

Aus der Neurologischen Klinik
Direktor: Prof. Dr. Klaus Faßbender
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Vergleichende Analyse von Autoantikörperprofilen bei Patienten mit Myasthenia gravis, Guillain-Barré-Syndrom und gesunden Kontrollen an Hand von Proteinmacroarrays

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2010

vorgelegt von: Anne Becker

geb. am: 31.7.1985 in Göttingen

I. Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung/Summary	8
1.1	Zusammenfassung	8
1.2	Summary	11
2	Einleitung	13
2.1	Myasthenia gravis	13
2.2	Guillain-Barré-Syndrom	18
2.3	Allgemeine Bedeutung von Autoantikörpern.....	22
2.3.1	Natürliche Antikörper	23
2.3.2	Autoantikörperproduktion im Rahmen von Autoimmunerkrankungen	24
2.3.3	Tumor-assoziierte Autoantikörper.....	26
2.3.4	Klinische Bedeutung von Autoantikörpern.....	27
2.4	Zielsetzung dieser Arbeit	28
3	Material und Methoden	30
3.1	Material.....	30
3.1.1	Chemikalien und Puffer	30
3.1.2	Laborgeräte	31
3.1.3	Andere Materialien	31
3.1.4	Computersoftware und Webseiten	31
3.2	Patienten und gesunde Kontrollen.....	31
3.3	Methoden.....	35
3.3.1	Proteinmacroarray-Screening.....	35

3.3.2	Statistische Auswertung	39
4	Ergebnisse	48
4.1	Klassifikationsergebnisse	52
4.2	AUC-Auswertung klassifikationsrelevanter Klone.....	55
4.3	Frequenzanalyse der Autoantikörperantwort in den untersuchten Probandengruppen.....	61
5	Diskussion.....	68
5.1	Methodische Aspekte: Proteinmacroarray-Screening.....	68
5.2	Klassifikationsergebnisse	71
5.3	AUC-Auswertung klassifikationsrelevanter Klone.....	73
5.4	Frequenzanalyse der Autoantikörperantwort in den untersuchten Probandengruppen.....	78
5.5	Konklusion	82
6	Literaturverzeichnis.....	84
7	Publikationen	91
8	Danksagung	92
9	Lebenslauf.....	93

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Patientenkollektiv Myasthenia gravis.....	32
Tabelle 2	Patientenkollektiv Guillain-Barré-Syndrom	33
Tabelle 3	Patientenkollektiv Gesunde Kontrollen	34
Tabelle 4	Klassifikationsergebnisse	53
Tabelle 5	Quantitative Verteilung der Klone gemäß der errechneten AUC-Werte.....	56
Tabelle 6	Informativer in-frame-Klon der Klassifikation Myasthenie versus Gesunde.....	57
Tabelle 7	Informative out-of-frame-Klone der Klassifikation Myasthenie versus Gesunde	57
Tabelle 8	Informative in-frame-Klone der Klassifikation GBS versus Gesunde.....	58
Tabelle 9	Informative out-of-frame-Klone der Klassifikation GBS versus Gesunde.....	59
Tabelle 10	Frequenz von Autoantikörpern gegen immunogene Klone in den drei untersuchten Probandengruppen	62
Tabelle 11	Anzahl der Klone, gegen die bei Patienten mit Myasthenie bzw. GBS im Vergleich zu gesunden Kontrollen mindestens doppelt so häufig Antikörper gebildet wurden	63
Tabelle 12	In-frame-Klone, gegen die in Myasthenie-Seren signifikant häufiger Antikörper als in Kontroll-Seren vorliegen.....	65
Tabelle 13	Out-of-frame-Klone, gegen die in Myasthenie-Seren signifikant häufiger Antikörper als in Kontroll-Seren vorliegen.....	65
Tabelle 14	In-frame-Klone gegen die in GBS-Seren signifikant häufiger Antikörper als in Kontroll-Seren vorliegen	66
Tabelle 15	Out-of-frame-Klone, gegen die in GBS-Seren signifikant häufiger Antikörper als in Kontroll-Seren vorliegen	67

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Vektormap des verwendeten Vektors pQE30NST	36
Abbildung 2	Schematische Darstellung des Proteinmacroarray-Screenings	39
Abbildung 3	Receiver operator characteristics curve (ROC).....	45
Abbildung 4	Kreuzvalidierung und stratifizierte Permutation der Datenmenge.....	46
Abbildung 5	Proteinmacroarray, wie er im Rahmen des Screenings verwendet wurde.....	49
Abbildung 6	Verschiedene Möglichkeiten der Proteinexpression durch out- of-frame-Klone, am Beispiel des Klons G23538.....	51
Abbildung 7	Seroreaktivitäten hinsichtlich der informativen in-frame-Klone beider Klassifikationsszenarien	60

IV. Abkürzungsverzeichnis

α	alpha
AChR	Acetylcholinrezeptor
ADCC	Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
AIDP	Akute inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AUC	area under the ROC curve
CCP	cyclic citrullinated peptide
cDNA	complementary DNA
DNA	deoxyribonucleic acid
E. coli	Escherichia coli
EAMG	Experimentelle Myasthenia gravis
EAN	Experimentelle allergische Neuritis
EBV	Epstein-Barr-Virus
EOMG	early onset myasthenia gravis
EtOH	Ethanol
GBS	Guillain-Barré-Syndrom
HLA	Human leukocyte antigen
IL10	Interleukin 10
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
LOMG	late onset myasthenia gravis
MAC	membrane attack complex
MCV	mutated citrullinated vimentin
MG	Myasthenia gravis
MIR	main immunogenic region
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
MS	Multiple Sklerose
MuSK	muskelspezifische Tyrosinkinase
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
PVDF	Polyvinylidenfluorid

RNA	ribonucleic acid
ROC	receiver operator characteristics curve
RZPD	Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
SVM	support vector machine
TBS	Tris buffered saline
TNF α	Tumornekrosefaktor α
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSH	thyroid stimulating hormone

1 Zusammenfassung/Summary

1.1 Zusammenfassung

Die Myasthenia gravis (MG) ist eine seltene neurologische Erkrankung, die durch eine gestörte neuromuskuläre Erregungsübertragung gekennzeichnet ist, welche auf die Produktion pathogener Autoantikörper gegen die α -Untereinheit des nikotinischen Acetylcholinrezeptors (AChR) der muskulären Endplatte zurückgeht. Obwohl die Myasthenia gravis eine der am besten verstandenen Autoimmunerkrankungen darstellt, ist unklar, ob sich die humorale Immunantwort im Rahmen der MG auf ein einziges Zielantigen fokussiert oder ob die Produktion der AChR-Antikörper einen Teilaspekt eines global veränderten Autoantikörperprofils darstellt.

Das Guillain-Barré-Syndrom (GBS) ist der Prototyp einer immunvermittelten akuten peripheren Neuropathie. Auch wenn die Ätiopathogenese des GBS bislang ungeklärt ist, deuten verschiedene Studien auf eine Beteiligung humoraler Immunmechanismen hin.

Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Arbeit Autoantikörperprofile in Serumproben von Patienten mit MG (n=25) respektive GBS (n=22) im Vergleich zu gesunden Probanden (n=32) mit Hilfe eines 1827 Autoantigene umfassenden Proteinmacroarrays analysiert. Hierbei sollte geklärt werden, ob die so ermittelten globalen Autoantikörperprofile eine zuverlässige statistische Differenzierung von Patienten mit MG bzw. GBS von gesunden Probanden erlauben. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob bislang unbekannte Autoantigene existieren, gegen die sich eine humorale Immunantwort im Rahmen einer Myasthenia gravis bzw. eines Guillain-Barré-Syndroms richtet.

