empfehlungen für deren Diagnostik herausgegeben [1].

EINLEITUNG

Jedoch trotz ACR Klassifikation findet sich immer noch eine große Spannweite der Prävalenz von NPSLE [9]. Eine Schwierigkeit besteht auch darin, zwischen primären und sekundären Ursachen für die Beteiligung des Nervensystems zu unterscheiden. Manche Studien behaupten, dass 50-80 % der neurologischen Probleme von sekundären Faktoren verursacht werden. Diese Faktoren sind Infektionen, metabolische Komplikationen, Hypertension sowie toxische Effekte der Therapie [31, 81].

Das Vorkommen verschiedener Autoantikörper bei Patienten mit neuropsychiatrischem SLE hat die Aufmerksamkeit auf einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten spezifischer Antikörper und Beteiligung des Nervensystems gerichtet [30]. Es werden verschiedene Gruppen von Autoantikörpern bei NPSLE unterschieden, Antikörper gegen neuronale Strukturen, Antikörper gegen endotheliale Strukturen und Autoantikörper gegen ubiquitäre Zellkomponenten (Tab. 1) [19].

Tabelle 1: Autoantikörper bei NPSLE [19]

Neuronale Antikörper	Ganglioside Neurofilamente Mikrotubuli assoziiertes Protein Gliales fibrilläres Protein NMDA Rezeptor
Endotheliale Antikörper	NEDD5
Antikörper gegen ubiquitäre Zellkomponenten	Triosephosphate Isomerase SSA/Ro Sm Histone Ribosomal Protein P Phospholipide

Inwieweit die einzelnen Autoantikörper eine pathogenetische Relevanz bei neuropsychiatrischem Lupus haben, lässt sich noch nicht mit vollständiger Sicherheit sagen [85].

Anti-Gangliosid Antikörper (AGA) scheinen nicht spezifisch für NPSLE zu sein und kommen auch bei anderen Neuropathien vor [49]. Während in einigen Studien übereinstimmend nicht von einer Korrelation zwischen dem Auftreten von AGA und NPSLE ausgegangen wird [24, 77, 86], zeigt eine große multizentrische Studie andere Ergebnisse. Galeazzi et al gehen von einem Zusammenhang zwischen AGA IgG und Migräne, Demenz, peripherer Neuropathie, sowie AGA IgM und Depression aus [26].

Ein erhöhtes Auftreten von Autoantikörper gegen Neurofilamente wurde bei Patienten mit NPSLE festgestellt. Insbesondere Neurofilament Proteine mit 205 und 160 kD wurden als Antigene identifiziert [58].

Das Vorkommen von Mikrotubuli-assoziiertem-Protein 2 (MAP2) ist auf Neurone begrenzt. MAP2-Autoantikörper wurden im Serum von Patienten mit NPSLE entdeckt [79].

Antiphospholipid Antikörper scheinen das Risiko von Schlaganfällen, Krampfanfällen und abnormen MRT Befunden zu erhöhen [3, 20, 72]. Kontrovers diskutiert wird der Zusammenhang zwischen psychiatrischen Manifestationen bei SLE Patienten und dem Auftreten von Antiribosomalen P Protein Antikörpern [23, 40].

1.3 Fragestellung

Klein et al beschrieben 1991 das Auftreten organspezifischer Antikörper gegen Antigene aus dem zentralen Nervensystem bei Patienten mit Kollagenosen. Als ZNS Antigene wurden vier Hauptdeterminanten mit einem Molekulargewicht von 29, 48, 56, 68 kD sowie sechs Nebendeterminanten mit einem Molekulargewicht von 130, 110, 86, 60, 38, 34 kD identifiziert. Alle Epitope außer der 38 kD Determinante waren organspezifisch. Die Anti-ZNS-Antikörper wurden mit Hilfe von Western Blot und ELISA in Seren und Liquor von Patienten mit Kollagenerkrankungen nachgewiesen und korrelierten eng mit dem Auftreten einer ZNS Beteiligung bei diesen Patienten [42]. Eines der Zielantigene konnte mittlerweile als α -Tubulin identifiziert werden [54], die anderen Targetantigene sind noch nicht bekannt. Ziel der hier vorliegenden Arbeit ist die Charakterisierung möglicher ZNS-Antigene sowie die Untersuchung der Korrelation zwischen dem Auftreten von ZNS-Autoantikörper und klinisch neuropsychiatrischer Manifestationen bei Patienten mit verschiedenen Kollagenerkrankungen unter besonderer Berücksichtigung des SLE.

2 Patienten, Material und Methoden

2.1 Patienten

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Seren von 74 Patienten im Western Blot und 112 Patienten im ELISA untersucht (Tab. 2 und 3). Von den 74 im Western Blot untersuchten Patienten entwickelten 16 eine zerebrale Manifestation im Verlauf und sechs Patienten wiesen zum Zeitpunkt der Untersuchung eine ZNS-Beteiligung auf. Im ELISA wiesen von insgesamt 112 untersuchten Patienten 41 eine ZNS-Beteiligung zum Zeitpunkt der Untersuchung auf, ein Patient entwickelte eine ZNS-Manifestation im Verlauf.

Es wurden Seren von Patienten der Universitätsklinik Tübingen sowie Patientenserum der Universitätsklinik Freiburg (Prof. Dr. H. H. Peter/ PD Dr. S.M. Weiner) verwendet. Als Kontrollgruppe dienten 30 gesunde Blutspender, die nicht an einer Kollagenose erkrankt sind sowie Patienten ohne ZNS-AK. Die Seren der gesunden Blutspender wurden freundlicherweise von Frau Prof. Dr. med. Dorothee Wernet (Transfusionsmedizin UK Tübingen) zur Verfügung gestellt. Die Seren wurden bei mindestens -20°C aufbewahrt.

Tabelle 2: Western Blot : Alters- und Geschlechtsverteilung der Patientengruppen

Diagnose	n Patienten	Geschlecht		Alter zum Zeitpunkt der BE in Jahren		
		m	w	Jüngster Patient	Ältester Patient	Durchschnittsalter
SLE	46	4	42	11	80	42,96
Sjögren	4	1	3	23	77	47,25
Sharp	9	1	8	19	72	44,56
Vaskulitis	11	3	8	23	77	45,64
PBC	2	0	2	60	63	61,5
FMS	2	1	1	43	57	50
Gesamt	74	10	64	-	-	48,65

Tabelle 3: ELISA: Alters- und Geschlechtsverteilung der Patientengruppen

Diagnose	n Patienten	Geschlecht		Alter zum Zeitpunkt der BE in Jahren		
		m	w	Jüngster Patient	Ältester Patient	Durchschnittsalter
SLE	81	9	72	15	80	42,63
Sjögren	10	1	9	23	81	46,3
Sharp	13	1	12	19	72	46,69
Vaskulitis	3	1	2	41	77	53,66
PBC	2	0	2	60	63	61,5
FMS	3	0	3	43	61	48
Gesunde	30	8	22	22	67	46
Gesamt	142	20	122	-	-	49,25

2.2 Materialien

2.2.1 Labormaterialien

- Beckman ultra-clear™ centrifuge tubes (Beckman, Palo Alto, CA, USA)
- Blue Max™, 50 ml (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)
- Chromatography paper 3MM Chr (Whatman® Int., Maidstone, England)
- Cuvettes 10x4x45 mm (Sarstedt, Nümbrecht)
- Hitplates (NUNC™ Brand Products, Roskilde, Dänemark)
- Hybond™-c-super; supported pure nitrocellulose membrane (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Bucks, UK)
- Immuno Plates Maxi Sorp™ Surface (NUNC™ Brand Products, Roskilde, Dänemark)
- PapPen® Liquid Blocker (SCI Science Services, München)
- Pasteurpipetten Plastibrand® (Brand GmbH, Wertheim)
- Reaktionsgefäße mit Deckel 1,5 ml (Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen)
- Reaktionsgefäße ohne Deckel 1,5 ml (Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen)
- Test tubes 14/100 (Greiner-Bio one GmbH, Frickenhausen)
- Wallac Sample Bags 1205-411 (Wallac, Turcu, Finnland)

2.2.2 Geräte

- Branson Sonifier B-12 (Branson Sonic Power, Danbury, Conn., USA)
- Electro-Eluter Model 422 (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- Electrophoresis Power Supply EPS 500/400 (Pharmacia)
- Elisa-Reader: SLT Rainbow (SLT LabInstruments, Österreich), Software: Easybase (SLT Instruments, Crailsheim)
- Gel-Dokumentationsanlage BioDoc (Biometra®, Göttingen)
- Heat Sealer LKB Wallac (Wallac, Turku, Finnland)
- Lyophilisator Hetosicc FD 2.5 (Heto Lab Equipment, Allerød, Dänemark)

- Mini Trans-Blot[®] Cell (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- Mini-Protean[®] 3 Electrophoresis Cell (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- Mini-Protean[®] Multi-Casting Chamber (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- Mixer Ultra turrax (Janke und Kunkel, Staufen)
- pH-Meter (Wissenschaftlich-technische Werkstätten)
- Pipetboy IBS (Integra Biosciences)
- Schüttler SM 25 (Edmund Bühler Laborgerätebau, Tübingen)
- Sorvall-Centrifuge RC-5-Superspeed Refrigerated (DuPont Instruments)
- Spectrophotometer Ultraspec III (Pharmacia LKB)
- Ultracentrifuge TGA (Kontron[®] Instruments)
- Waage 5g - 820g (Sartorius, Göttingen)
- Waage, fein: Mettler H20T 0,001g-160g (Mettler-Waagen GmbH, Gießen)

2.2.3 Prokaryontische Zellen (Bakterien)

- E.coli M15 (pREP4):
Genotyp: K-12 NaI^S, Str^S, Rif^S, Thi⁻, Lac⁻, Ara⁺, Gal⁺, Mtl⁻, F⁻, RecA⁺,
Uvr⁺, Ion⁺, lacI^q, p15A replicin (Kan^R)

2.2.4 Plasmide

- pQE-30 UA: UA-Klonierung, Expressionsvektor, N-terminaler Poly (His)₆, Amp^R, 3462 bp
- pREP4: Expression des lac-Repressionsproteins, Kan^R, 2580 bp

2.2.5 Zellkulturmedien für Bakterien und Lösungen

- Luria-Bertani Broth (LB): 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Bacto-Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, pH 7

- LB-Agarplatten: LB + 15 g/l Bacto-Agar
- Kanamycin Stamm-Lösung: 25 mg/ml
- Ampicillin Stamm-Lösung: 100 mg/ml
- IPTG: 238 mg/ml

2.2.6 Chemikalien und Reagenzien

- AEC- (3-Amino-9-Ethylcarbazole-) Tabletten (SIGMA[®]-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- Agarose NEEO (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- Ammonium persulfate, analytical grade (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg)
- Ammoniumbicarbonate (NH_4HCO_3) (SIGMA[®]-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- Bovines Serum Albumin (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
- Citronensäure-Monohydrat ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\text{H}_2\text{O}$) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- Coomassie[®] Brilliant Blue G-250 (Serva, Heidelberg)
- Dimethylformamid research grade (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg)
- Essigsäure 100% wasserfrei (Merck, Darmstadt)
- Glycerin 87% zur Analyse (Merck, Darmstadt)
- Glycin (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- IPTG (Isopropyl β -D-Thiogalactopyranoside) (Applichem, Darmstadt)
- Kaleidoscope Prestained Standards (Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA)
- Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) (Merck, Darmstadt)
- Methanol (CH_3OH), reinst (Merck, Darmstadt)
- Natriumacetat-Trihydrat (CH_3COONa) (Merck, Darmstadt)
- Natriumcarbonat (Na_2CO_3) (Merck, Darmstadt)
- Natriumchlorid (NaCl) (Merck, Darmstadt)
- Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) (Merck, Darmstadt)

2.2.7.2 Puffer für ELISA

- Serumverdünnungspuffer 60mM PBS plus BSA
- Bicarbonatpuffer 0,2 M, pH 9,6
- Citratpuffer 0,1M , pH 5,0
- ELISA-Waschpuffer 1 PBS, 60mM, pH 7,4 plus 0,5% BSA
- ELISA-Waschpuffer 2 WP 1 plus 0,2% Triton X 100

2.2.7.3 Western Blot-Puffer

- Elektrodenpuffer 5 g SDS, 30,25 g Tris, 112,50 g Glycin, pH 8,3
- Transferpuffer 2 g SDS, 12,12 g Tris, 57,64 g Glycin,
1600 ml Methanol, pH 8,3
- Westernblot Waschpuffer 60 mM PBS (pH 7,4), plus 0,25 % Rinder-
albumin plus 0,25%Tween[®]
- BSA-Puffer 60 mM PBS, pH 7,4 plus 3% Rinderalbumin
(BSA)
- Coomassie-Blue Färbung 25% Methanol, 10% konz. Essigsäure,
Coomassie Brilliant Blue R-250
- Gel-Entfärbelösung: 65% Aqua dest., 25% Methanol, 10% konz.
Essigsäure
- Mercaptoethanolpuffer 80mM Tris (pH 6,7), 4% SDS, 10% Mercapto-
ethanol, 20% Glycerol, 0,004% Bromphenol-
blau
- PBS-Puffer 60 mM, pH 7,4
- Proteinelutionspuffer 50 mM Ammoniumbicarbonatpuffer plus 0,1 %
SDS
- SDS-Lösung 10 %
- Trispuffer 10 mMol; pH 7,4
- Trispuffer 3 M (HCl) ; pH 8,9
- Trispuffer: 1 M (pH 6,8) (HCl)

2.2.8 Antikörper

- Anti-Tubulin, Kaninchen (SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- Anti- α -Tubulin, Maus, monoklonal (SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- Anti- β -Tubulin, Maus, monoklonal (SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- Anti-MAP2, Maus, monoklonal (SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- Anti-Maus Immunglobulin/HRP, Kaninchen, polyklonal (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark)
- Anti-Kaninchen Immunglobulin/HRP, Schwein, polyklonal (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark)
- Anti-Human IgG/HRP, Kaninchen, polyklonal (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark)
- Anti-Human IgM/HRP, Kaninchen, polyklonal (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark)

2.3 Methoden

2.3.1 Antigengewinnung

2.3.1.1 ZNS

Mitochondrien, Mikrosomen und ein 100 000 g Überstand wurden nach einer Standardmethode [42] aus frischem Rindergehirn hergestellt. Der 100 000 g Überstand (SN) wurde für die Experimente dieser Arbeit verwendet.