Die statistische Differenzierung der Probandengruppen wurde mit Hilfe einer Support Vector Machine samt linearem Kernel mit einer hundertfach wiederholten, nicht stratifizierten, zehnfachen Kreuzvalidierung durchgeführt und erbrachte hinsichtlich der Klassifikation MG versus Gesunde eine Sensitivität von 43,4%, eine Spezifität von 62,0% und eine statistische Genauigkeit von

53,9%. Die Klassifikation der GBS-Seren versus Gesunde erreichte eine Sensitivität von 30,5%, eine Spezifität von 67,3% und eine Genauigkeit von 52,3%. Insgesamt erlaubten die erstellten Seroreaktivitätsprofile somit weder eine zuverlässige statistische Differenzierung der MG- Patienten noch der GBS-Patienten von den Kontrollprobanden.

Um den Informationsgehalt einzelner Klone des Proteinmacroarrays hinsichtlich der erstellten Klassifikationen quantifizieren zu können, wurde für alle Klone die „area under the receiver operator characteristics curve (AUC)“ berechnet. Hierbei konnte ein informativer in-frame-Klon („*poly(A)binding protein, cytoplasmatic1*“) für die Klassifikation der MG-Seren versus der Normalseren und vier informative in-frame-Klone hinsichtlich der Klassifikation der GBS-Seren versus der gesunden Kontroll-Seren identifiziert werden („*tumor protein p53*“, „*metastasis associated 1*“, „*vimentin*“, „*amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 1*“). Die Antigene „*tumor protein p53*“ und „*vimentin*“, die den höchsten Informationsgehalt für die Klassifikation der GBS- versus der Kontroll-Seren besaßen, sind bereits im Kontext mit klassischen Autoimmunerkrankungen beschrieben.

Darüber hinaus wurden mittels eines cut-off-Wertes die Frequenzen positiver Seren gegen ein bestimmtes Antigen innerhalb der drei unterschiedlichen Gruppen bestimmt. Sowohl in der MG-Gruppe („*40S ribosomal protein S13*“, „*proteasome (prosome, macropain) subunit alpha type 1*“) als in der GBS-Gruppe („*tubulin beta 2A*“, „*ribosomal protein L29*“) fanden sich je zwei in-frame-Klone, gegen die in den Patienten- im Vergleich zu den entsprechenden Kontroll-Seren signifikant häufiger ($p < 0,05$) Autoantikörper vorlagen. Die Antigene „*ribosomal protein S13*“ und „*proteasome (prosome, macropain) subunit alpha type 1*“ wurden ebenfalls bereits bei anderen Autoimmunerkrankungen als potentielle Autoantigene identifiziert.

Zusammenfassend erlauben die hier ermittelten globalen Autoantikörperprofile keine Differenzierung von Patienten mit MG, GBS und gesunden Kontrollen. Hinsichtlich der MG können diese Befunde dahingehend interpretiert werden, dass die Autoantikörperproduktion bei Patienten mit MG einen rela-

tiv fokussierten antigenspezifischen Prozess darstellt, der im Wesentlichen auf den nikotinischen Acetylcholinrezeptor beschränkt bleibt. Darüber hinaus konnten jedoch sowohl bei Patienten mit MG als auch GBS zwei bislang unbekannte Antigene identifiziert werden, gegen die sich in der jeweiligen Patientengruppe signifikant häufiger als bei Gesunden Autoantikörper fanden. Inwiefern diese Autoantikörper in der Pathogenese der MG beziehungsweise des GBS tatsächlich relevant sind, ist in weiterführenden Studien zu klären.

1.2 Summary

Myasthenia gravis (MG) is an uncommon neurological disease characterised by failure of neuromuscular transmission. This failure of neuromuscular transmission results from the binding of autoantibodies to the α -subunit of the nicotinic acetylcholine receptor (AChR) at the neuromuscular junction.

Though MG is one of the best understood autoimmune syndromes, it is currently unknown whether the immune response occurring in MG is focused on a single target antigen, that is the AChR, or if the production of the anti-AChR-antibodies is only an aspect of a globally changed autoantibody profile in patients with MG.

Guillain-Barré-Syndrome (GBS) is considered the prototype of immune-mediated acute peripheral neuropathies. Although the exact pathogenesis of GBS is not elucidated yet, various studies suggest an involvement of humoral immune mechanisms.

In this work, we analysed autoantibody profiles in sera of patients with MG (n=25), GBS (n=22) and healthy controls (n=32) using a proteinmacroarray containing 1827 putative human autoantigens. We thereby wanted to investigate whether autoantibody signatures allow to differentiate patients with MG or GBS from healthy controls. Furthermore, we wanted to determine whether there are further, previously unknown autoantigens that are recognized by autoantibodies in the serum of MG or GBS patients.

The statistical differentiation of the experimental groups was carried out by a support vector machine with a linear kernel. Mean sensitivity, specificity and accuracy were calculated from 100 runs of a non-stratified, tenfold crossvalidation. The statistical differentiation of MG sera from healthy control sera showed a sensitivity of 43,4%, a specificity of 62,0 and an accuracy of 53,9%. The classification of GBS sera versus healthy control sera yielded a sensitivity of 30,5%, a specificity of 67,3% and accuracy of 52,3%. Altogether, the autoantibody profiles established by proteinmacroarray-screening thus do not allow to differentiate patients with MG or GBS from healthy controls.

To rank single antigens of the proteinmacroarray according to their information content for a classification task, the area under the curve (AUC) was computed for every clone. This identified one informative in-frame-clone („*poly(A)binding protein, cytoplasmatic1*“) for the classification of MG sera versus healthy control sera and four informative in-frame-clones („*tumor protein p53*“, „*metastasis associated 1*“, „*vimentin*“, „*amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 1*“) for the classification of GBS sera versus healthy control sera. The antigens „*tumor protein p53*“ and „*vimentin*“ which had the highest information content for the classification of GBS sera versus healthy control sera were already described in context of other classical autoimmune diseases.

In addition, by using a cut-off-point the frequencies of seroreactivity were computed against every antigen within the three different groups. In the MG group („*40S ribosomal protein S13*“, „*proteasome [prosome, macropain] subunit alpha type 1*“) and in the GBS group („*tubulin beta 2A*“, „*ribosomal protein L29*“) two in-frame-clones could be determined each which induced a humoral immune response significantly more often in patient`s sera than in healthy control sera. The antigens „*ribosomal protein S13*“ and „*proteasome [prosome, macropain] subunit alpha type 1*“ were already identified as potential autoantigens in the context of other autoimmune diseases as well.

In summary, global autoantibody profiles as determined in this work did not allow to differentiate patients with MG or GBS from healthy controls. These findings suggest that autoantibody production in patients with MG is a relatively focused antigen-specific process limited to the nicotinic AChR. However, in the group of patients with MG and GBS two antigens could be identified each that reacted significantly more often with patients` sera than with healthy control sera. Whether the identified autoantibodies are relevant for the pathogenesis of MG or GBS has to be examined in future studies.

2 Einleitung

2.1 Myasthenia gravis

Bei der Myasthenia gravis pseudoparalytica handelt es sich um eine Autoimmunerkrankung, die durch eine gestörte neuromuskuläre Erregungsübertragung charakterisiert ist.