2.3.1.2 Rekombinantes α -Tubulin

Der verwendete E.coli Bakterienstamm, freundlicherweise von Herrn Dr. Mathias Ndhlovu zur Verfügung gestellt, enthält einen Vektor mit der gewünschten Sequenz des α -Tubulins. Der benutzte Vektor basiert auf dem T5

Promotor Transkription System und gehört zur Familie der pDS-Plasmide [13]. Die Proteinsequenz ist N-terminal durch einen Histidin Anhänger (6xHis-tagged) markiert (aus dem Handbuch des Herstellers Qiagen).

Die Bakterien, gelagert bei -70°C , wurden unter sterilen Bedingungen auf einer Agar Platte, bestehend aus LB-Nährmedium, Ampicillin und Kanamycin, ausgesät. Nach 24h Wachstum bei 37°C wurde eine Bakterienkolonie in flüssiges LB Nährmedium überführt, welches wiederum Ampicillin und Kanamycin im Verhältnis 1:1000 enthielt, und über Nacht unter konstantem Schütteln bei 37°C weiter vermehrt. Um die Bakterien noch weiter zu vermehren, wurden wieder LB Nährmedium und die entsprechenden Antibiotika zugesetzt.

Nachdem die Kultur im Photometer eine optische Dichte von 0,5-0,7 bei einer Wellenlänge von 595 nm erreicht hatte, wurde die Expression des Vektors mithilfe von IPTG (1:1000) induziert. Die Zellen wurden nach weiteren 5 h Wachstumszeit durch Zentrifugation vom Überstand getrennt, daraufhin in Lysepuffer resuspendiert und durch Ultraschall lysiert. Zelluläre Trümmer wurden durch Zentrifugation entfernt und der Überstand auf die mit Lysepuffer equilibrierten Ni-NTA spin columns geladen. Diese Matrizen binden das mit 6xHis-Tag markierte rekomb. α -Tubulin, indem Nickel-Nitrilotriacetic Acid vier der sechs Bindungsstellen des Nickel-Ions besetzt und zwei Stellen freilässt für den 6xHis-Tag. Nach weiteren Zentrifugationschritten wurden die Durchflüsse 1 und 2 gesammelt und nach zwei weiteren Zentrifugationen mit Waschpuffer die Durchflüsse 3 und 4. Das Protein wurde mit Hilfe von Elutionspuffer und Zentrifugation aus der Matrix herausgelöst und man erhielt die Eluate 1, 2 und 3.

2.3.1.3 Rekombinantes K-Alpha-1 Tubulin

Rekombinantes K-alpha-1 Tubulin, in einem Bakterien-Expressionsystem hergestellt, wurde von der Firma Abnova erworben. Es besitzt ein Molekulargewicht von 75,72 kD und entspricht dem gesamten α -Tubulin mit einem GST-Tag.

2.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmungen des 100 000 g ZNS-Gewebe Überstandes erfolgten nach der Bradford-Methode [11]. Als Reagenzlösung wurde BIOQUANT[®]-Reagenz verwendet, die Proben wurden bei 595 nm in Plexiglasküvetten im Spectrophotometer Ultraspec III gemessen. Mit Hilfe von Verdünnungsreihen mit BSA wurde eine Eichkurve angefertigt. Die Messproben bestanden je aus 50 µl Probelösung und 2,5 ml BIOQUANT[®] Protein-Reagenz. Die Standardlösung beinhaltete 50 µl bidestilliertes Wasser und 2,5 ml BIOQUANT[®] Protein-Reagenz.

2.3.3 ELISA (Enzyme linked Immuno Sorbent Assay)

2.3.3.1 Testprinzip und Durchführung

- I. Beschichtung der Mikrotiterplatten mit 100 µl/ well der mit Bicarbonatpuffer verdünnten Antigene (Antigenverdünnung).
- II. Inkubation der befüllten Platten 16-24 h bei 4°C, um die Antigene an die Polystyroloberfläche der Mikrotiterplatte zu fixieren.
- III. Viermaliges Waschen der Platten in ELISA- Waschpuffer 1, um überschüssiges freies Antigen zu entfernen und noch freie Bindungsstellen zu blockieren.
- IV. Waschpuffer für mind. 15 min bei RT einwirken lassen.
- V. Pipettierung der Serumendverdünnung, 100 µl/ well, im Serum ist bei positivem Befund der primäre Antikörper enthalten und bildet einen Immunkomplex mit dem fixierten Antigen.
- VI. Nach 90 min Inkubationszeit bei RT werden die überzähligen AK durch 4x Waschen mit ELISA-Waschpuffer 2 entfernt.
- VII. Waschpuffer 2 für mind. 15 min bei RT einwirken lassen.

- VIII. Zugabe (100 µl/ well) der sekundären mit Peroxidase konjugierten Antikörper (Anti-IgM u. Anti-IgG), welche spezifisch an den primären Antikörper binden können - 60 min bei RT inkubieren lassen.
- IX. Nochmaliges Waschen der Platten in ELISA-WP 2, 15 min einwirken lassen.
- X. Zugabe von 150 µl/ well Substratlösung, die durch das Enzym des sekundären AK abgebaut wird.
- XI. Abstoppen des Farbumschlages mit 50 µl/ well Schwefelsäure (25%).
- XII. Photometrische Messung der Extinktion im ELISA-Reader bei 450 nm.

2.3.3.2 Standardisierung ELISA

Die zu testenden Seren wurden 1:1071 verdünnt, da sich diese Verdünnung im Routinelabor zum Nachweis von ZNS-Autoantikörpern bewährt hat.

Der 100 000 g Überstand der Rinderhirnpräparation wurde in einer Konzentration von 10 µg/ml verwendet, bei den aus ZNS-Gewebe eluierten Banden wurden 200 µl pro Elisa-Platte eingesetzt. Bei dem Eluat der rekomb. Bakterien wurden 100 µl pro Platte und bei den eluierten Banden des rekomb. α - Tubulins 100 µl pro Platte benutzt. Das gekaufte rekomb. K-alpha-1-Protein wurde mit einer Konzentration von 10 µg/ 10 ml eingesetzt.

Als positive Kontrollen wurden Patientenseren mit positiven ZNS-Autoantikörpern verwendet. Des Weiteren wurden die Seren von 30 gesunden Blutspendern getestet, um Normalwerte, d.h. Mittelwerte und Standardabweichungen, festzulegen. Messwerte größer als der Mittelwert plus zweifache Standardabweichung wurden als grenzwertig positiv, Messwerte größer als der Mittelwert plus dreifache Standardabweichung wurden als positiv eingestuft. Die verschiedenen Elisa Versuchsreihen wurden, um ein vergleichbares Ergebnis zu erhalten, auf positive Kontrollwerte bezogen und danach im Verhältnis umgerechnet.

2.3.4 Gelelektrophorese und Immunoblotting

2.3.4.1 Gelelektrophorese

Die SDS-Elektrophorese wurde nach der Methode von Laemmli durchgeführt, wobei ein 3,7%iges Sammelgel und ein 10%iges Trenngel verwendet wurden [18].

Je nach gewünschtem Experiment wurden die Geltaschen mit 20 µl ZNS-Gewebe, 20 µl Eluat des rekomb. α -Tubulins oder 15 µl Molekulargewichtsmarker befüllt; die Antigene wurden zuvor 1:1 mit Mercaptoethanolpuffer verdünnt.

Die SDS-Gele wurden entweder direkt mit Coomasieblau G-250 angefärbt oder für die Übertragung der aufgetrennten Proteine auf Nitrozellulosefolien weiterverwendet.

2.3.4.2 Transfer

Nach der Elektrophorese wurden die Antigene vom Gel auf Nitrocellulose Folien übertragen. Hierfür wurden die Gele luftblasenfrei auf die Nitrozellulosefolie, zwischen in Transferpuffer getränkte Schwämme und Filterpapier, geschichtet.

In einer Transferkammer wurden die Proteine 60 Minuten lang bei 100 V unter Kühlung und Pufferzirkulation transferiert. Nach dem Transfer wurden die Nitrozellulosestreifen mindestens 2 Stunden mit 3%igem BSA-Puffer inkubiert.

2.3.4.3 Inkubation mit Patientenserum

Sowohl Kontroll- als auch Patientenseren wurden 1:50 mit Serumverdünnungspuffer verdünnt. Die antigenbeschichteten Nitrocellulosefolien wurden mit je 6 ml Verdünnung über 45 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert.

Nach Waschen in Western Blot Waschpuffer wurden die Folien mit 1:200 verdünnten Peroxidase konjugierten monospezifischen Anti-Humanen IgG und

IgM Antikörpern für 30 Min. auf dem Schüttler bei RT inkubiert. Auf einen weiteren Waschschrift folgte die Anfärbung mit 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol (AEC), die Substratumwandlung wurde mit 7% Essigsäure abgestoppt.

Als Kontrolle auf Unspezifität wurde eine Membran nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert.

2.3.4.4 Inkubation mit Mono- und Polyklonalen Antikörpern

Die monoklonalen AK aus Mäusen bzw. die polyklonalen Antikörper aus Kaninchen wurden jeweils 1:100 mit Serumverdünungspuffer verdünnt, danach wurden die Nitrozellulosesheets mit der Verdünnung für 1h bei Raumtemperatur auf dem Rüttler inkubiert. Nach Waschen in Western Blot Waschpuffer wurden die Folien mit 1:200 verdünnten Peroxidase konjugierten monospezifischen Anti-Mouse bzw. Anti-Rabbit IgG und IgM Antikörpern für 1h auf dem Schüttler bei RT inkubiert. Auf einen weiteren Waschschrift folgte die Anfärbung mit 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol (AEC), die Substratumwandlung wurde mit 7% Essigsäure abgestoppt.

2.3.4.5 Darstellung der 6xHis-Tag Proteine im Western Blot

Das Gel wurde mit einem 6xHis-Tag Protein Molekulargewichtsmarker sowie den verschiedenen Durchflüssen und Eluaten des Prozesses der rekomb. α -Tubulin Gewinnung beladen. Nach der Gelelektrophorese und dem Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosefolie, erfolgen nach Herstellerhandbuch die weiteren Schritte. Nach 2x 10 min waschen der Nitrocellulosefolie in TBS Puffer wurde die Folie 1 h lang in 3% BSA in TBS Puffer inkubiert. Danach erfolgte 3x waschen für jeweils 10 min in TBS Puffer. Nun wurde die Folie für 1 h bei Raumtemperatur mit einem Ni-NTA Konjugat (1:1000 in TBS-Tween Puffer) inkubiert. Nach wiederum 3x 10 min waschen in TBS Puffer wurde die Reaktion mit HRP sichtbar gemacht und mit Aqua dest. abgestoppt.

2.3.4.6 Amidoschwarzfärbung

Die mit Western Blotting auf die Nitrozellulosefolie übertragenen Proteine der rekomb. α -Tubulin Gewinnung aus Bakterien wurden mit Hilfe einer Amidoschwarzfärbung sichtbar gemacht. Hierfür wurde eine 0,1%ige Lösung in 250 ml Aqua dest. 200 ml Methanol und 50 ml Essigsäure verwendet. Die Färbung wurde über 10 min durchgeführt, entfärbt wurde unter mehrfachem Wechsel der Lösung ohne Amidoschwarz.

2.3.5 **Molekulargewichtsbestimmung**

Die Molekulargewichte der einzelnen Proteinbanden wurden durch mehrmaliges Zuordnen der einzelnen Banden zu SDS-Page molekularen Gewichtsstandards (Bio-Rad) bestimmt.

Als Referenzproteine dienten folgende Marker:

Phosphorylase b 97 400 d, Serumalbumin 66 200 d, Ovalbumin 45 000 d, Karboanhydrase 31 000 d, Trypsinhibitor 21 500 d, Lysozym 14 400 d.

2.3.6 **Elektroelution**

Im Western Blot positive Determinanten wurden entsprechenden Proteinen in den Coomassie gefärbten Gelen zugeordnet.

Die durch Gelelektrophorese aufgetrennten Antigene wurden nach Färbung mit Coomasie-Blue aus dem Gel ausgeschnitten. Die Proteine wurden nach Anleitung des Herstellers im Bio-Rad Electro Eluter unter Verwendung eines 50 mM Ammoniumbikarbonatpuffers mit 0,1 % SDS bei 58 mA über 5 h eluiert.

Zur Verminderung der SDS Konzentration im Eluat wurde für weitere 30 min Elution der Puffer gegen SDS freien Elutionspuffer ausgetauscht.

Die eluierten Banden des 100 000 g ZNS-Überstands wurde als Bande 1, 2 und 3 im ELISA getestet. Die Eluate wurden hierfür lyophilisiert und danach mit ca. 200 μ l Aqua dest. resuspendiert.

3 Ergebnisse

3.1 Detektion des in Bakterien produzierten rekombinanten α -Tubulins im Western Blot mit Ni-NTA Konjugat

Das in Bakterien exprimierte rekombinante α -Tubulin wurde nach SDS-Elektrophorese und anschließendem Transfer auf Nitrozellulosestreifen im Western Blot dargestellt. Mit Hilfe des 6xHis Protein Molekulargewichtsmarkers ließen sich die Molekulargewichte der einzelnen Banden feststellen. Das rekomb. α -Tubulin befindet sich bei einem Molekulargewicht von ca. 50 kD (siehe Pfeilmarkierung) (Abb. 1).