Die Erstbeschreibung myasthener Symptome erfolgte bereits im Jahre 1672 durch den Oxforder Mediziner Thomas Willis in dessen Werk „De Anima Brutorum“, welches jedoch bis ins Jahr 1903 kaum Beachtung fand [1]. Die erste modernere Falldarstellung stammt von dem Londoner Arzt Samuel Wilks aus dem Jahre 1877 [1]. Der Heidelberger Wilhelm Erb sowie der Warschauer Neurologe Samuel Goldflam lieferten die umfassendsten Publikationen zur Myasthenia gravis, welche infolgedessen auch lange als Erb-Goldflam-Syndrom bezeichnet wurde [1]. Der Terminus Myasthenia gravis pseudoparalytica wurde schließlich 1895 durch den deutschen Mediziner Friedrich Jolly geprägt, der im Rahmen seiner elektrophysiologischen Untersuchungen erstmals das für die MG charakteristische Dekrement nachweisen konnte.

Die Inzidenz der autoimmunen Myasthenia gravis beträgt zwischen 0,25 und 2,0 pro 100.000 Einwohner: Sie stellt folglich eine relativ seltene Erkrankung dar. Die autoimmune MG kann sich prinzipiell in jedem Lebensalter manifestieren [2]. Abhängig vom Erkrankungsalter der betroffenen Patienten weist die Inzidenz geschlechtsspezifische Unterschiede auf. Während vor dem 40. Lebensjahr bevorzugt das weibliche Geschlecht betroffen ist, lassen sich ab dem 50. Lebensjahr signifikant erhöhte Inzidenzen für das männliche Geschlecht verzeichnen [2].

Klinisches Korrelat der gestörten Erregungsübertragung stellt eine abnorme, belastungsabhängige Ermüdbarkeit der Willkürmuskulatur dar. Diese nimmt typischerweise im Tagesverlauf zu und bildet sich – zumindest zu Beginn der Erkrankung – in Ruhe spontan zurück. Bei zwei Drittel der Patienten tritt die Myasthenia gravis initial mit okulären Symptomen in Form von Doppelbildern oder einer Ptosis in Erscheinung, um dann im weiteren Krankheitsverlauf zu generalisieren. Eine Beteiligung der Bulbärmuskulatur äußert sich in Kau-,

Schluck-, und Sprechstörungen. Schreitet der Prozess weiter fort, greift die Muskelschwäche auch auf Extremitäten- und Rumpfmuskulatur über. Kommt es zur Mitbeteiligung der Interkostalmuskulatur, droht die Gefahr einer beatmungspflichtigen respiratorischen Insuffizienz, der sogenannten myasthenen Krise.

Je nach klinischem Verlauf wird zwischen okulärer und generalisierter Myasthenia gravis unterschieden. Die okuläre Verlaufsform, die bei 10-20% der Patienten vorliegt, betrifft lediglich die äußeren Augenmuskeln einschließlich des M. levator palpebrae.

Ursächlich für die im Rahmen einer MG auftretende neuromuskuläre Transmissionsstörung ist die Bildung pathogener Autoantikörper, die sich gegen den an der muskulären Endplatte befindlichen nikotinischen Acetylcholinrezeptor (AChR) richten [3]. Es handelt sich hierbei um eine polyklonale Immunantwort: Die gebildeten Autoantikörper, die vorwiegend den Subklassen IgG1 und IgG3 angehören, treten mit multiplen antigenen Determinanten der verschiedenen AChR-Untereinheiten in Wechselwirkung [4]. Mehr als 50 Prozent der Acetylcholin-Rezeptor-Autoantikörper erkennen jedoch spezifisch das konformationsabhängige, am extrazellulären Apex der α_1 -Untereinheit des nikotinischen Acetylcholinrezeptors gelegene Hauptepitop (sogenannte MIR, *main immunogenic region*) [5].

Anhand eines Tiermodelles, der sogenannten experimentellen Myasthenia gravis (EAMG), konnten verschiedene Pathomechanismen identifiziert werden, mittels derer die Anti-AChR-Antikörper die neuromuskuläre Erregungsübertragung beeinträchtigen. Das verwendete Tiermodell geht auf experimentelle Studien von Patrick und Lindstrom aus dem Jahre 1973 zurück. Im Rahmen ihrer Untersuchungen konnten sie demonstrieren, dass sich bei Versuchskaninchen durch Injektion aus *Electrophorus electricus* (Zitteraal) stammender aufgereinigter Anti-AChR-Antikörper, die elektrophysiologischen, klinischen und immunologischen Kennzeichen einer MG induzieren ließen [6].

Die verschiedenen immunologischen Pathomechanismen, die man im Zusammenhang mit den für die MG charakteristischen Anti-AChR-Autoantikörpern diskutiert, sollen im Folgenden näher erläutert werden.

Ein bedeutender Mechanismus stellt die antikörpervermittelte Bindung und Aktivierung von Komplementfaktoren an der neuromuskulären Endplatte dar. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten an motorischen Endplatten von Patienten mit Myasthenia gravis Ablagerungen des Komplementfaktors 9 nachgewiesen werden [7]. An motorischen Endplatten an EAMG erkrankter Versuchstiere fanden sich zudem Ablagerungen aus IgG- und Komplementfaktor 3 bestehender Immunkomplexe [8]. Lennon et al. [9] konnten außerdem demonstrieren, dass eine Komplementverarmung, die zuvor durch Verabreichung von Cobra Factor (CoF) herbeigeführt wurde, die verwendeten Versuchstiere vor der Ausbildung einer EAMG schützt. Die durch die Autoantikörper induzierte Komplementaktivierung gipfelt letztlich in der Ausbildung des sogenannten *membrane attack complexes* (MAC). Dieser bedingt eine fokale Lyse der postsynaptischen Membran und damit eine veränderte Architektur derselbigen: Die charakteristischen postsynaptischen Auffaltungen werden reduziert, was eine verringerte Oberfläche und somit eine Abnahme der Acetylcholinrezeptordichte der postsynaptischen Membran zur Folge hat [10].

Alternativ sind die gebildeten Autoantikörper im Stande, eine Kreuzvernetzung benachbarter Acetylcholinrezeptormoleküle zu induzieren [11]. Die entstehenden Aggregate triggern wiederum eine beschleunigte Internalisierung und somit einen gesteigerten lysosomalen Abbau der Acetylcholinrezeptormoleküle [11]. Diesen Pathomechanismus, der auch als *antigenic modulation* bezeichnet wird, nutzen vorzugsweise diejenigen Autoantikörper, deren Epitope sich spezifisch gegen die main immunogenic region richten. Diese besitzen aufgrund ihrer Bindung an die MIR eine optimale Orientierung, um benachbarte AChR-Moleküle zu vernetzen und so deren Abbau im Sinne der oben beschriebenen *antigenic modulation* zu steigern.

Desweiteren können die gebildeten Autoantikörper einen pharmakologischen Block intakter Acetylcholinrezeptor-Moleküle bewirken. Obwohl dieser Pathomechanismus allgemein hin als selten gilt, könnte ihm dennoch eine nicht minder wichtige klinische Bedeutung zukommen [12]. In tierexperimentellen Untersuchungen rief die direkte Blockade der Acetylcholinbindungsstellen durch zuvor verabreichte monoklonale Antikörper eine akute, schwere Muskelschwäche bei Versuchstieren hervor. Die für die MG typischen entzündlichen Veränderungen der Muskelendplatte traten jedoch nicht auf [13].

Die Destruktion des postsynaptischen Faltenapparates, der Verlust funktionsfähiger Acetylcholinrezeptormoleküle oder auch deren verminderte Aktivität bedingen allesamt eine Reduktion des sogenannten *safety factors* der neuromuskulären Übertragung an der Endplatte. Auf Grund dessen sinkt das Endplattenpotential letztlich unter den Schwellenwert, der nötig wäre, um ein Aktionspotential zu generieren. Eine intakte neuromuskuläre Transmission, die wiederum die Grundvoraussetzung jeder adäquaten Muskelkontraktion darstellt, ist unter diesen Umständen nicht möglich.

Interessanterweise korreliert der absolute Anti-AChR-Antikörpertiter hierbei nicht mit der Schwere der Erkrankung [14]. Der individuelle Titerverlauf eines Patienten lässt hingegen Rückschlüsse auf Veränderungen des klinischen Zustandes zu [15].

Autoantikörper, die sich gegen den nikotinischen Acetylcholinrezeptor richten, sind bei circa 80-85% von an einer generalisierten Myasthenia gravis erkrankten Patienten nachweisbar [14]. Bei schätzungsweise 15-20% aller Patienten mit generalisierter Myasthenie lassen sich selbst mit empfindlichen Radioimmunoassays keine charakteristischen Autoantikörper gegen den nikotinischen Acetylcholinrezeptor detektieren [16]. Bei 70% dieser sogenannten seronegativen Patienten finden sich jedoch Autoantikörper gegen die in der motorischen Endplatte befindliche muskelspezifische Tyrosinkinase (MuSK) [17]. Als integraler Bestandteil des in der neuromuskulären Endplatte gelegenen Agrin-Rezeptors ist sie über komplexe Signaltransduktionswege

an der Clusterbildung von Acetylcholinrezeptormolekülen und anderer synaptischer Proteine, wie beispielsweise dem Rapsyn, beteiligt.

Bei Patienten, bei denen die Myasthenie paraneoplastisch in Assoziation mit einem Thymom auftritt, konnten zudem Autoantikörper gegen Titin und den Ryanodinrezeptor nachgewiesen werden [18]. In anderen Fällen interferieren die gebildeten Autoantikörper auch mit den Muskelproteinen Myosin und Aktin [19].

Die Produktion der für die MG charakteristischen pathogenen Autoantikörper stellt einen T-Zell-abhängigen Prozess dar. Hohlfeld et al. gelang erstmals der Nachweis AChR-spezifischer, autoreaktiver T-Lymphozyten im Blut von an MG erkrankten Patienten [20]. Die pathogenetische Bedeutung autoreaktiver T-Zellen konnte zudem in verschiedenen tierexperimentellen Transferversuchen demonstriert werden. An SCID-Mäusen, die zuvor mit Blutlymphozyten von Myastheniepatienten transplantiert worden waren, konnten nur dann die für die MG typischen klinischen und serologischen Befunde erhoben werden, wenn die transplantierten Zellen auch CD4+T-Zellen enthielten [21]. Ebenso war es bei Knockout-Mäusen, die gentechnisch so manipuliert wurden, dass die Expression funktioneller CD4+T-Zellen unterblieb, nicht möglich eine EAMG hervorzurufen [22]. Wie bei anderen Autoimmunerkrankungen wurde auch im Zusammenhang mit der MG eine Funktionsstörung regulatorischer T-Zellen beschrieben [23].

Zu erwähnen bleibt, dass interessanterweise auch im Blut vieler gesunder Personen AChR-spezifische T-Zellen zirkulieren, die jedoch keine klinisch signifikante Autoimmunreaktion initiieren [24].

Desweiteren geben histologische und biochemische Befunde Hinweise darauf, dass der Thymusdrüse eine Schlüsselrolle hinsichtlich der Initiierung autoimmuner Reaktionen im Rahmen der MG zukommt. In der Tat, können bei bis zu 75% der Patienten pathologische Alterationen der Thymusdrüse festgestellt werden. In 85% der Fälle handelt es sich dabei um eine lymphofollikuläre Thymitis. Bei 15% der Patienten besteht ein Thymom. Im Thymusmark befindliche myogene Zellen (Myoidzellen), exprimieren auf ihrer Ober-

fläche AChR [25]. Es wird spekuliert, dass die AChR thymischer Myoidzellen nach Prozessierung durch antigenpräsentierende Zellen autoreaktiven T-Zellen präsentiert werden, welche ihrerseits eine Aktivierung autoantikörperproduzierender B-Zellen vermitteln. Die Mechanismen, die hierbei unmittelbar zum Verlust der Selbsttoleranz und damit einhergehend zur Auslösung der Autoimmunreaktion führen, sind bisher ungeklärt.

Wie bei anderen Autoimmunerkrankungen konnte auch bei der Myasthenia gravis eine Assoziation mit bestimmten HLA Subtypen festgestellt werden. Unter anderem sind die HLA Allele B8, A1, DR3 und DW3 mit einem erhöhten Risiko verbunden, an Myasthenia gravis zu erkranken [22].

2.2 Guillain-Barré-Syndrom

Das Guillain-Barré-Syndrom (GBS) gilt als Prototyp einer immunvermittelten peripheren Neuropathie. Nach der Eindämmung der Poliomyelitis stellt das GBS die häufigste Ursache akuter, generalisierter Lähmungen in der westlichen Welt dar.

Die erste Fallbeschreibung eines vermutlich an Guillain-Barré-Syndrom erkrankten Patienten stammt von Jean Baptiste Octave Landry aus dem Jahre 1859 [26]. Während es sich bei der von Landry beschriebenen „paralysie ascendante aïgue“ um eine rein klinische Diagnose handelte, gelang es den französischen Neurologen Georges Guillain, Jean-Alexandre Barré und André Strohl im Jahre 1916 auch den für das GBS charakteristischen Liquorbefund die „dissociation cytoalbuminique“, eine erhöhte Eiweißkonzentration bei geringer oder fehlender Pleozytose, nachzuweisen. Im Rahmen der wöchentlichen Konferenz der „Société médicale des hôpitaux de Paris“ stellten sie ihre Studien an zwei Soldaten der französischen Armee vor, welche eine akute sensomotorische Parese samt Areflexie entwickelten, die sich jedoch spontan innerhalb einiger Wochen zurückbildete [27]. Vor diesem Hintergrund wurde 1927 auch die Bezeichnung „Guillain-Barré-Syndrom“ geprägt [28].

Seit der Erstbeschreibung konnten eine Reihe von Subtypen des Guillain-Barré-Syndroms identifiziert werden, die sich in Verlauf und Klinik unterscheiden. Den in Europa und Nordamerika vorherrschenden Subtyp reprä-

sentiert die akute inflammatorische demyelinisierende Polyradikuloneuropathie (AIDP) [29]. Sie stellt die akute Verlaufsform des GBS dar und soll im Fokus der weiteren Betrachtungen stehen.

Zu den anderen beschriebenen Unterformen zählen die akute motorische axonale Neuropathie (AMAN), die akute motorisch-sensible axonale Neuropathie (AMSAN) sowie das Miller-Fisher-Syndrom (MFS). Die chronische Verlaufsform des GBS trägt die Bezeichnung chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie (CIDP).

Die Inzidenz des GBS in Europa wird zwischen 1,2 und 1,9 pro 100.000 Einwohner angegeben [30, 31]. Weltweit gesehen, beträgt die Inzidenz zwischen 0,4 und 4 pro 100.000 Einwohner [32]. Männer sind bis zu 1,5 mal häufiger betroffen als Frauen. Bogliun et al. konnten zudem eine Korrelation zwischen Inzidenz und Erkrankungsalter der Patienten nachweisen [33]: Demnach lässt sich ein Anstieg der Inzidenz des GBS von 0,79 pro 100.000 bei den unter 35-jährigen Patienten auf 4,67 pro 100.000 bei den über 75-jährigen Patienten verzeichnen.