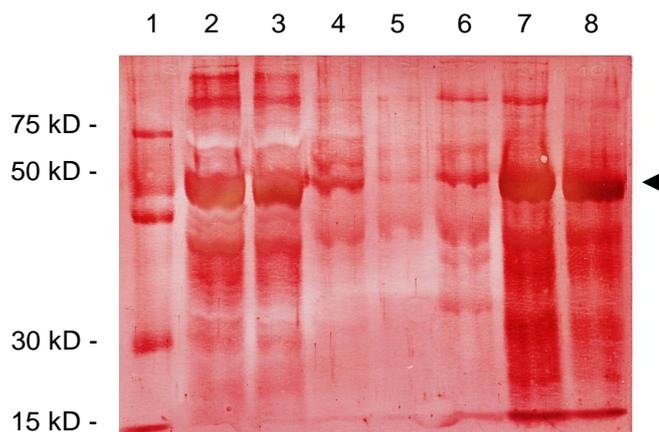


Abb. 1: Darstellung von rekombinatem α -Tubulin im Western Blot mittels Ni-NTA-Konjugat

lane 1: 6xHis Protein Ladder

lane 2 + 3: Durchflüsse 1, 2

lane 4 + 5: Durchflüsse 3, 4

lane 6 – 8: Eluate 1, 2 u. 3

3.2 Bestimmung des Molekulargewichtes

In Abb. 2 ist das rekomb. α -Tubulin nach Gelelektrophorese und anschließender Übertragung auf ein Nitrozellulosesheet dargestellt. Die Anfärbung wurde mit Amidoschwarz durchgeführt. Das rekomb. α -Tubulin befindet sich bei ca. 50 kD (siehe Pfeilmarkierung).

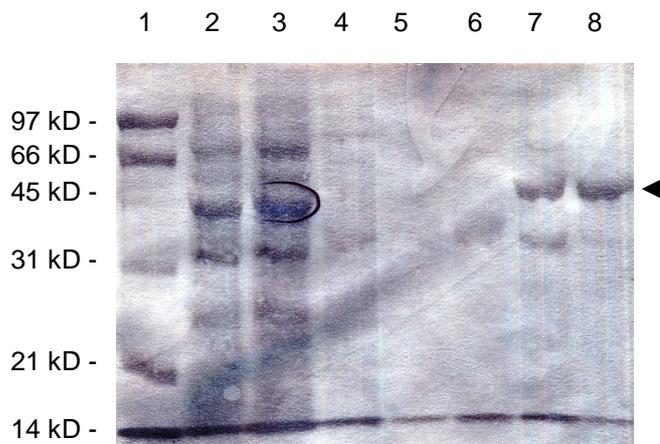


Abb. 2: Amidoschwarzgefärbtes rekomb. α -Tubulin nach Gelelektrophorese und anschließender Übertragung auf ein Nitrozellulosesheet

lane 1: MG-Marker

lane 2 + 3: Durchflüsse 1, 2

lane 4 + 5: Durchflüsse 3, 4

lane 6 – 8: Eluate 1, 2 u. 3

3.3 Darstellung von ZNS-Antigenen im Western Blot

Mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern wurden die zu untersuchenden Antigene identifiziert. Die Abb. 3-6 zeigen die Reaktionen der kommerziell erworbenen Anti-Tubulin-, α -Tubulin-, β -Tubulin- und MAP2-Antikörper gegen 100 000 g SN aus ZNS-Gewebe in lane 1 und rekomb. in Bakterien hergestelltem α -Tubulin in lane 2.



Abb. 3: Antigen Tubulin im Western Blot

lane 1: Reaktion 100 000 g SN mit Anti-Tubulin AK

lane 2: Reaktion rekomb. α -Tubulin mit Anti-Tubulin AK

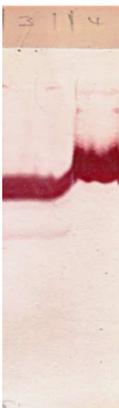


Abb. 4: Antigen α -Tubulin im Western Blot

lane 1: Reaktion 100 000 g SN mit Anti- α -Tubulin AK

lane 2: Reaktion rekomb. α -Tubulin mit Anti- α -Tubulin AK



Abb. 5: Antigen β -Tubulin im Western Blot

lane 1: Reaktion 100 000 g SN mit Anti- β -Tubulin AK

lane 2: Reaktion rekomb. α -Tubulin mit Anti- β -Tubulin AK



Abb. 6: Antigen MAP2 im Western Blot

lane 1: Reaktion 100 000 g SN mit Anti-MAP2 AK

lane 2: Reaktion rekomb. α -Tubulin mit Anti-MAP2 AK

3.4. Western Blot

Die Seren wurden im Western Blot gegen den 100 000 g Überstand des ZNS-Gewebes sowie teilweise gegen rekombinantes α -Tubulin aus Bakterien getestet. In Abb. 7 ist ein Western Blot mit kommerziell hergestelltem Anti- α -Tubulin-AK in Sheet 1 und die Reaktion derselben Antigene, 100 000 g SN aus ZNS-Gewebe und rekomb. α -Tubulin, gegen ZNS-AK positives Patientenserum in Sheet 2 dargestellt.

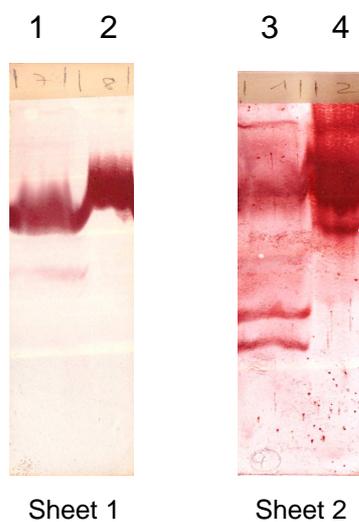


Abb. 7: Western Blot Beispiel mit den Antigenen 100 000 g SN und rekomb. α -Tubulin gegen Anti- α -Tubulin AK (sheet 1) und ZNS-AK positives Serum (sheet 2)

- | | | |
|----------|--------|--|
| Sheet 1: | lane 1 | 100 000 g SN gegen Anti- α -Tubulin AK |
| | lane 2 | rekomb. α -Tubulin gegen Anti- α -Tubulin AK |
| Sheet 2: | lane 3 | 100 000 g SN gegen ZNS-AK positives Serum |
| | lane 4 | rekomb. α -Tubulin gegen ZNS-AK positives Serum |

3.4.1 Western Blot mit 100 000 g ZNS Überstand

Seren von 74 Patienten mit verschiedenen Erkrankungen wurden im Western Blot gegen den 100 000 g SN aus ZNS-Gewebe getestet (Tab. 4). Von den fünf getesteten Seren gesunder Blutspender zeigte keines Reaktionen gegen 100 000 g SN im Western Blot.

Bei 29 der 74 Patienten waren Antikörper gegen Proteine bei ca. 50 kD , d.h. auf Höhe des rekomb. α -Tubulins, nachweisbar (Abb. 8). Des Weiteren hatten 36 der 74 Patienten Antikörper gegen Proteine mit einem Molekulargewicht von >50 kD, v. a. bei ca. 66 und 97 kD, sowie gegen ein Protein am Übergang von Trenn- und Sammelgel (Abb. 9). Seren von 42 der 74 Patienten reagierten mit Proteinen mit einem Molekulargewicht von < 50 kD.

Von den sechs Patienten mit bekannter ZNS Manifestation hatten zwei (33,3%) Antikörper gegen ein Antigen mit einem Molekulargewicht von > 50 kD und drei (50%) gegen ein Antigen mit einem MG von < 50 kD. 16,6 % der Patienten mit bekannter ZNS Beteiligung zeigten Reaktionen bei 50 kD, d.h. auf Höhe des α -Tubulins. Seren von Patienten, bei denen im Verlauf der Erkrankung eine ZNS-Manifestation auftrat, reagierten zu 50% positiv bei Proteinen mit einem MG > 50 kD, zu 68,8 % mit Proteinen mit einem MG von < 50 kD und zu 37,5% mit einem Antigen bei 50 kD.

ERGEBNISSE

Tabelle 4: Reaktivität von Seren von 74 Patienten mit verschiedenen Erkrankungen mit einem 100.000g SN aus ZNS-Gewebe im Western Blot

Erkrankung	n Patienten	Insgesamt n Patienten mit pos. Reaktion		Banden > 50 kD		Banden bei 50 kD		Banden < 50 kD	
		n	%	n	%	n	%	n	%
SLE ohne bekannte ZNS Beteiligung	28	24	85,7	10	35,7	11	39,3	17	60,7
SLE mit ZNS Beteiligung	5	3	60	2	40	1	20	2	40
SLE mit ZNS Beteiligung im Verlauf	13	11	84,6	7	53,8	4	30,8	10	76,9
Sjögren ohne bekannte ZNS Beteiligung	3	2	66,6	2	66,6	0	0	1	33,3
Sjögren mit ZNS Beteiligung im Verlauf	1	1	100	0	0	1	100	0	0
Sharp ohne bekannte ZNS Beteiligung	6	5	83,3	4	66,6	3	50	3	50
Sharp mit ZNS-Beteiligung	1	1	100	0	0	0	0	1	100
Sharp mit ZNS Beteiligung im Verlauf	2	2	100	1	50	1	50	1	50
Vaskulitis ohne bek. ZNS Btlg.	11	8	72,7	6	54,5	5	45,5	4	36,4
PBC ohne bek. ZNS Btlg.	2	2	100	2	100	1	50	2	100
FMS ohne bek. ZNS Btlg.	2	2	100	2	100	2	100	1	50
Gesamtanzahl	74	61	82,4	36	48,6	29	39,2	42	56,8

ERGEBNISSE

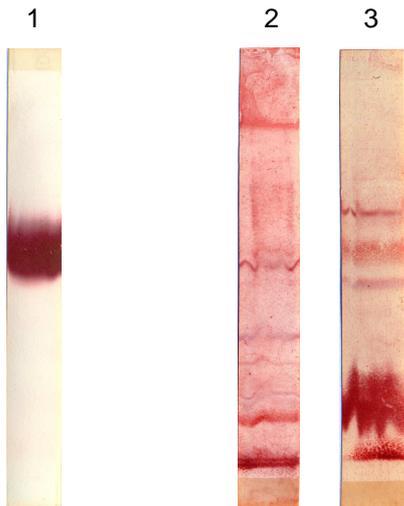


Abb. 8: Western Blot 100 000 g SN mit Banden bei 50 kD

Sheet 1: 100 000 g ZNS-SN gegen Anti- α - Tubulin AK

Sheet 2: 100 000 g ZNS-SN gegen Serum eines SLE Patienten

Sheet 3: 100 000 g ZNS-SN gegen Serum eines SLE Patienten

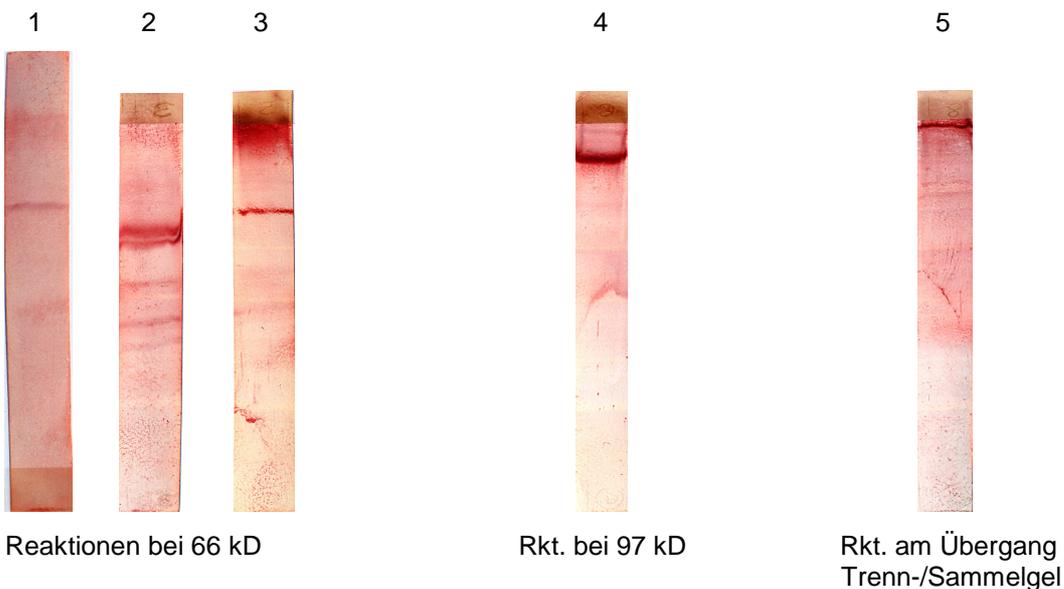


Abb. 9: 100 000 g ZNS-SN gegen ZNS-AK positive Patientenserum

Sheet 1: Patient mit Sharp Erkrankung und pos. Reaktion bei 66 kD

Sheet 2: Patient mit SLE Erkrankung und pos. Reaktion bei 66 kD

Sheet 3: Patient mit Vaskulitis Erkrankung und positiver Reaktion bei 66 kD

Sheet 4: Patient mit Vaskulitis Erkrankung und positiver Reaktion bei 97 kD

Sheet 5: Patient mit FMS und pos. Reaktion am Übergang Trenn- / Sammelgel

3.4.2 Western Blot mit rekombinantem α -Tubulin aus Bakterien

Vierundvierzig Seren von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen wurden im Western Blot gegen das rekombinante in Bakterien exprimierte α -Tubulin getestet. Zwölf wiesen eine positive Reaktion im Bereich des α -Tubulins bei 50 kD auf (Tab. 5). Banden mit einem Molekulargewicht größer 50 kD wurden mit Seren von 18 Patienten gefunden, 22 Seren reagierten mit Antigenen mit einem Molekulargewicht kleiner als 50 kD. Von diesen 44 Patienten war bei 2 Patienten eine ZNS Manifestation und bei 4 Patienten eine ZNS Manifestation im Verlauf bekannt. Die Patienten mit bekannter ZNS Manifestation zeigten eine positive Reaktion bei 50 kD und zwei positive Reaktionen bei einem MG < 50 kD. Die vier Patienten mit bekannter ZNS Manifestation im Verlauf zeigten lediglich Reaktionen mit Proteinen mit einem MG > 50 kD.