Klinisch imponiert die akute demyelinisierende Polyneuropathie durch symmetrisch auftretende, oft von distal nach proximal aufsteigende, generalisierte Paresen samt Areflexie. Eine autonome Mitbeteiligung ist häufig und kann sich in Form von kardialen Arrhythmien, Blutdruckschwankungen und Harnverhalt äußern. Bei bis zu 25% der Patienten ist aufgrund einer respiratorischen Insuffizienz eine künstliche Beatmung erforderlich [34].

Bei zwei Dritteln der GBS-Erkrankungen kann eine vorausgehende Infektion diagnostiziert werden, die sich bis zu sechs Wochen vor dem eigentlichen Erkrankungsbeginn manifestiert. Vorwiegend handelt es sich dabei um respiratorische Infektionen sowie um gastrointestinale Infekte [35]. Häufigstes infektiöses Agens der gastrointestinalen Infektionen stellt dabei *Campylobacter jejuni* dar, der sich in 30-40% der Fälle nachweisen lässt [36]. Andere Erreger, die im Verdacht stehen als Triggerfaktoren für eine GBS-Erkrankung zu fungieren, sind beispielsweise das Epstein-Barr-Virus, das Zytomegalovirus sowie *Mycoplasma pneumoniae* [37].

Desweiteren wurde immer wieder über einen kausalen Zusammenhang zwischen der Verabreichung verschiedener Impfstoffe und dem Auftreten des Guillain-Barré-Syndromes spekuliert. Aktuell existiert jedoch keine Studie, die diese Hypothesen ausreichend statistisch belegen kann [38]. Ebenso konnten bisher kein statistischer Beweis für eine erhöhte Inzidenz des GBS nach Operationen erbracht werden [39].

Das typische histologische Bild der akuten inflammatorischen Polyneuropathie ist durch eine multifokal auftretende mononukleäre Zellinfiltration des gesamten peripheren Nervensystems gekennzeichnet, die letztlich eine segmentale Demyelinisierung der peripheren Nerven zur Folge hat. Die Lokalisation der inflammatorischen Läsionen korreliert dabei direkt mit dem Muster der neurologischen Ausfallerscheinungen [40].

Die charakteristischen zellulären Infiltrate setzen sich hauptsächlich aus Lymphozyten und Makrophagen zusammen. Der beschriebene Myelinverlust ist dabei insbesondere auf die pathologische Aktivität der Makrophagen zurückzuführen: Nachdem diese die Basalmembran der Nervenfasern durchdrungen haben, wandern sie in die zuvor intakten Myelinschichten ein und lösen diese von den Axonen ab [41]. Die Myelinschichten können im Verlauf regenerieren. In schweren Fällen induzieren die inflammatorischen Prozesse jedoch eine sekundäre, axonale Degeneration, welche irreversibel ist.

Durch Studien am Tiermodell des Guillain-Barré-Syndromes, der sogenannten experimentellen allergischen Neuritis (EAN), hat man versucht die der immunvermittelten Demyelinisierung zu Grunde liegenden Pathomechanismen näher zu klären. Waksman und Adams verwiesen erstmals auf die Analogie zwischen den histopathologischen Befunden der AIDP und derer der EAN, die experimentell durch aktive Immunisierung mit einem Homogenisat peripherer Nerven und Freund's Adjuvans bei Versuchstieren hervorgerufen werden konnte [42].

Dennoch sind die immunologischen Mechanismen, die die zielgerichtete Einwanderung der Makrophagen in peripheres Nervengewebe bedingen,

nicht vollständig geklärt. Es werden jedoch verschiedene Erklärungsansätze diskutiert, die im Folgenden näher erläutert werden sollen.

Gemäß einer dieser Hypothesen nehmen aktivierte autoreaktive T-Zellen, die sich gegen ein spezifisches Epitop auf der Oberfläche der Schwann-Zellen oder aber der Myelinscheiden richten, eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der akuten inflammatorischen Polyneuropathie ein. Diese aktivierten T-Zellen müssen zunächst die Blut-Nerven-Schranke penetrieren, um ins periphere Nervensystem zu gelangen. Dort bewirken sie durch die Sezernierung proinflammatorischer Zytokine eine Rekrutierung respektive Aktivierung von Makrophagen. Diese setzen wiederum toxische Mediatoren wie beispielsweise Stickstoffmonoxid (NO), verschiedene Matrix Metalloproteinasen (MMPs) und proinflammatorische Zytokine frei, welche letztlich die Myelinschichten der Axone nachhaltig schädigen [43, 44].

Gestützt wird diese Hypothese durch verschiedene Beobachtungen. Bereits in frühen Stadien der AIDP lassen sich dichte T-Zellinfiltrate nachweisen [45]. Diese sind selbst in Biopsaten des Nervus suralis zu finden, welcher zu den mit am spätesten von der Neuropathie betroffenen Nerven gehört [46]. Zudem konnten bei an GBS erkrankten Patienten erhöhte Serumkonzentrationen des human leucocyte antigens (HLA)-DR, des Transferrinrezeptors (TFR) sowie des Interleukin-2-Rezeptors (IL2R) festgestellt werden [47, 48]. Eine vermehrte Expression dieser Parameter dient als Indikator für das Vorhandensein aktivierter T-Zellen.

Weitere Indizien für die pathogenetische Bedeutung aktivierter T-Zellen, erbrachten verschiedene tierexperimentelle Studien. Anhand derer konnte gezeigt werden, dass die Immunisierung mit autoreaktiven T-Zelllinien gegen die Myelinbestandteile P0, P2 und PMP22 eine EAN bei den verwendeten Versuchstieren induzierte [49].

Alternativ wird die Bedeutung der humoralen Immunantwort hinsichtlich der Ätiopathogenese der akuten inflammatorischen demyelinisierenden Polyneuropathie diskutiert. Die mitunter rapide Verbesserung der klinischen Symptomatik nach Plasmapheresebehandlungen und der Gabe intravenöser Im-

munglobuline spricht für eine Mitbeteiligung humoraler Faktoren. Im Fokus dieser Hypothesen stehen Autoantikörper, deren Epitope sich gegen spezifische Antigene in der äußeren Schwannzellmembran richten. Komplementvermittelt sollen diese eine bläschenförmige Ablösung der Schwannzellmembran induzieren und somit letztlich eine Demyelinisierung der Axone herbeiführen.

In Plasma- und Liquorproben an GBS erkrankter Patienten ließen sich erhöhte Konzentrationen verschiedener Komplementkomponenten nachweisen [50]. Zudem konnten Hafer-Macko et al. an entsprechenden Nervenbiopsaten Ablagerungen der Komplementfaktoren C3d und des terminalen lytischen Komplexes (C5b-9) auf den äußeren Oberflächen der Schwannzellen demonstrieren [51]. Da die typische vesikuläre Degeneration der betroffenen Myelinschichten bereits vor der Einwanderung der Makrophagen einsetzte, legt dies die Vermutung nahe, dass zumindest einige der Formen der AIDP im Wesentlichen durch Komplementaktivierung vermittelt werden.

Noch unklar ist, gegen welche Zielstrukturen sich die vermuteten Autoantikörper dabei richten.

Während bei anderen Unterformen des Guillain-Barré-Syndromes – im Besonderen beim Miller-Fisher-Syndrom – eine Assoziation mit Autoantikörpern gegen bestimmte Gangliosidepitope festgestellt werden konnte, ließ sich für die AIDP bisher keine charakteristische Anti-Gangliosid-Antikörper-Konstellation identifizieren [52]. Es stellt sich folglich die Frage, ob weitere, bisher unbekannte Anti-Gangliosid-Antikörper existieren, denen eine pathogenetische Bedeutung im Rahmen einer AIDP zukommt oder aber ein gänzlich anderer Mechanismus für die Pathogenese der AIDP ursächlich ist.

2.3 Allgemeine Bedeutung von Autoantikörpern

Als Autoantikörper werden Immunglobuline bezeichnet, deren Epitope sich gegen körpereigene Antigene (Autoantigene) richten. Charakteristischerweise treten sie im Rahmen von Autoimmunerkrankungen auf. Ihr Vorkommen ist jedoch nicht alleinig auf diese beschränkt. So werden Autoantikörper beispielsweise auch infolge massiver Gewebeschäden nachgewiesen. Darüber

hinaus konnte eine Vielzahl tumor-assoziiertes Autoantikörper identifiziert werden. Erwähnenswert in diesem Zusammenhang sind auch die natürlichen Autoantikörper, die sich in Seren gesunder Individuen detektieren lassen und im Organismus wichtige physiologische Funktionen erfüllen.

In den folgenden Abschnitten sollen einige dieser Teilaspekte dargestellt und abschließend auf die Bedeutung der Autoantikörper als diagnostische und prognostische Biomarker eingegangen werden.

2.3.1 Natürliche Antikörper

Als natürliche Antikörper werden Immunglobuline bezeichnet, die in Organismen gesunder Individuen produziert werden, ohne dass zuvor eine Immunisierung gegen ein entsprechendes Zielantigen stattgefunden hat. Natürliche Antikörper konnten inzwischen bei allen Vertebraten nachgewiesen werden [53]. Ihre Produktion unterliegt hauptsächlich einer sich autonom vermehrenden Subpopulation von B-Zellen, den sogenannten B-1-Zellen oder auch CD5⁺B-Zellen [54]. Zum größten Teil handelt es sich dabei um Immunglobuline vom IgM-Isotyp. Daneben sind aber auch die Immunglobulin-Klassen IgG und IgA vertreten. Natürliche Autoantikörper sind hauptsächlich polyreaktiv und somit in der Lage ein breites Spektrum körpereigener sowie fremder Antigene zu binden [55]. Die natürlich vorkommenden IgM-Autoantikörper verfügen lediglich über eine mäßige Bindungsaffinität. Aufgrund ihrer pentameren Struktur kann diese jedoch mit einer hohen Avidität (Gesamtbindungsstärke eines multivalenten Moleküls) kompensiert werden [56].

Wie bereits angedeutet, erfüllen diese Antikörper mitunter wichtige physiologische Funktionen. Eine wesentliche Bedeutung kommt den natürlichen Autoantikörpern hinsichtlich der „first line defense“ gegenüber Pathogenen wie beispielsweise Bakterien und Viren zu: Durch Opsonierung infektiöser Partikel erleichtern sie deren Phagozytose durch Neutrophile und Makrophagen. Zudem können sie die direkte Lyse der Pathogene durch Aktivierung des klassischen Komplementweges einleiten. Darüber hinaus sind sie auch im Stande bakterielle Endotoxine zu neutralisieren [57].

Eine weitere Funktion der natürlichen Autoantikörper besteht in der Beseitigung von Stoffwechselabbauprodukten und alterierten Zellen und damit einhergehend in der Protektion des Organismus vor der Induktion pathologischer Autoimmunreaktionen [58]. Von apoptotischen Zellen freigesetzte Proteine fungieren unter Umständen als Autoantigene und können infolgedessen eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems im Sinne einer Autoimmunantwort hervorrufen [59]. Durch die Elimination zirkulierender, antigener Stimuli aus dem Organismus tragen die natürlichen Antikörper somit wesentlich zur Homöostase des Immunsystems bei.

In welcher Beziehung die natürlichen Antikörper zu den im Rahmen einer Autoimmunerkrankung gebildeten, pathologischen Autoantikörpern stehen, ist bislang unklar. Diskutiert wird in diesem Zusammenhang, dass somatische Mutationen und Isotopenwechsel eine Transformation mäßig affiner und wenig spezifischer natürlicher IgM-Antikörper in die für Autoimmunerkrankungen charakteristischen, hochaffinen, spezifischen IgG- und IgA-Antikörper bedingen [60]. Unter gewissen Umständen könnten natürliche Autoantikörper folglich als Vorlage für die Produktion hochaffiner, pathogener Autoantikörper dienen. Die Bedingungen, die eine Produktion derartiger, autoreaktiver Immunglobuline ermöglichen und damit einhergehend einen Verlust der Selbsttoleranz auslösen, sind bisher nicht näher definiert.

2.3.2 Autoantikörperproduktion im Rahmen von Autoimmunerkrankungen

Im Folgenden sollen einige Effektormechanismen, mittels derer die pathogenen Autoantikörper Zell- und Gewebeschädigungen hervorrufen, exemplarisch anhand der häufigsten Autoimmunerkrankungen erläutert werden.

Ein möglicher Pathomechanismus besteht darin, dass Autoantikörper gezielt an Zelloberflächenantigene binden, um nachfolgend eine zytotoxische Destruktion der zugehörigen Zelle einzuleiten. Die Elimination der Zielzellen kann hierbei entweder durch Komplementaktivierung, antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) oder aber durch Phagozyten des retikuloendothelialen Systems vermittelt werden.

Die autoimmune hämolytische Anämie ist beispielsweise durch die Produktion von IgG- und IgM-Autoantikörpern charakterisiert, welche an Autoantigene auf der Oberfläche von roten Blutkörperchen binden. Insbesondere die IgM Autoantikörper, die sogenannten Kälteagglutinine, fixieren effizient Komplement an der Zelloberfläche der Erythrozyten. Dadurch kommt es zur Formation des membranangreifenden Komplexes auf den Erythrozyten, was wiederum deren intravasale Hämolyse bedingt.

Die antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) ermöglicht Antikörpern durch Bindung an den F_c -Rezeptor einen antigenspezifischen Angriff der zugehörigen Effektorzelle einzuleiten, die selbst keine Spezifität für das Zielantigen besitzt. Typischerweise handelt es sich bei den Effektorzellen um natürliche Killerzellen. Die Bindung an das F_c -Fragment des Antikörpers stimuliert die Effektorzelle zur Freisetzung zytoplasmatischer Granula, die Perforin und Granzyme enthalten, und eine zytotoxische Destruktion der Zielzelle bewirken. Anti-Thyreoperoxidase Autoantikörper, die bei bis zu 90% der Patienten mit Hashimoto-Thyreoiditis auftreten, vermitteln eine Zerstörung des Schilddrüsengewebes nachgewiesenermaßen durch ADCC [61].

Desweiteren können an Autoantikörper gebundene Zielzellen durch F_c -Rezeptor tragende Makrophagen schnell aus dem Blutkreislauf eliminiert werden. Die im Rahmen der hämolytischen Anämie gebildeten IgG-Antikörper, die sogenannten Wärmeantikörper, bewirken vorzugsweise über diesen Mechanismus eine Destruktion roter Blutkörperchen, die sich klinisch letztlich in einer Anämie äußert [62].