Tabelle 5: Häufigkeit von Antikörpern gegen rekomb. α -Tubulin in Seren von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen im Western Blot

Erkrankung	n Patienten	Insgesamt n Patienten mit pos. Reaktion		Banden > 50 kD		Banden bei 50 kD		Banden < 50 kD	
		n	%	n	%	n	%	n	%
SLE ohne bekannte ZNS Beteiligung	18	15	83,3	8	44,4	5	22,2	11	61,1
SLE mit ZNS Beteiligung	2	1	50	0	0	1	50	2	100
SLE mit ZNS Beteiligung im Verlauf	4	4	100	4	100	0	0	0	0
Sjögren ohne bek. ZNS Btlg.	2	2	4	1	50	1	50	0	0
Sharp ohne bek. ZNS Btlg.	3	2	66,6	1	33,3	0	0	1	33,3
Vaskulitis ohne bek. ZNS Btlg.	11	8	72,7	3	27,3	4	36,4	8	72,7
PBC ohne bek. ZNS Btlg.	2	1	50	0	0	1	50	0	0
FMS ohne bek. ZNS Btlg.	2	1	50	1	50	0	0	0	0
Gesamtanzahl	44	34	77,3	18	40,9	12	27,3	22	50

3.4.3 Western Blot mit eluierten Banden aus dem 100 000 g ZNS-Überstand

Um die in den Western Blots mit Patientenseren häufig auftretenden Banden näher zu bestimmen wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten, eluiert, gefriergetrocknet und erneut einer Gelelektrophorese unterzogen.

In Abb. 10 wird das Ergebnis der Gelelektrophorese mit nachfolgendem Blot der Bande bei ca. 50 kD gezeigt. Die Reaktion der eluierten Bande mit dem Anti- α - Tubulin AK ist deutlich zu sehen. Auch der Blot mit Patientenserum zeigt eine Reaktion mit der betreffenden eluierten Bande.

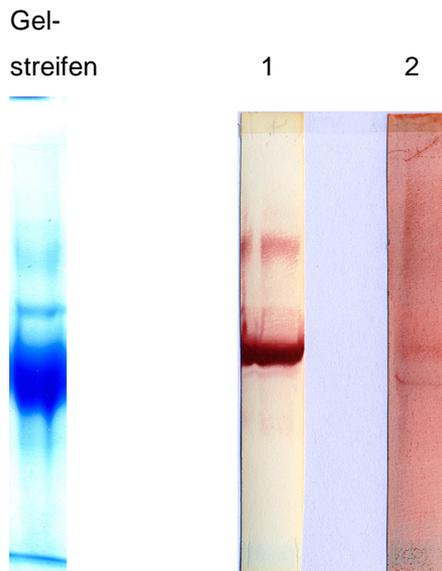


Abb. 10: Gelstreifen mit eluierter Bande (50 kD) aus 100 000 g SN mit den zugehörigen Sheets:

Sheet 1 mit Anti- α - Tubulin AK

Sheet 2 mit Serum einer SLE Patientin mit ZNS Autoantikörpern

ERGEBNISSE

Abb. 11 zeigt das Ergebnis der Gelelektrophorese mit nachfolgendem Blot der Bande (B1) zwischen Trenn- und Sammelgel. Die eluierten Bande zeigt eine Reaktion mit dem Anti-MAP2-AK.

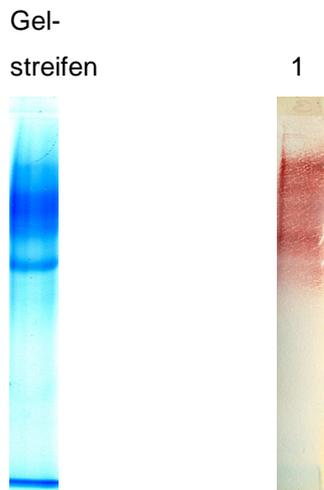


Abb. 11: Gelstreifen mit eluierter Bande (zwischen Sammel- und Trenngel) aus 100 000 g SN sowie das zugehörige Sheet 1 mit dem Anti-MAP2-AK

3.5. ELISA

3.5.1 **Nachweis von Antikörpern im ELISA unter Verwendung der eluierten Banden aus 100 000 g ZNS-Überstand als Antigene**

Um die im Western Blot mit 100 000 g SN aufgefallenen Proteine mit einem Molekulargewicht von mehr als 50 kD näher zu untersuchen, wurden die entsprechenden Banden aus dem 100 000 g SN Gel ausgeschnitten und eluiert und im ELISA gegen Patientenserum getestet. Bande 1 (MAP1/2) zwischen Sammel- und Trenngel, Bande 2 bei 97 kD und Bande 3 bei 66 kD.

3.5.1.1 Häufigkeit von Antikörpern bei allen Patienten

Insgesamt wurden 112 Patienten im ELISA getestet, hiervon 41 an einer Kollagenose erkrankte Patienten mit dokumentierter ZNS-Beteiligung (Tab. 6 - 8). Zu den ZNS Manifestationen gehörten Depression, Polyneuropathie, zerebrale Vaskulitis, Leukenzephalopathie, zerebrale Ischämie, Epilepsie, Gedächtnisstörungen, Migräne, Vertigo, Sehstörungen. Von den 41 Patienten mit ZNS-Beteiligung hatten 19 (46%) Antikörper gegen die Bande 1, 16 (39%) gegen die Bande 2 (97 kD) und 15 (37%) gegen die Bande 3 (66 kD). Serum von Patienten ohne ZNS-Manifestation reagierte mit diesen Determinanten in 37%, 37% und 34%.

ERGEBNISSE

Tabelle 6: Häufigkeit von Antikörpern gegen die Bande 1 (MAP1/2) aus dem 100000g SN bei 112 Patienten mit verschiedenen Erkrankungen im ELISA

Erkrankung	n Patienten	Insgesamt n Patienten mit pos. Reaktion		IgG		IgM	
		n	%	positiv		Positiv	
				n	%	n	%
SLE ohne bek. ZNS Beteiligung	43	18	41,9	3	7	17	39,5
SLE mit ZNS Beteiligung	37	16	43,2	1	2,7	16	43,2
SLE mit ZNS Beteiligung im Verlauf	1	1	100	0	0	1	100
Sjögren ohne bek. ZNS Beteiligung	9	4	44,4	1	11,1	3	33,3
Sjögren mit ZNS Beteiligung	1	1	100	0	0	1	100
Sharp ohne bek. ZNS Beteiligung	10	2	20	1	10	2	20
Sharp mit ZNS Beteiligung	3	2	66,6	0	0	2	66,6
Vaskulitis ohne bek. ZNS Btlg.	3	1	33,3	0	0	1	33,3
PBC ohne bek. ZNS Btlg.	2	0	0	0	0	0	0
FMS ohne bek. ZNS Btlg.	3	1	33,3	0	0	1	33,3
Gesamt	112	46	41,1	6	5,4	44	39,3

ERGEBNISSE

Tabelle 7: Häufigkeit von Antikörpern gegen die Bande 2 aus dem 100000g SN bei 112 Patienten mit verschiedenen Erkrankungen im ELISA

Erkrankung	n Patienten	Insgesamt n Patienten mit pos. Reaktion		IgG		IgM	
		n	%	positiv		Positiv	
				n	%	n	%
SLE ohne bek. ZNS Beteiligung	43	19	44,2	2	4,7	19	44,2
SLE mit ZNS Beteiligung	37	14	37,8	1	2,7	14	37,8
SLE mit ZNS Beteiligung im Verlauf	1	1	100	0	0	1	100
Sjögren ohne bek. ZNS Beteiligung	9	3	33,3	1	11,1	2	22,2
Sjögren mit ZNS Beteiligung	1	1	100	0	0	1	100
Sharp ohne bek. ZNS Beteiligung	10	3	30	1	10	3	30
Sharp mit ZNS Beteiligung	3	1	33,3	0	0	1	33,3
Vaskulitis ohne bek. ZNS Btlg.	3	1	33,3	0	0	1	33,3
PBC ohne bek. ZNS Btlg.	2	0	0	0	0	0	0
FMS ohne bek. ZNS Btlg.	3	0	0	0	0	0	0
Gesamt	112	43	38,4	5	4,5	42	37,5

ERGEBNISSE

Tabelle 8: Häufigkeit von Antikörpern gegen die Bande 3 aus dem 100000g SN bei 112 Patienten mit verschiedenen Erkrankungen im ELISA

Erkrankung	n Patienten	Insgesamt n Patienten mit pos. Reaktion		IgG		IgM	
		n	%	positiv		Positiv	
				n	%	n	%
SLE ohne bek. ZNS Beteiligung	43	18	41,9	5	11,6	16	37,2
SLE mit ZNS Beteiligung	37	12	32,4	1	2,7	12	32,4
SLE mit ZNS Beteiligung im Verlauf	1	1	100	0	0	1	100
Sjögren ohne bek. ZNS Beteiligung	9	2	22,2	1	11,1	1	11,1
Sjögren mit ZNS Beteiligung	1	1	100	0	0	1	100
Sharp ohne bek. ZNS Beteiligung	10	2	20	1	10	2	20
Sharp mit ZNS Beteiligung	3	2	66,6	0	0	2	66,6
Vaskulitis ohne bek. ZNS Btlg.	3	1	33,3	1	33,3	0	0
PBC ohne bek. ZNS Btlg.	2	1	50	1	50	0	0
FMS ohne bek. ZNS Btlg.	3	0	0	0	0	0	0
Gesamt	112	40	35,7	10	8,9	35	31,3

3.5.1.2 Häufigkeit von Antikörpern bei Patienten mit PET Untersuchung und gesicherter ZNS Beteiligung

Es wurden Seren von acht Patienten untersucht, das Durchschnittsalter betrug 36,4 Jahre (22 - 54 Jahre). Die ZNS Manifestation wurde nach der ACR Nomenklatur für "Neuropsychiatric Lupus" [1] in die Schweregrade „severe“ und „mild“ eingeteilt, 7 Patienten wiesen schwere neuropsychiatrische Symptome auf. Alle acht Patienten zeigten Veränderungen in der PET Untersuchung. Die Patienten wurden in der Universitätsklinik Freiburg (Prof. Dr. H. H. Peter/ PD Dr. S.M. Weiner) untersucht und behandelt. Die Ergebnisse ihrer Arbeit wurden publiziert [78].

Das Ergebnis des ELISA (Tab. 9) zeigte nur jeweils eine positive Reaktion bei IgG bzw. IgM gegen die eluierten Banden B1-B3. Diese positive Reaktion trat nur bei einem Patienten mit den ZNS-Manifestationen Psychomotorische Unruhe, Neurose und Temporallappen-Epilepsie nach Neurozytom-Operation auf.

Tabelle 9: Nachweis von Antikörpern gegen die Banden B1-B3 bei 8 SLE Patienten mit ZNS-Manifestation (gesichert mittels PET)

Protein	Insgesamt n Patienten mit pos. Reaktion		IgG		IgM	
			positiv		Positiv	
	n	%	n	%	n	%
B1	1	12,5	1	12,5	1	12,5
B2	1	12,5	1	12,5	1	12,5
B3	1	12,5	1	12,5	1	12,5

3.5.2 Häufigkeit von Antikörpern gegen das rekombinante kommerzielle K-Alpha-1-Tubulin

Seren von 16 Patienten mit verschiedenen Erkrankungen sowie von drei gesunden Probanden wurden gegen rekomb. K-Alpha-1-Tubulin getestet.

Von diesen 16 Patienten wiesen zwei eine ZNS-Manifestation auf und sechs entwickelten eine ZNS-Manifestation im Verlauf. Von diesen acht Patienten mit ZNS-Manifestation bzw. ZNS-Manifestation im Verlauf hatten sieben Antikörper gegen das kommerzielle rekombinante K-Alpha-1-Tubulin, von den acht Patienten ohne ZNS-Manifestation ebenfalls sieben (Tab. 10).

Tabelle 10: Ergebnisse ELISA mit rekomb. K-Alpha-1-Tubulin

Erkrankung	n Patienten	Insgesamt n Patienten mit pos. Reaktion		IgG		IgM	
				positiv		Positiv	
		n	%	n	%	n	%
SLE ohne ZNS Beteiligung	4	4	100	4	100	2	50
SLE mit ZNS Beteiligung	1	1	100	1	100	0	0
SLE mit ZNS Beteiligung im Verlauf	5	4	80	4	80	4	80
Sharp mit ZNS Beteiligung	1	1	100	1	100	1	100
Sharp mit ZNS Beteiligung im Verlauf	1	1	100	1	100	0	0
Vaskulitis ohne ZNS Beteiligung	3	2	66,6	1	33,3	2	66,6
FMS ohne ZNS Beteiligung	1	1	100	1	100	1	100
Gesamt	16	14	87,5	13	81,3	10	62,5

3.6 Korrelation zwischen Western Blot und Elisa

Es wurden 51 Seren von Patienten mit SLE, Sharp-Syndrom, Vaskulitis, Sjögren-Syndrom, PBC und Fibromyalgie sowohl im Western Blot als auch im Elisa getestet, und zwar im Western Blot gegen den 100 000 g SN und im Elisa gegen die drei eluierten Banden, d.h. B1 zwischen Sammel- und Trenngel, B2 bei ca. 97 kD und B3 bei ca. 66 kD.

Von den 51 Patienten waren 24 in WB und ELISA positiv und drei in beiden Methoden negativ . Bei 21 Patienten ergab sich nur im ELISA und bei drei Patienten nur im Western Blot eine positive Reaktion (Tab. 11 u. 12).

Tabelle 11: Korrelation positiven Befunden in Western Blot und ELISA unter Verwendung verschiedener Antigenfraktionen. Analyse von 51 Patienten mit verschiedenen Erkrankungen.