Patienten mit autoimmuner thrombozytopenischer Purpura entwickeln thrombozytenspezifische IgG-Antikörper, die sich gegen den Glykoprotein(GP)-2a/3a Fibrinogenrezeptor der Thrombozyten bzw. deren Vorstufen im Knochenmark richten. Diese führen ebenfalls über F_c -Rezeptortragende Makrophagen eine gesteigerte Phagozytose der Thrombozyten in Leber und Milz herbei [63].

Bei anderen Autoimmunerkrankungen, wie beispielsweise dem systemischen Lupus erythematosus (SLE), lassen sich die Gewebeschäden auf Immun-

komplexe zurückführen, welche sich an der Synovialmembran, in den Nierenglomeruli oder am Gefäßendothel anderer Organgebiete ablagern. Die präzipitierten Immunkomplexe triggern unter anderem eine Aktivierung der Komplementkaskade, die eine lokale Entzündungsreaktion hervorruft [64]. Einwandernde Phagozyten bewirken letztlich eine Gewebedestruktion, die sich klinisch in Form von Arthritiden, Glomerulonephritiden oder auch Vasculitiden äußert.

Ein weiterer Pathomechanismus, der jedoch primär keine Gewebeschädigung nach sich zieht, stellt die Blockade oder Stimulation eines Rezeptormoleküles durch entsprechende Autoantikörper dar. Ein klassisches Beispiel hierfür ist der Morbus Basedow (Graves` Disease) [65]: Ursächlich sind Autoantikörper, deren Epitope sich gegen den TSH (thyroid stimulating hormone) -Rezeptor richten und aufgrund ihrer agonistischen Wirkung eine Dauerstimulation desselben bewirken. Dies hat wiederum eine Überproduktion von Schilddrüsenhormonen zur Folge, welche sich klinisch als Hyperthyreose manifestiert.

Antikörper, die mit Autoimmunerkrankungen assoziiert sind, richten sich hierbei nicht durchweg gegen extrazelluläre Antigene. Der systemische Lupus erythematosus ist beispielsweise durch eine chronische Produktion von Antikörper gegen DNA (dsDNA-AK, ssDNA-AK), Histone (Anti-Histon-AK) und Ribonucleoproteine (Anti-Ro-AK, Anti-La-AK) charakterisiert, welche aus apoptotischen Zellen und geschädigtem Gewebe in den Blutkreislauf freigesetzt wurden. Im Rahmen der primären biliären Zirrhose werden ebenfalls Antikörper gegen intrazelluläre Antigene produziert. In diesem Falle handelt es sich um Autoantikörper, die sich gegen Antigene der inneren Mitochondrienmembran richten. Sie werden auch als antimitochondriale Antikörper (AMA) bezeichnet [66].

2.3.3 Tumor-assoziierte Autoantikörper

Im Rahmen von Krebserkrankungen kommt es zur Produktion autoreaktiver Antikörper, welche sich gegen sogenannte tumor-assoziierte Antigene richten. Tumor-assoziierte Antigene werden auf Tumorzellen besonders stark

exprimiert. Auf normalen Zellen sind sie hingegen nicht oder nur in geringen Mengen vorhanden.

Ein bedeutendes tumor-assoziiertes Antigen ist das p53. In seiner Funktion als sogenanntes Tumorsuppressorprotein arretiert es bei DNA-Schädigungen den Zellzyklus, um entweder eine Reparatur des DNA-Schadens zu ermöglichen oder gegebenenfalls eine Apoptose der betreffenden Zelle zu induzieren.

In über 50% aller Tumorerkrankungen kann eine Mutation des p53 nachgewiesen werden. Die verlängerte Halbwertszeit des mutierten p53 führt letztlich zu dessen Akkumulation im Zellkern der neoplastischen Zelle. Der anti-p53-Antikörpertiter korreliert hierbei mit der Akkumulation des mutierten Proteins in der Zelle [67]. Das Auftreten der anti-p53-Antikörper impliziert eine schlechte Prognose bei verschiedenen Tumoren unter anderem bei Ovarialkarzinomen und kolorektalen Karzinomen [68, 69].

Ein weiteres tumorassoziiertes Autoantigen stellt das epitheliale Mucin MUC1 dar. Es zeichnet sich durch eine Überexpression auf circa 90% aller Adenokarzinome aus. Immunologische Relevanz gewinnt das tumor-assoziierte Antigen durch eine veränderte posttranslationale Modifikation in der neoplastischen Zelle, die eine Unterglykolysierung des MUC1 zur Folge hat. Im Gegensatz zum p53 korreliert ein Nachweis von anti-MUC1-Antikörpern mit einer guten Prognose für viele Tumorerkrankungen wie beispielsweise für Magen- oder Pankreaskarzinome [70, 71].

2.3.4 Klinische Bedeutung von Autoantikörpern

Der Nachweis bestimmter Autoantikörper bzw. deren Quantifizierung ist nicht nur von diagnostischem Nutzen sondern liefert unter Umständen auch wichtige Informationen hinsichtlich der Prognose einer Erkrankung. Bei Patienten mit rheumatoider Arthritis sind die sogenannten anti-CCP-(cyclic citrullinated peptide) Antikörper im Mittel 4,5 Jahre vor Erkrankungsbeginn im Serum nachweisbar [72]. Autoantikörper, die im Rahmen des systemischen Lupus erythematosus gebildet werden, besitzen ebenfalls einen hohen prädiktiven Wert: Arbuckle et al. zufolge lassen sich bereits 3 bis 4 Jahre vor Symptom-

beginn charakteristische Autoantikörper in Seren an SLE erkrankter Patienten detektieren [73]. Bei schwangeren Frauen, die an SLE erkrankt sind, ist der Nachweis von anti-Ro und anti-La- Antikörpern zudem mit einem signifikanten Risiko für die Entwicklung eines neonatalen Lupus mit begleitendem kongenitalen Herzblock assoziiert [74]. In einigen Fällen fungieren die nachgewiesenen Autoantikörper auch als Marker für die Krankheitsaktivität sowie für die organspezifische klinische Manifestation einer Erkrankung [75].

2.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Myasthenia gravis zählt als organspezifisches, humoral vermitteltes und T-zellabhängiges Krankheitsbild zu den mit am besten verstandenen Autoimmunerkrankungen. Dennoch sind die der MG zugrunde liegenden Immunmechanismen, die letztlich zur Produktion autoreaktiver Antikörper gegen den nikotinischen Acetylcholinrezeptor führen, bislang unbekannt. Zudem bleibt bisher unklar, ob sich die im Rahmen der Myasthenia gravis manifestierende Immunantwort auf ein einzelnes Zielantigen beschränkt oder ob die Produktion der AChR-Antikörper lediglich als Teilaspekt eines global veränderten Autoantikörperprofils bei an MG erkrankten Patienten zu verstehen ist.

Überdies wurden bei Patienten mit Myasthenia gravis auch Autoantikörper gegen andere Antigene wie beispielsweise die muskelspezifische Tyrosinkinase (MuSK) [17], den Ryanodinrezeptor, Titin [18] und Myosin [19] nachgewiesen.

Daneben sollte auch das Guillain-Barré-Syndrom als Prototyp immunvermittelter Neuropathien betrachtet werden. Hinsichtlich der Pathogenese des Guillain-Barré-Syndromes existieren ebenfalls klare Hinweise auf eine Beteiligung humoraler Immunmechanismen. Verschiedene Unterformen des Guillain-Barré-Syndromes sind mit einer charakteristischen Autoantikörperproduktion gegen bestimmte körpereigene Gangliosidepitope assoziiert. Für die akute Verlaufsform des GBS, die akute demyelinisierende Polyneuropathie, konnte bislang jedoch kein spezifisches Anti-Gangliosid-Autoantikörperprofil ermittelt werden.