- = positive und grenzwertig positive Reaktionen
- = negative Reaktion
- ng = nicht getestet

Pat.	Erkrankung	Banden > 50 kD im WB	ZNS AK im ELISA	B1 IgG	B1 IgM	B2 IgG	B2 IgM	B3 IgG	B3 IgM
1	SLE	■	■	■	■	■	■	■	■
2	SLE	■	■	■	■	■	■	■	■
3	SLE	■	■	■	■	■	■	■	■
4	SLE	■	■	■	■	■	■	■	■
5	SLE	■	ng	■	■	■	■	■	■
6	SLE	■	ng	■	■	■	■	■	■
7	SLE	■	ng	■	■	■	■	■	■
8	SLE	■	■	■	■	■	■	■	■
9	Sharp	■	ng	■	■	■	■	■	■
10	SLE	■	ng	■	■	■	■	■	■
11	SLE	■	■	■	■	■	■	■	■
12	SLE	■	ng	■	■	■	■	■	■
13	SLE	■	■	■	■	■	■	■	■
14	Vaskulitis	■	■	■	■	■	■	■	■
15	Sjögren	■	ng	■	■	■	■	■	■
16	SLE	■	■	■	■	■	■	■	■
17	SLE	■	■	■	■	■	■	■	■
18	PBC	■	■	■	■	■	■	■	■

ERGEBNISSE

Pat.	Erkrankung	Banden > 50 kD im WB	ZNS AK im ELISA	B1 IgG	B1 IgM	B2 IgG	B2 IgM	B3 IgG	B3 IgM
19	SLE		ng						
20	SLE		ng						
21	SLE		ng						
22	SLE		ng						
23	PBC								
24	Sjögren		ng						
25	SLE								
26	SLE								
27	SLE		ng						
28	SLE								
29	Sjögren								
30	SLE								
31	Sharp		ng						
32	Sharp		ng						
33	SLE		ng						
34	SLE								
35	Vaskulitis								
36	SLE		ng						
37	FMS								
38	SLE		ng						
39	SLE								
40	SLE								
41	SLE								
42	SLE								
43	SLE		ng						
44	SLE		ng						
45	Vaskulitis								
46	SLE								
47	Sjögren		ng						
48	SLE		ng						
49	Sharp								
50	Sharp								
51	Sharp		ng						

Tabelle 12: Korrelation zwischen dem Nachweis von Antikörpern gegen ZNS-Gewebe im Westernblot und im ELISA

Nachweis der Antikörper in		Anzahl (%) positiv
Western Blot	ELISA	
+	+	24 (47,1)
+	-	3 (5,9)
-	+	21 (41,2)
-	-	3 (5,9)

3.7 Sequenzierung

Die Sequenzierung der ausgeschnittenen und eluierten Banden aus der Gelelektrophorese wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Stefan Stevanovic vom Department of Immunology Tübingen durchgeführt. Die Bande 1 beinhaltete zwei detektierbare Sequenzen, Na⁺/K⁺ ATPase α1 und MAP1B (Abb. 12, 13). Für die Banden 2 und 3 konnte keine vollständige Sequenz gefunden werden.

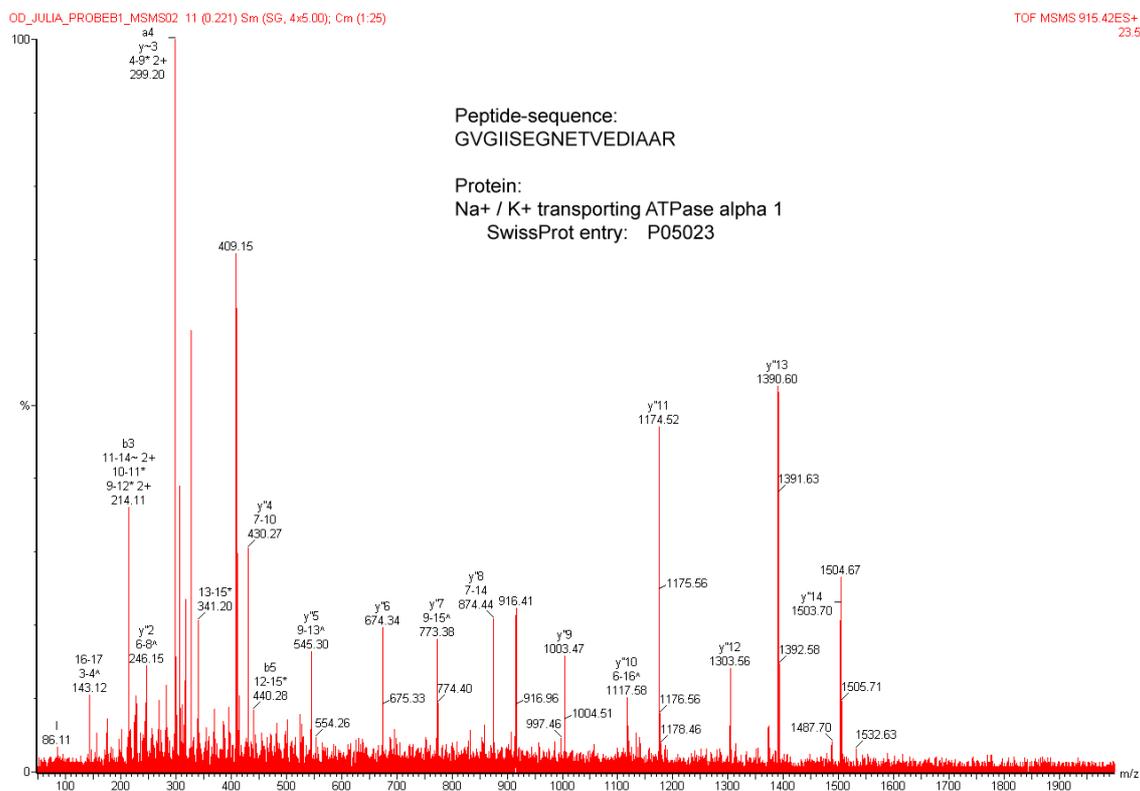


Abb. 12: Ergebnis der Sequenzierung der Bande zwischen Sammel- und Trenngel (B1): Na⁺/K⁺ ATPase Alpha 1

ERGEBNISSE

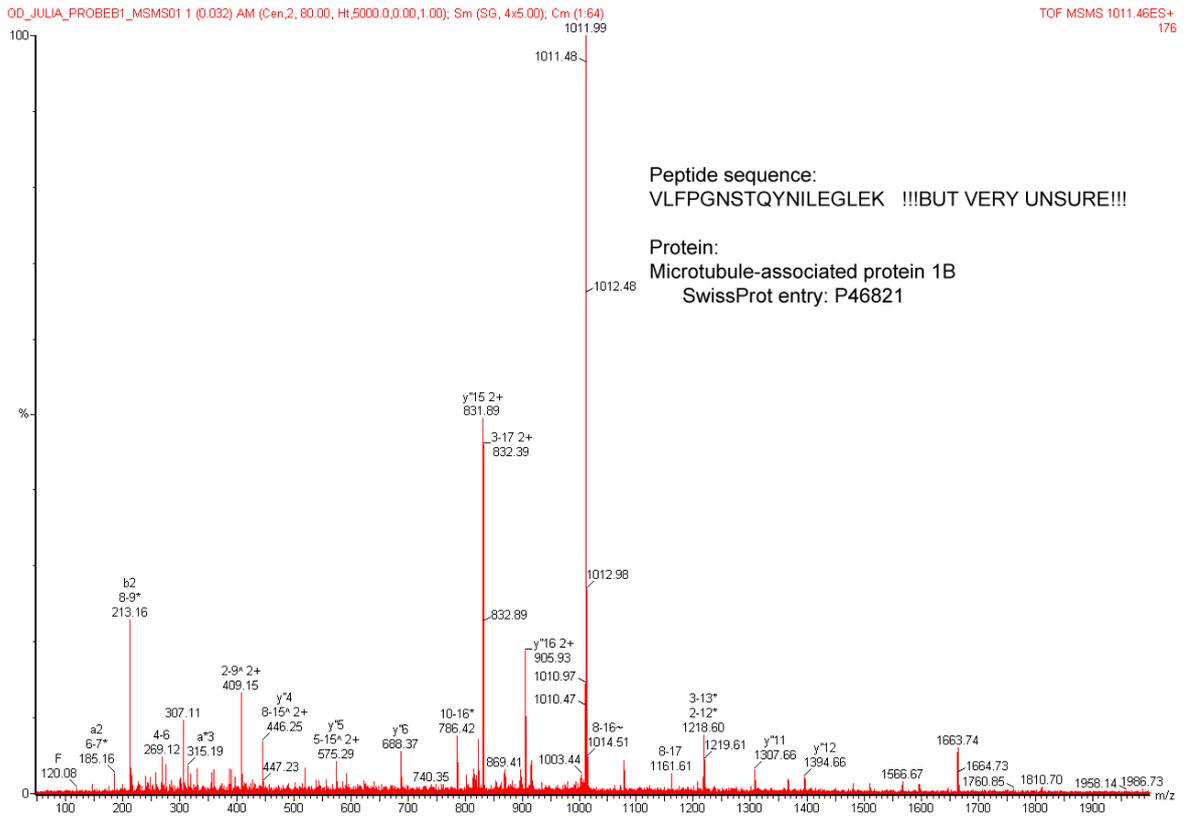


Abb. 13: Ergebnis der Sequenzierung der Bande zwischen Sammel- und Trenngel (B1): MAP 1B

4 Diskussion

4.1 Methodik

Die verwendeten Methoden wurden streng nach etablierten Protokollen des Immunpathologischen Labors Tübingen durchgeführt. Die Methodik hat sich in jahrelanger Anwendung bei routinediagnostischen Fragestellungen zum Nachweis von Autoantikörpern bewährt. Bei im Routinelabor selten angewendeten Versuchsreihen wurde streng nach Herstelleranleitung gearbeitet.

4.2 Western Blot

4.2.1 α - Tubulin

Mikrotubuli sind wichtige Bestandteile des Zytoskeletts eukaryontischer Zellen. Sie sind an vielen Zellfunktionen wie Zellteilung, Flagellen- und Cilienbewegung, sowie intrazellulären Transporten beteiligt. Hauptbestandteil der Mikrotubuli wiederum sind α - und β -Tubulin, die sich zu einem Heterodimer verbinden [76]. Beide Untereinheiten haben ein Molekulargewicht von ca. 55 kD. Es wurden bisher 7 Gruppen der Tubulinfamilie identifiziert (α , β , γ , δ , ϵ , ζ , η) [52]. Von den einzelnen Untereinheiten existieren wiederum verschiedene Isoformen. Bereits 1976 formulierten Fulton und Simpson die Multi-Tubulin-Hypothese, in welcher angenommen wird, dass die verschiedenen Tubulin-Isotypen auch verschiedene Funktionen haben. Es wurden weiterhin Zelltypen gefunden, die verschiedene Isoformen innerhalb einer einzelnen Gewebeart synthetisieren [82]. Die Isoformen von z. B. α - Tubulin sind entweder Produkte verschiedener Gene oder durch post-translationale Modifikation entstanden [46].

Nach Kong et al kommt in Mäusen ein gehirnspezifisches α -Tubulin vor, das höchstwahrscheinlich eine durch post-translationale Modifikation entstandene polyglutamylierte Variante ist [44].

Schon im Jahre 1992 wurde eine Studie auf einen AK bei NPSLE aufmerksam, der gegen ein 50 kD Antigen gerichtet ist. Man ging hierbei davon aus, dass es sich bei diesem Antigen um ein neuronales Membran-Protein handelt [32].

4.2.2 Ergebnisse Western Blot

Um das α -Tubulin in 100 000 g SN und das rekomb. α -Tubulin im Western Blot zu identifizieren, wurde ein monoklonaler Antikörper gegen α -Tubulin verwendet. Die Reaktionen des monoklonalen Antikörpers waren sowohl mit dem 100 000 g SN als auch mit dem rekomb. hergestellten α -Tubulin bei ca. 50 kD gleich stark ausgeprägt. Bei der Testung der Patientenseren gegen 100 000 g SN und rekomb. α -Tubulin fiel jedoch auf, dass einige Patientenseren zwar bei 50 kD mit 100 000 g SN reagieren, aber nicht, oder weniger stark mit dem bei 50 kD vermuteten rekomb. α -Tubulin. Dies wirft auf der einen Seite die Frage auf, ob die Autoantikörper gegen verschiedene Isoformen des α -Tubulins gerichtet sein könnten. Laut dem Buch "Principles of neural science" von E. Kandel, James Schwartz und Thomas Jessel (4. Auflage) sind im Gehirn mehr als 20 Tubulin-Isotypen vorhanden. Auf der anderen Seite zeigen die Ergebnisse der Western Blots, dass insgesamt mit dem 100 000 g SN und dem rekomb. α -Tubulin häufiger Banden mit einem Molekulargewicht grösser oder kleiner als 50 kD auftraten als Banden mit einem Molekulargewicht von 50 kD. Hinsichtlich der Reaktionen mit rekomb. α -Tubulin erhebt sich die Frage, ob bakterielle Verunreinigungen zu diesen Reaktionen geführt haben, oder ob das α -Tubulin teilweise als Dimer oder gespalten in einzelne Peptidstücke vorlag.

4.3 Ergebnisse ELISA

Im ELISA unter Verwendung der drei eluierten Banden, B1 zwischen Sammel- und Trenngel, B2 bei ca. 97 kD und B3 bei ca. 66 kD, aus dem Western Blot wird deutlich, dass die meisten positiven Reaktionen vom IgM-Typ waren. Am häufigsten waren Reaktionen bei B1 zu beobachten, also dem Protein, das entsprechend der Sequenzierung MAP 1 und die Na/K ATPase Alpha 1 enthielt. Bei der Testung der Patienten mit in einer PET Untersuchung gesicherter ZNS Beteiligung sind nur jeweils 12,5% der Patienten bei B1, B2 sowie B3 positiv. Das wirft u.a. die Frage auf, inwieweit die ZNS Beteiligung bei diesen Patienten primär durch Autoimmunreaktionen hervorgerufen wurde oder sekundäre Ursachen hat. Klein et al stellten des Weiteren fest, dass manche Patienten nur im Liquor Autoantikörpertiter gegen ZNS Gewebe aufweisen [42].

Seren von 16 Patienten wurden gegen kommerziell erhältliches rekomb. K-Alpha-1-Tubulin getestet. Zwei dieser Patienten hatten eine zerebrale Manifestation und sechs eine ZNS-Manifestation im Verlauf. Sieben dieser Patienten hatten insbesondere IgG-Antikörper gegen das Tubulin. Ein Vergleich mit dem selbst hergestellten in E.coli exprimierten α -Tubulin war nicht möglich, weil Verunreinigungen durch E.coli spezifische Proteine zu falsch positiven Ergebnissen führen können. Des Weiteren können ebenso falsch negative Befunde auftreten falls das rekombinante Antigen nicht alle relevanten Epitope aufweist.

4.4 Korrelation Ergebnisse ELISA / Western Blot

Seren von 51 Patienten wurden sowohl im Western Blot als auch im Elisa getestet, und zwar im Western Blot gegen 100 000 g SN und im Elisa gegen die 3 eluierten Banden. Hierbei wurden die positiven Reaktionen im WB mit Proteinen mit einem MG von > 50 kD mit den Reaktionen bei den im ELISA verwendeten eluierten Banden verglichen. Von den 51 Patienten waren 24 in Western Blot und ELISA positiv und drei in beiden Methoden negativ . Bei 21

Patienten ergab sich nur im ELISA und bei drei Patienten nur im Western Blot eine positive Reaktion. Es ergibt sich also bei 47% der Patienten eine positive Korrelation zwischen den Methoden ELISA und Western Blot. Bei 41% Patienten mit negativer Reaktion im WB, aber positivem ELISA muss die höhere Sensitivität der ELISA Testmethode berücksichtigt werden.

Ein weiterer Diskussionspunkt ist der Nachweis von ZNS-AK bei Patienten ohne ZNS-Manifestation. Hierzu muss auch die Sensitivität und Spezifität der verschiedenen Methoden berücksichtigt werden.

Beim sensitiveren ELISA Testverfahren zeigten sich mehr positive Reaktionen als beim Western Blot. Daher könnte der ELISA Test als Screeningverfahren und der Western Blot als Bestätigungstest dienen. Die Spezifität der Methoden hängt auch von der Qualität des verwendeten Antigens ab.

Noch zu untersuchen ist auch die Fragestellung, ob das alleinige Auftreten von ZNS-AK ausreicht, eine ZNS Manifestation hervorzurufen oder ob verschiedene Faktoren im Zusammenspiel verantwortlich sind.

4.5 Sequenzierung

4.5.1 MAP

Mikrotubuli im Gehirngewebe bestehen aus Tubulin und Mikrotubuli-Assoziierten-Proteinen (MAPs). Es hat sich gezeigt, dass die hochmolekularen Mikrotubuli-Assoziierten-Proteine MAP-1 und -2 den Mikrotubuli-Aufbau regulieren sowie in Cytoskelettale-Organisation und Transportmechanismen involviert sind. [60]. MAP-2 kommt im Gegensatz zu MAP1 spezifisch im Gehirngewebe vor [47]. Im Gehirngewebe wiederum kommt MAP-2 primär in Dendriten vor, während MAP-1 auch in Axonen und Gliazellen zu finden ist [60]. Die hochmolekularen MAPs des Gehirns MAP-1 und MAP-2 stellen sich in höher prozentigen Polyacrylamid-Gelen als je ein Bande bei ca. 300 000 kD dar. In höher auflösenden elektrophoretischen Systemen jedoch werden

Unterspezies der hochmolekularen MAPs sichtbar: MAP1 A,B,C und MAP2 A, B [74].

In einer Studie wurden bei SLE Patienten erhöhte Antikörpertiter gegen MAP 2 gefunden, welche eine starke Assoziation mit dem Auftreten von Psychosen, Krampfanfällen, Neuropathie und Zerebritis aufwiesen [79]. Zu Beginn dieser Dissertation wurde angenommen, dass es sich bei den Banden zwischen Sammel- und Trenngel um MAP-2 handelt, in der Sequenzierung wurde jedoch MAP-1 identifiziert. MAP-1 und MAP-2 weisen nicht nur ein ähnliches Molekulargewicht auf (MAP-1 ca. 350 000 kD und MAP-2 ca. 270 000 kD [73]), sondern haben auch strukturelle Ähnlichkeit. Bei einem genaueren Vergleich der beiden Proteine durch „Peptid-Mapping“ und Immunreaktivität wurden gemeinsame als auch eigenständige Antigen-Determinanten gefunden [34]. Aus diesem Grund lässt sich bei dem in dieser Arbeit verwendeten Gelelektrophoresen nicht mit Sicherheit sagen gegen welches MAP die Autoantikörper der Patientenseren gerichtet waren. Dies sollte mit niedrigerprozentigen Gelen im Western Blot weiterführend untersucht werden.

Im Elisa hatten von den 41 Patienten mit ZNS-Beteiligung 19 (46%) und von den 70 Patienten ohne ZNS-Manifestation 26 (37%) Antikörper gegen MAP1. Die Antikörper waren fast ausschließlich vom IgM-Typ. Im Western Blot waren im Bereich MAP1/2 zwei Seren von sechs Patienten mit zerebraler Manifestation positiv (33%), von den 52 Patienten ohne bekannte ZNS Manifestation waren 17 positiv (33%).

4.5.2 Na/ K⁺ ATPase Alpha 1

In der Bande zwischen Trenn- und Sammelgel wurde zusätzlich zu MAP 1 auch noch die Na/K ATPase Alpha 1 identifiziert. Jens Christian Skou erhielt 1997 den Nobelpreis für seine Entdeckung der Na/K ATPase im Jahre 1957 [8].

Die Na/K ATPase ist ein Transmembranprotein, welches unter ATP Hydrolyse gegen den Konzentrationsgradienten drei Natrium Ionen aus der Zelle und zwei Kalium Ionen in die Zelle hinein transportiert. Auf diese Weise hält sie das

besonders für Nervenzellen wichtige Ruhemembranpotential aufrecht. Die ATPase besteht aus einer α - und einer β -Untereinheit, von beiden Untereinheiten existieren mehrere Isoformen [7].

Bisher wurden Autoantikörper gegen die Na/K ATPase des Herz-Sarkolems beschrieben und als mögliche Ursachen für elektrische Instabilitäten, wie z.B. ventrikuläre Tachykardien, genannt [4]. Ob die Na/K ATPase als Antigen bei NPSLE eine Rolle spielt lässt sich hier nicht beantworten. Hierfür sind weitere Experimente nötig.

4.6 Schlussfolgerung

Viele Studien berichten über einen Zusammenhang zwischen neuropsychiatrischen Manifestationen beim SLE und dem Vorkommen von Autoantikörpern. Die genaue pathogenetische Rolle der Autoantikörper ist noch nicht vollständig geklärt. Es wurden auch ZNS-AK positive Patienten ohne ZNS Beteiligung beschrieben [56]. Das könnte zu der Annahme führen, dass weitere Mechanismen notwendig sind um den AK den Zugang zum ZNS Gewebe zu ermöglichen. Es werden verschiedene Vorgänge diskutiert, die zu einer Störung der Blut-Hirnschranke führen können, wie Mikrothromben in Gehirngefäßen, die Ischämien verursachen, oder immunologisch vermittelte Angriffe des Endotheliums und die daraus folgende Cytokinproduktion [2]. Ferner wird induzierter Zelltod durch Autoantikörper als ein möglicher Mechanismus angenommen. In Tierversuchen wurde gezeigt, dass nach der Einbringung von Anti-ZNS AK in den Cortex Verhaltensauffälligkeiten und Neurologische Störungen auftraten [67].

Aufgrund der in dieser Arbeit zusammengetragenen Ergebnisse lässt sich feststellen, dass nicht nur an einer Kollagenose erkrankte Patienten mit bekannter ZNS-Beteiligung, sondern auch Patienten ohne bekannte ZNS-Manifestation positive Reaktionen in den Bereichen MAP1/2 und α -Tubulin aufweisen. Um diesem Befund weiter nachzugehen sind engmaschige klinische

Untersuchungen und ggf. Bildgebungen des ZNS notwendig, um ZNS Manifestationen frühzeitig zu erkennen und den Befund mit den Ergebnissen der serologischen Untersuchungen vergleichen zu können. Des Weiteren sollte zur besseren Beurteilung der Befunde auch der aktuelle Status der medikamentösen Therapie berücksichtigt werden.

In dieser Arbeit konnte kein konkretes Antigen als Ziel für ZNS-Autoantikörper bei NPSLE bestimmt werden. Auch in einer Studie von Zandman-Goddard et al wurden die bisherig gefundenen Autoantikörper mit klinischen Manifestationen verglichen, es konnte bisher aber kein Autoantikörper identifiziert werden, der immer bei NPLSE auftritt [85]. Es sind daher weitere Studien nötig, um die exakte Rolle der Autoantikörper zu verstehen und die Zielantigene zu identifizieren.

Abschließend ist festzustellen, dass wahrscheinlich neben den Autoantikörpern noch weitere pathophysiologische Wege zu einer neuropsychiatrischen Symptomatik bei SLE führen können, wie z.B. Gefäßverschlüsse, Effekte durch Zytokine, Fehlfunktion des Choroidalen Plexus, Neuroendokrine Immuneffekte und direkte ZNS Gewebs-Schädigung [57].

5 Zusammenfassung

In der Literatur werden wiederholt Zusammenhänge zwischen dem Auftreten von ZNS-Autoantikörpern bei Kollagenosen und einer neuropsychiatrischen Beteiligung diskutiert. In der vorliegenden Dissertation wurden Patienten mit folgenden Erkrankungen analysiert: Systemischer Lupus Erythematoses, Sjögren-Syndrom, Sharp-Syndrom, Vaskulitis, Primär biliäre Zirrhose sowie Fibromyalgie-Syndrom.

Im Western Blot wurden 74 Patienten gegen 100 000 g SN und 44 Patienten gegen rekomb. α -Tubulin aus Bakterien getestet. Bei 16 dieser Patienten wurde eine ZNS Manifestation im zeitlichen Verlauf beschrieben, bei sechs Patienten bestand zum Zeitpunkt der Blutuntersuchung eine ZNS Manifestation.

Von diesen 74 Patienten zeigten 29 Patienten Reaktionen gegen den 100 000 g SN aus ZNS-Gewebe bei ca. 50 kD, d.h. auf Höhe des rekomb. α -Tubulins. Des Weiteren traten bei 36 der 74 Patienten Banden > 50 kD auf, v. a. bei ca. 66 und 97 kD, sowie gehäuft Reaktionen an der Stelle zwischen Trenn- und Sammelgel. Auch bei einem Molekulargewicht < 50 kD kam es bei 42 von 74 Patienten zu Reaktionen. Von den sechs Patienten mit bekannter ZNS Manifestation reagierten 33,3% positiv bei einem Molekulargewicht von > 50 kD und 50% bei einem MG von < 50 kD. 16,6 % der Patienten mit bekannter ZNS Beteiligung zeigten Reaktionen bei 50 kD, d.h. auf Höhe des α -Tubulins. Die Patienten mit ZNS Manifestation im Verlauf reagierten zu 50% positiv bei einem MG > 50 kD, zu 68,8 % positiv bei einem MG von < 50 kD und zu 37,5% positiv bei 50 kD. Im Western Blot waren 33% der Patienten mit zerebraler Manifestation positiv im Bereich von MAP1/2, von den Patienten ohne bekannte ZNS Manifestation reagierten ebenfalls 33% positiv in diesem Bereich.

ZUSAMMENFASSUNG

Von den 44 Patientenseren, die im Western Blot gegen das rekombinante in Bakterien exprimierte α -Tubulin getestet wurden, wiesen zwölf eine positive Reaktion im Bereich des α -Tubulins bei 50 kD auf. Banden mit einem Molekulargewicht größer 50 kD wurden mit Seren von 18 Patienten gefunden, 22 Seren reagierten mit Antigenen mit einem Molekulargewicht kleiner als 50 kD. Von diesen 44 Patienten war bei zwei Patienten eine ZNS Manifestation und bei vier Patienten eine ZNS Manifestation im Verlauf bekannt. Die Patienten mit bekannter ZNS Manifestation zeigten eine positive Reaktion mit einem Protein bei 50 kD und zwei weiteren Proteinen mit einem MG > 50 kD. Seren von vier Patienten mit bekannter ZNS Manifestation im Verlauf reagierten alle nur mit Proteinen mit einem MG > 50 kD, nicht mit dem 50 kD Protein.

Insgesamt wurden 112 Patienten im ELISA getestet, hiervon 41 an einer Kollagenose erkrankte Patienten mit dokumentierter ZNS-Beteiligung. Zu den ZNS Manifestationen gehörten Depression, Polyneuropathie, zerebrale Vaskulitis, Leukenzephalopathie, zerebrale Ischämie, Epilepsie, Gedächtnisstörungen, Migräne, Vertigo, Sehstörungen. Von den 41 Patienten mit ZNS-Beteiligung hatten 19 (46%) Antikörper gegen die Bande 1 (Bereich MAP1/2), 16 (39%) gegen die Bande 2 (97 kD) und 15 (37%) gegen die Bande 3 (66 kD). Seren von Patienten ohne ZNS-Manifestation reagierten mit diesen Determinanten in 37%, 37% und 34%.

Seren von 16 Patienten mit verschiedenen Erkrankungen sowie von drei gesunden Probanden wurden im ELISA gegen rekomb. K-Alpha-1-Tubulin getestet. Von diesen 16 Patienten wiesen zwei eine ZNS-Manifestation auf und sechs eine ZNS-Manifestation im Verlauf. Insgesamt hatten 14 Patienten Antikörper gegen kommerzielles rekombinantes K-Alpha-1-Tubulin, von den acht Patienten mit ZNS-Manifestation waren sieben positiv.

ZUSAMMENFASSUNG

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse ergaben keine eindeutige Korrelation zwischen einer neuropsychiatrischen Manifestation einer Kollagenerkrankung und Antikörpern gegen ein bestimmtes Antigen aus ZNS-Gewebe, insbesondere auch die bisher beschriebenen Antigene MAP1/2 und α -Tubulin. Ihre Beteiligung an der Entstehung eines solchen Krankheitsbildes muss daher weiter offen bleiben. Es wurde aber wieder deutlich, dass bei Kollagenerkrankungen Antikörper gegen verschiedene neuronale Strukturen gebildet werden, deren bessere Charakterisierung zur Klärung beitragen könnte, wie diese Antikörper induziert werden und welche pathogenetische Bedeutung sie haben.

6 Literaturverzeichnis

1. The American College of Rheumatology nomenclature and case definitions for neuropsychiatric lupus syndromes. *Arthritis Rheum.* 1999; 42(4): p. 599-608.
2. Abbott, N. J., Mendonca, L. L., and Dolman, D. E. The blood-brain barrier in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2003; 12(12): p. 908-15.
3. Appenzeller, S., Cendes, F., and Costallat, L. T. Epileptic seizures in systemic lupus erythematosus. *Neurology.* 2004; 63(10): p. 1808-12.
4. Baba, A., Yoshikawa, T., and Ogawa, S. Autoantibodies produced against sarcolemmal Na-K-ATPase: possible upstream targets of arrhythmias and sudden death in patients with dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2002; 40(6): p. 1153-9.
5. Berg, P. A., Klein, R., Lindenborn-Fotinos, J., and Kloppel, W. ATPase-associated antigen (M2): marker antigen for serological diagnosis of primary biliary cirrhosis. *Lancet.* 1982; 2(8313): p. 1423-6.
6. Bertsias, G., Gordon, C., and Boumpas, D. T. Clinical trials in systemic lupus erythematosus (SLE): lessons from the past as we proceed to the future--the EULAR recommendations for the management of SLE and the use of end-points in clinical trials. *Lupus.* 2008; 17(5): p. 437-42.
7. Blanco, G. and Mercer, R. W. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol.* 1998; 275(5 Pt 2): p. F633-50.
8. Boldyrev, A. A. Na⁺,K⁺-ATPase: 40 years of investigations. *Membr Cell Biol.* 2000; 13(6): p. 715-9.
9. Borchers, A. T., Aoki, C. A., Naguwa, S. M., Keen, C. L., Shoenfeld, Y., and Gershwin, M. E. Neuropsychiatric features of systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev.* 2005; 4(6): p. 329-44.
10. Bouneaud, C., Kourilsky, P., and Bousso, P. Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. *Immunity.* 2000; 13(6): p. 829-40.
11. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: p. 248-54.
12. Bruyn, G. A. Controversies in lupus: nervous system involvement. *Ann Rheum Dis.* 1995; 54(3): p. 159-67.

LITERATURVERZEICHNIS

13. Bujard, H., Gentz, R., Lanzer, M., Stueber, D., Mueller, M., Ibrahimi, I., Haeuptle, M. T., and Dobberstein, B. A T5 promoter-based transcription-translation system for the analysis of proteins in vitro and in vivo. *Methods Enzymol.* 1987; 155: p. 416-33.
14. Burnet, F. M. Immunological recognition of self. *Science.* 1961; 133: p. 307-11.
15. Burnet, F. M. A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *CA Cancer J Clin.* 1976; 26(2): p. 119-21.
16. Casellas, R., Shih, T. A., Kleinewietfeld, M., Rakonjac, J., Nemazee, D., Rajewsky, K., and Nussenzweig, M. C. Contribution of receptor editing to the antibody repertoire. *Science.* 2001; 291(5508): p. 1541-4.
17. Clark, G., Reichlin, M., and Tomasi, T. B., Jr. Characterization of a soluble cytoplasmic antigen reactive with sera from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 1969; 102(1): p. 117-22.
18. Cleveland, D. W., Fischer, S. G., Kirschner, M. W., and Laemmli, U. K. Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J Biol Chem.* 1977; 252(3): p. 1102-6.
19. Colasanti, T., Delunardo, F., Margutti, P., Vacirca, D., Piro, E., Siracusano, A., and Ortona, E. Autoantibodies involved in neuropsychiatric manifestations associated with systemic lupus erythematosus. *J Neuroimmunol.* 2009; 212(1-2): p. 3-9.
20. Csepany, T., Bereczki, D., Kollar, J., Sikula, J., Kiss, E., and Csiba, L. MRI findings in central nervous system systemic lupus erythematosus are associated with immunoserological parameters and hypertension. *J Neurol.* 2003; 250(11): p. 1348-54.
21. Daniels, T. E. and Whitcher, J. P. Association of patterns of labial salivary gland inflammation with keratoconjunctivitis sicca. Analysis of 618 patients with suspected Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 1994; 37(6): p. 869-77.
22. Dausset, J. The major histocompatibility complex in man. *Science.* 1981; 213(4515): p. 1469-74.
23. Eber, T., Chapman, J., and Shoenfeld, Y. Anti-ribosomal P-protein and its role in psychiatric manifestations of systemic lupus erythematosus: myth or reality? *Lupus.* 2005; 14(8): p. 571-5.

LITERATURVERZEICHNIS

24. Endo, T., Scott, D. D., Stewart, S. S., Kundu, S. K., and Marcus, D. M. Antibodies to glycosphingolipids in patients with multiple sclerosis and SLE. *J Immunol.* 1984; 132(4): p. 1793-7.
25. Futrell, N., Schultz, L. R., and Millikan, C. Central nervous system disease in patients with systemic lupus erythematosus. *Neurology.* 1992; 42(9): p. 1649-57.
26. Galeazzi, M., Morozzi, G., Sebastiani, G. D., Bellisai, F., Marcolongo, R., Cervera, R., De Ramon Garrido, E., Fernandez-Nebro, A., Houssiau, F., Jedryka-Goral, A., Mathieu, A., Papasteriades, C., Piette, J. C., Scorza, R., and Smolen, J. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in 566 European patients with systemic lupus erythematosus: prevalence, clinical associations and correlation with other autoantibodies. *European Concerted Action on the Immunogenetics of SLE. Clin Exp Rheumatol.* 1998; 16(5): p. 541-6.
27. Gaubitz, M. and Schotte, H. Frühdiagnose des systemischen Lupus erythematoses (SLE). *Z Rheumatol.* 2005; 64(8): p. 547-52.
28. Goodnow, C. C. Balancing immunity and tolerance: deleting and tuning lymphocyte repertoires. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93(6): p. 2264-71.
29. Goodnow, C. C., Sprent, J., Fazekas de St Groth, B., and Vinuesa, C. G. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature.* 2005; 435(7042): p. 590-7.
30. Greenwood, D. L., Gitlits, V. M., Alderuccio, F., Sentry, J. W., and Toh, B. H. Autoantibodies in neuropsychiatric lupus. *Autoimmunity.* 2002; 35(2): p. 79-86.
31. Hanly, J. G., McCurdy, G., Fougere, L., Douglas, J. A., and Thompson, K. Neuropsychiatric events in systemic lupus erythematosus: attribution and clinical significance. *J Rheumatol.* 2004; 31(11): p. 2156-62.
32. Hanson, V. G., Horowitz, M., Rosenbluth, D., Spiera, H., and Puszkin, S. Systemic lupus erythematosus patients with central nervous system involvement show autoantibodies to a 50-kD neuronal membrane protein. *J Exp Med.* 1992; 176(2): p. 565-73.
33. Hargraves MM, R. H., Morton R. Presentation of two bone marrow elements: the "Tart" cell and the "L. E." cell. *Proc Staff Meet Mayo Clin.* 1948;23:25-28.

LITERATURVERZEICHNIS

34. Herrmann, H., Pytela, R., Dalton, J. M., and Wiche, G. Structural homology of microtubule-associated proteins 1 and 2 demonstrated by peptide mapping and immunoreactivity. *J Biol Chem.* 1984; 259(1): p. 612-7.
35. Hochberg, M. C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997; 40(9): p. 1725.
36. Holman, H. R. Partial purification and characterization of an extractible nuclear antigen which reacts with SLE sera. *Ann N Y Acad Sci.* 1965; 124(2): p. 800-6.
37. Holman, H. R., Kunkel, H. G. Affinity between the Lupus Erythematosus Serum Factor and Cell Nuclei and Nucleoprotein. *Science* 26 July 1957; Vol. 126. no. 3265: p. pp. 162 - 163
38. Joseph, F. G., Lammie, G. A., and Scolding, N. J. CNS lupus: a study of 41 patients. *Neurology.* 2007; 69(7): p. 644-54.
39. Kaposi, M. Neue Beiträge zur Kenntnis des Lupus Erythematosus. *Arch. Dermatol. Syph.* 4 (1872), pp. 36-79.
40. Kiss, E. and Shoenfeld, Y. Are anti-ribosomal P protein antibodies relevant in systemic lupus erythematosus? *Clin Rev Allergy Immunol.* 2007; 32(1): p. 37-46.
41. Klein, R., Lindenborn-Fotinos, J., and Berg, P. A. Use of ATPase-associated antigen (M2) for detection of antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis by fluorometric immunoassay. *J Immunol Methods.* 1983; 64(1-2): p. 227-38.
42. Klein, R., Richter, C., and Berg, P. A. Antibodies against central nervous system tissue (anti-CNS) detected by ELISA and western blotting: marker antibodies for neuropsychiatric manifestations in connective tissue diseases. *Autoimmunity.* 1991; 10(2): p. 133-44.
43. Klein, R., Bansch, M., and Berg, P. A. Clinical relevance of antibodies against serotonin and gangliosides in patients with primary fibromyalgia syndrome. *Psychoneuroendocrinology.* 1992; 17(6): p. 593-8.
44. Kong, L. W., Ding, X. Y., Kitani, H., Shiurba, R., and Jing, N. H. Evidence for a mouse brain-specific variant of alpha-tubulin. *Cell Res.* 1999; 9(4): p. 315-25.
45. Laufer, T. M., DeKoning, J., Markowitz, J. S., Lo, D., and Glimcher, L. H. Unopposed positive selection and autoreactivity in mice expressing class II MHC only on thymic cortex. *Nature.* 1996; 383(6595): p. 81-5.

LITERATURVERZEICHNIS

46. LeDizet, M. and Piperno, G. Cytoplasmic microtubules containing acetylated alpha-tubulin in *Chlamydomonas reinhardtii*: spatial arrangement and properties. *J Cell Biol.* 1986; 103(1): p. 13-22.
47. Lewis, S. A., Villasante, A., Sherline, P., and Cowan, N. J. Brain-specific expression of MAP2 detected using a cloned cDNA probe. *J Cell Biol.* 1986; 102(6): p. 2098-105.
48. Lipsky, P. E. Systemic lupus erythematosus: an autoimmune disease of B cell hyperactivity. *Nat Immunol.* 2001; 2(9): p. 764-6.
49. Martinez, X., Tintore, M., Montalban, J., Ordi, J., Vilardell, M., and Codina, A. Antibodies against gangliosides in patients with SLE and neurological manifestations. *Lupus.* 1992; 1(5): p. 299-302.
50. Mattioli, M. and Reichlin, M. Heterogeneity of RNA protein antigens reactive with sera of patients with systemic lupus erythematosus. Description of a cytoplasmic nonribosomal antigen. *Arthritis Rheum.* 1974; 17(4): p. 421-9.
51. McDevitt, H. O. Discovering the role of the major histocompatibility complex in the immune response. *Annu Rev Immunol.* 2000; 18: p. 1-17.
52. McKean, P. G., Vaughan, S., and Gull, K. The extended tubulin superfamily. *J Cell Sci.* 2001; 114(Pt 15): p. 2723-33.
53. Medawar, P. B. Immunological tolerance. *Science.* 1961; 133: p. 303-6.
54. Ndhlovu, M., Preuss, B. E., Dengjel, J., Stevanovic, S., Weiner, S. M., and Klein, R. Identification of alpha-tubulin as an autoantigen recognized by sera from patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Brain Behav Immun.* 25(2): p. 279-85.
55. Nemazee, D. and Hogquist, K. A. Antigen receptor selection by editing or downregulation of V(D)J recombination. *Curr Opin Immunol.* 2003; 15(2): p. 182-9.
56. Ochola, J., Hussain, M., Khamashta, M., Hughes, G. R., and Vergani, D. Detection of brain-reactive autoantibodies in the sera of patients with systemic lupus erythematosus and cerebral involvement. *J Immunol Methods.* 1995; 185(2): p. 259-61.
57. Rhiannon, J. J. Systemic lupus erythematosus involving the nervous system: presentation, pathogenesis, and management. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2008; 34(3): p. 356-60.

LITERATURVERZEICHNIS

58. Robbins, M. L., Kornguth, S. E., Bell, C. L., Kalinke, T., England, D., Turski, P., and Graziano, F. M. Antineurofilament antibody evaluation in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. Combination with anticardiolipin antibody assay and magnetic resonance imaging. *Arthritis Rheum.* 1988; 31(5): p. 623-31.
59. Russell, I. J., Orr, M. D., Littman, B., Vipraio, G. A., Alboukrek, D., Michalek, J. E., Lopez, Y., and MacKillip, F. Elevated cerebrospinal fluid levels of substance P in patients with the fibromyalgia syndrome. *Arthritis Rheum.* 1994; 37(11): p. 1593-601.
60. Schoenfeld, T. A., McKerracher, L., Obar, R., and Vallee, R. B. MAP 1A and MAP 1B are structurally related microtubule associated proteins with distinct developmental patterns in the CNS. *J Neurosci.* 1989; 9(5): p. 1712-30.
61. Schwartz, R. H. T cell anergy. *Annu Rev Immunol.* 2003; 21: p. 305-34.
62. Sharp, G. C., Irvin, W. S., Tan, E. M., Gould, R. G., and Holman, H. R. Mixed connective tissue disease--an apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen (ENA). *Am J Med.* 1972; 52(2): p. 148-59.
63. Sharp, G. C., Irvin, W. S., May, C. M., Holman, H. R., McDuffie, F. C., Hess, E. V., and Schmid, F. R. Association of antibodies to ribonucleoprotein and Sm antigens with mixed connective-tissue disease, systemic lupus erythematosus and other rheumatic diseases. *N Engl J Med.* 1976; 295(21): p. 1149-54.
64. Shlomchik, M. J., Craft, J. E., and Mamula, M. J. From T to B and back again: positive feedback in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol.* 2001; 1(2): p. 147-53.
65. Sibley, J. T., Olszynski, W. P., Decoteau, W. E., and Sundaram, M. B. The incidence and prognosis of central nervous system disease in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 1992; 19(1): p. 47-52.
66. Silverstein, A. M. Autoimmunity versus horror autotoxicus: the struggle for recognition. *Nat Immunol.* 2001; 2(4): p. 279-81.
67. Simon, J. and Simon, O. Effect of passive transfer of anti-brain antibodies to a normal recipient. *Exp Neurol.* 1975; 47(3): p. 523-34.
68. Starr, T. K., Jameson, S. C., and Hogquist, K. A. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol.* 2003; 21: p. 139-76.
69. Surh, C. D. and Sprent, J. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature.* 1994; 372(6501): p. 100-3.

LITERATURVERZEICHNIS

70. Tan, E. M. and Kunkel, H. G. Characteristics of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 1966; 96(3): p. 464-71.
71. Tan, E. M., Cohen, A. S., Fries, J. F., Masi, A. T., McShane, D. J., Rothfield, N. F., Schaller, J. G., Talal, N., and Winchester, R. J. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1982; 25(11): p. 1271-7.
72. Toubi, E., Khamashta, M. A., Panarra, A., and Hughes, G. R. Association of antiphospholipid antibodies with central nervous system disease in systemic lupus erythematosus. *Am J Med.* 1995; 99(4): p. 397-401.
73. Vallee, R. B. and Davis, S. E. Low molecular weight microtubule-associated proteins are light chains of microtubule-associated protein 1 (MAP 1). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983; 80(5): p. 1342-6.
74. Vallee, R. B., Bloom, G. S., and Theurkauf, W. E. Microtubule-associated proteins: subunits of the cytomatrix. *J Cell Biol.* 1984; 99(1 Pt 2): p. 38s-44s.
75. Vitali, C., Bombardieri, S., Jonsson, R., Moutsopoulos, H. M., Alexander, E. L., Carsons, S. E., Daniels, T. E., Fox, P. C., Fox, R. I., Kassin, S. S., Pillemer, S. R., Talal, N., and Weisman, M. H. Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis.* 2002; 61(6): p. 554-8.
76. Wade, R. H. On and around microtubules: an overview. *Mol Biotechnol.* 2009; 43(2): p. 177-91.
77. Weiner, S. M., Klein, R., and Berg, P. A. A longitudinal study of autoantibodies against central nervous system tissue and gangliosides in connective tissue diseases. *Rheumatol Int.* 2000; 19(3): p. 83-8.
78. Weiner, S. M., Otte, A., Schumacher, M., Klein, R., Gutfleisch, J., Brink, I., Otto, P., Nitzsche, E. U., Moser, E., and Peter, H. H. Diagnosis and monitoring of central nervous system involvement in systemic lupus erythematosus: value of F-18 fluorodeoxyglucose PET. *Ann Rheum Dis.* 2000; 59(5): p. 377-85.
79. Williams, R. C., Jr., Sugiura, K., and Tan, E. M. Antibodies to microtubule-associated protein 2 in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2004; 50(4): p. 1239-47.

LITERATURVERZEICHNIS

80. Wolfe, F., Smythe, H. A., Yunus, M. B., Bennett, R. M., Bombardier, C., Goldenberg, D. L., Tugwell, P., Campbell, S. M., Abeles, M., Clark, P., and et al. The American College of Rheumatology 1990 Criteria for the Classification of Fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee. *Arthritis Rheum.* 1990; 33(2): p. 160-72.
81. Wong, K. L., Woo, E. K., Yu, Y. L., and Wong, R. W. Neurological manifestations of systemic lupus erythematosus: a prospective study. *Q J Med.* 1991; 81(294): p. 857-70.
82. Woo, K., Jensen-Smith, H. C., Luduena, R. F., and Hallworth, R. Differential synthesis of beta-tubulin isotypes in gerbil nasal epithelia. *Cell Tissue Res.* 2002; 309(2): p. 331-5.
83. Yoshida, S. and Gershwin, M. E. Autoimmunity and selected environmental factors of disease induction. *Semin Arthritis Rheum.* 1993; 22(6): p. 399-419.
84. Yunus, M. B., Dailey, J. W., Aldag, J. C., Masi, A. T., and Jobe, P. C. Plasma tryptophan and other amino acids in primary fibromyalgia: a controlled study. *J Rheumatol.* 1992; 19(1): p. 90-4.
85. Zandman-Goddard, G., Chapman, J., and Shoenfeld, Y. Autoantibodies involved in neuropsychiatric SLE and antiphospholipid syndrome. *Semin Arthritis Rheum.* 2007; 36(5): p. 297-315.
86. Zeballos, R. S., Fox, R. I., Cheresch, D. A., and McPherson, R. A. Anti-glycosphingolipid autoantibodies in rheumatologic disorders. *J Clin Lab Anal.* 1994; 8(6): p. 378-84.

7 Abkürzungsverzeichnis

ACR	American College of Rheumatology
AEC	3-Amino-9-Ethyl-Carbazol
Ag	Antigen
AGA	Anti-Gangliosid Antikörper
AK	Antikörper
AMA	Antimitochondriale Antikörper
ANA	Antinukleäre Antikörper
APC	Antigen präsentierende Zelle
ARA	American Rheumatism Association
ATPase	Adenosin-5'-triphosphat Synthase
BE	Blutentnahme
bek.	bekannt
BSA	Bovines Serumalbumin
Btlg	Beteiligung
dsDNS	Doppelstrang-DNS
DM/PM	Dermato- und Polymyositis
ENA	Extrahierbare nukleäre Antigene
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
HLA	Human leucocyte antigen
HRP	Meerrettichperoxidase (Horseradish peroxidase)
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kD	Kilodalton
LB	Lysogeny broth (Nährmedium)
MAP	Mikrotubuli assoziiertes Protein
Mb	Morbus
MCTD	Mischkollagenosen (mixed connective tissue disease)
MG	Molekulargewicht
MHC	Major histocompatibility complex
min	Minute

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

NC	Nitrocellulose
Nedd5	Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 5
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetic Acid
nRNP	nukleäre Ribonukleinsäure (nuclear ribonucleic acid)
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NPSLE	Neuropsychiatrischer Systemischer Lupus Erythematodes
p-ANCA	Anti-Neutrophilic-Cytoplasm Antibodies with perinuclear (p) staining
Pat.	Patient(en)
PBC	Primär biliäre Zirrhose
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PSS	Systemische Sklerose
rekomb.	rekombinant
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
Sm	Smith
SMP	Submitochondriale Partikel
SN	Überstand (Supernatant)
SS	Sjögren Syndrom
SSA	Sjögren syndrome A
SSB	Sjögren syndrome B
Tris	Tris[hydroxymethyl]aminomethan
UCTD	Undifferenzierte Kollagenosen (Undifferentiated Connective Tissue Disease)
UDCA	Ursodesoxycholsäure
WB	Westernblot
WP	Waschpuffer
ZNS	Zentrales Nervensystem

8 Abstract

Nachweis von Antikörpern gegen zentrales Nervensystem (ZNS) bei Patienten mit Kollagenerkrankungen und Charakterisierung der entsprechenden Targetantigene

Hintergrund

Das Vorkommen verschiedener Autoantikörper bei Patienten mit neuropsychiatrischem systemischem Lupus erythematosus (SLE) hat die Aufmerksamkeit auf einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten spezifischer Antikörper und Beteiligung des Nervensystems gerichtet. Ziel der hier vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der Korrelation zwischen dem Auftreten von Autoantikörpern gegen zentrales Nervensystem (ZNS) und klinisch neuropsychiatrischer Manifestationen sowie die Charakterisierung möglicher ZNS-Antigene bei Patienten mit verschiedenen Kollagenerkrankungen, insbesondere unter Berücksichtigung des SLE.

Material und Methoden

Seren von Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen wurden mit den Methoden Western Blot und ELISA untersucht. Von den 74 im Western Blot untersuchten Patienten entwickelten 16 eine zerebrale Manifestation im Verlauf und sechs Patienten wiesen zum Zeitpunkt der Untersuchung eine ZNS-Beteiligung auf. Als Antigene wurden ein 100.000 g Überstand (SN) aus Rinderhirn sowie ein in E.coli exprimiertes α -Tubulin verwendet. Zur Charakterisierung der Targetantigene wurden monoklonale Antikörper gegen α - und β -Tubulin sowie gegen das Mikrotubuli-assoziierte-Protein 2 (MAP2) eingesetzt. Im ELISA wiesen von insgesamt 112 untersuchten Patienten 41 eine ZNS-Beteiligung zum Zeitpunkt der Untersuchung auf, ein Patient entwickelte eine ZNS-Manifestation im Verlauf.

Ergebnisse / Schlussfolgerung

Seren von 57% der Patienten reagierten im Western Blot unter Verwendung des 100.000 g SN aus ZNS-Gewebe mit Determinanten mit einem MG von < 50 kD. Auf Höhe des rekomb. α -Tubulins (50 kD), zeigten 39% der Seren eine positive Reaktion. Seren von Patienten mit ZNS Manifestation im Verlauf reagierten zu 68,8 % positiv bei einem MG von < 50 kD und zu 37,5% positiv bei 50 kD. Von den Seren der Patienten mit bekannter ZNS Manifestation reagierten 50% bei einem MG von < 50 kD und nur 16,6 % zeigten Reaktionen bei 50 kD, d.h. auf Höhe des α -Tubulins. Des Weiteren traten bei 49% der Patienten Banden > 50 kD auf, v. a. bei ca. 66 und 97 kD, sowie gehäuft Reaktionen an der Stelle zwischen Trenn- und Sammelgel (MAP1/2). Seren von Patienten mit ZNS Manifestation im Verlauf reagierten zu 50% positiv bei einem MG > 50 kD. Von den Seren von Patienten mit bekannter ZNS-Manifestation reagierten 33,3% positiv bei einem Molekulargewicht von > 50 kD.

Im ELISA reagierten Seren von 19 der 41 Patienten mit ZNS-Beteiligung (46%) mit der Bande 1 (Bereich MAP1/2), 16 (39%) mit der Bande 2 (97 kD) und 15 (37%) mit der Bande 3 (66 kD). Seren von Patienten ohne ZNS-Manifestation reagierten mit diesen Determinanten in 37%, 37% und 34%.

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse ergaben keine eindeutige Korrelation zwischen einer neuropsychiatrischen Manifestation einer Kollagenerkrankung und Antikörpern gegen ein bestimmtes Antigen aus ZNS-Gewebe, insbesondere auch die bisher beschriebenen Antigene MAP1/2 und α -Tubulin. Ihre Beteiligung an der Entstehung eines solchen Krankheitsbildes muss daher weiter offen bleiben. Es wurde aber wieder deutlich, dass bei Kollagenerkrankungen Antikörper gegen verschiedene neuronale Strukturen gebildet werden, deren bessere Charakterisierung zur Klärung beitragen könnte, wie diese Antikörper induziert werden und welche pathogenetische Bedeutung sie haben.

Detection of antibodies against central nervous system (CNS) in patients with collagen diseases and characterization of the corresponding target antigens

Background

The presence of various autoantibodies in SLE patients with neuropsychiatric manifestations has focused attention on a relationship between the occurrence of specific antibodies and involvement of the nervous system. The aim of this work is to investigate the correlation between CNS autoantibodies and clinical onset of neuropsychiatric manifestations as well as characterization of possible CNS antigens in patients with various collagen diseases with special reference to SLE.

Material and Methods

Sera from patients with various diseases were examined by Western blot and ELISA methods. Of the 74 patients studied by Western blotting 16 patients developed a cerebral manifestation in the course, six patients showed CNS involvement at the time of testing.

As antigens a 100,000 g supernatant (SN) from bovine brain and an in *E. coli* expressed α -tubulin were used. For the characterization of the target antigens monoclonal antibodies against α - and β -tubulin as well as microtubule-associated protein 2 (MAP2) were used. In ELISA 41 of a total of 112 examined patients showed a CNS involvement at the time of examination, one patient developed a CNS manifestation in the course.

Results/ Conclusion

In Western blot against the 100 000 g SN from CNS tissue most patients (57%) showed a reaction at a MW of < 50 kD. At the height of the recombinant α -tubulin 39% of the patients had a positive reaction. Patients with CNS manifestation in the course had a positive reaction from 68.8% at a MW of < 50 kD and 37.5% at 50 kD. Of the patients with known CNS manifestation 50% showed a positive reaction at a MW of < 50 kD, and only 16.6% showed a positive reaction at 50 kD, which is at the level of the α -tubulin. Furthermore there were positive bands at > 50 kD in 49% of the patients, especially around 66 and 97 kD, and heaped reactions at the interface between separating and stacking gel (MAP1/2). 50% of the patients with CNS manifestation in the course responded positively at a MW > 50 kD. In the group of patients with known CNS manifestation 33.3% reacted positively to a molecular weight > 50 kD.

A total of 112 patients were tested by ELISA, CNS involvement was described in 41 patients. ELISA showed that 19 (46%) of these 41 patients with CNS involvement had antibodies against MAP1/2 (B1), 16 (39%) against B2 (97 kD) and 15 (37%) against B3 (66 kD). Sera from patients without CNS manifestation responded to these determinants in 37%, 37% and 34%.

The results presented in this study showed no clear link between a neuropsychiatric manifestation of collagen disease and antibodies to a particular antigen from CNS tissue, in particular the previously described antigens MAP1 / 2 and α -tubulin. Their involvement in the emergence of such a disease must therefore remain open. However it became clear again that antibodies against different neural structures are formed in collagen diseases. Their better characterization could help to clarify how these antibodies are induced and what pathogenetic role they have.

9 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. med. Reinhild Klein bedanken, die mir diese Arbeit ermöglicht hat und mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Frau Prof. Klein hatte immer ein offenes Ohr für alle großen und kleinen Probleme einer Doktorarbeit und wusste durch Ihre positive Art stets zu motivieren.

Weiterhin danken möchte ich allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Immunpathologischen Labors für die freundliche Atmosphäre und die geduldige Hilfestellung beim Erlernen und Durchführen der angewendeten Labormethoden. Mein Dank gilt besonders Frau Elwira Herdt und Frau Dr. rer. nat. Beate Preuß für Ihre Einweisung in die durchgeführten Experimente, sowie Frau Maja Wilczek für die stets unterstützenden Worte.

Ein besonders großer Dank geht an meine Eltern und Großeltern, die mich während meines Studiums stets großzügig unterstützt und mir den nötigen Rückhalt gegeben haben. Abschließend möchte ich mich bei meinem Freundeskreis bedanken, der mir immer geduldig und motivierend zur Seite stand.

10 Lebenslauf Julia Durban

- in der elektronischen Publikation der Dissertation nicht verfügbar -