Vor diesem Hintergrund sollten mit Hilfe eines 1827 potentielle humane Autoantigene umfassenden Proteinmacroarrays Autoantikörperprofile in Serumproben von Patienten mit MG und GBS im Hinblick auf folgende Fragestellungen analysiert werden:

- Erlauben die anhand des Proteinmacroarray-Screenings erstellten Autoantikörperprofile eine statistische Differenzierung der MG-Patienten beziehungsweise der GBS-Patienten von gesunden Kontrollen?
- Lassen sich bisher unbekannte Zielantigene identifizieren, gegen die im Rahmen einer Myasthenia gravis beziehungsweise eines Guillain-Barré-Syndromes Autoantikörper gebildet werden?

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es somit, Erkenntnisse zu Autoantikörperprofilen bei MG- und GBS-Patienten zu erhalten. Im weiteren Sinne sollten anhand dieser Informationen mögliche Hinweise auf die Ätiopathogenese dieser neurologischen Krankheitsbilder gewonnen werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Puffer

96% EtOH

Aqua dest.

1*TBS-Puffer:

150 mM NaCl

10 mM Tris-HCl, pH=7,5

1*TBST-Puffer(TBS+Tween):

500 mM NaCl

20 mM Tris-HCl, pH=7,5

0,05 % Tween 20

1*TBST-T-Puffer(TBS+Tween+TritonX-100):

500 mM NaCl

20 mM Tris-HCl, pH=7,5

0,05 % Tween 20

0,5 % Triton X-100

Blocking solution:

1* TBST-T

3% Milchpulver

Stripping solution:

65,5 mM Tris-HCl, pH=6,8

2% SDS

Sekundärer Antikörper:

Cy[™]5-conjugated AffiniPure Rabbit Anti-Human IgA+IgG+IgM(H+L) Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.

3.1.2 Laborgeräte

Tischwaage Sartorius Basic
Magnetrührer Ikamag® RCT
pH-Meter A. Hartenstein
Plattformschüttler Celloshaker Variospeed Variotime Renner GmbH
Typhoon-Scanner (GE Healthcare)

3.1.3 Andere Materialien

Kimwipes Kimtech Science
Whatmanpapier Roth®
Plastikwannen
RZPD Proteinmacroarrays

3.1.4 Computersoftware und Webseiten

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Programme verwendet:

- Windows Vista™ Home Premium
- MS Office Home and Student 2007 (MS WORD 2007, MS EXCEL 2007, MS ACCESS 2007)
- Der Fisher Exact Probability Test wurde mit Hilfe der Webseite <http://faculty.vassar.edu/lowry/odds2x2.html> durchgeführt.
- ExPASy Proteomics Server: <http://www.expasy.ch/tools/dna.html>
- Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> (Literaturrecherche und Sequenzdatenbank)
- EndnoteX2 (Literaturverwaltung)

3.2 Patienten und gesunde Kontrollen

Die Serumproben der an Myasthenia gravis erkrankten Patienten (n=25) wurden im Rahmen einer Kooperation von Herrn Dr. med. Björn Tackenberg, Oberarzt der Neurologischen Klinik der Philipps-Universität Marburg, zur Verfügung gestellt. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 43,6 Jahre. Die männlichen Probanden (n=8) wiesen hierbei ein Durchschnittsalter von 57,6 Jahren auf. Das Durchschnittsalter der weiblichen Probanden (n=17) betrug 37,0 Jahre. Die Blutprobenentnahme der an Myasthenie erkrankten Patienten sowie deren Verwendung zu wissenschaftlichen Zwecken wurde durch ein entsprechendes Votum der Ethikkommission der medizinischen Fakultät Marburg genehmigt. Dieses berücksichtigt explizit die Versendung von Pro-

benmaterial im Zuge wissenschaftlicher Kooperationen. Alle teilnehmenden Patienten haben zudem ihr schriftliches Einverständnis gegeben. Das Patientenkollektiv umfasst dabei sowohl Patienten mit Erkrankungsbeginn vor dem 45. Lebensjahr (=early onset myasthenia gravis, EOMG) als auch Patienten, die erst nach dem 45. Lebensjahr an Myasthenia gravis erkrankten (=late onset myasthenia gravis, LOMG). Zu erwähnen bleibt, dass 56% der untersuchten Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme mit Mestinon oder Kalymin behandelt wurden.

Tabelle 1 Patientenkollektiv Myasthenia gravis

(Durchschnittsalter: 43,6 Jahre; 8 ♂ \bar{x} =57,6 Jahre, 17 ♀ \bar{x} =37,0 Jahre)

Laborschlüssel	Erkrankungsbeginn	Alter (Jahre)	Geschlecht
M1	LOMG	56,4	m
M2	LOMG	58,9	m
M3	LOMG	65,6	m
M4	EOMG	19,8	w
M5	EOMG	25,0	w
M6	EOMG	25,6	w
M7	EOMG	29,7	w
M8	EOMG	33,1	w
M9	EOMG	35,7	w
M10	EOMG	36,4	w
M11	EOMG	40,4	w
M12	EOMG	42,8	w
M13	EOMG	16,2	w
M14	EOMG	22,6	w
M15	EOMG	22,7	w
M16	EOMG	22,8	w
M17	EOMG	30,8	w
M19	LOMG	52,9	w
M20	EOMG	22,4	m
M21	EOMG	30,6	m
M22	LOMG	74,0	m
M23	LOMG	71,6	m
M24	LOMG	81,4	m
M25	LOMG	85,1	w
M26	LOMG	86,8	w

Die klinischen Daten der 25 Probanden wurden den Patientenakten entnommen (s. Tabelle 1, S. 32). Um das Patientenkollektiv so homogen wie möglich zu gestalten, wurden ausschließlich Patienten mit generalisierter Myasthenie in die Untersuchung einbezogen. Des Weiteren wurden bei der Rekrutierung geeigneter Probanden lediglich Patienten berücksichtigt, deren

Seren positiv auf Autoantikörper gegen den nikotinischen Acetylcholin-Rezeptor getestet worden waren. Somit waren alle in unserer Studie untersuchten Patienten Acetylcholin-Rezeptor-Antikörper positiv. Es sollte zudem hervorgehoben werden, dass in die Untersuchung ausschließlich Patienten mit Myasthenie eingeschlossen wurden, die bis zum Zeitpunkt der Blutentnahme keinerlei immunsuppressive Behandlung erhalten hatten. Durch dieses strenge Einschlusskriterium sollte eine Verfälschung der erhobenen Daten durch eine im Rahmen einer MG oftmals verabreichte immunsuppressive Medikation unterbunden werden.

Tabelle 2 Patientenkollektiv Guillain-Barré-Syndrom

(Durchschnittsalter: 52,5 Jahre, 9 ♂ \bar{x} =63,1 Jahre, 13 ♀ \bar{x} =45,2 Jahre)

Laborschlüssel	Therapie	Alter (Jahre)	Geschlecht
G1		47,9	m
G2		60,0	m
G3		66,0	m
G4	Plasmapherese	20,4	w
G5		26,2	w
G6		27,8	w
G7		28,5	w
G8		33,6	w
G9		34,7	w
G10		37,4	w
G11		38,8	w
G12		46,1	w
G13		61,9	m
G14		43,0	m
G15		64,2	m
G16		70,7	m
G17	Plasmapherese	70,9	m
G18		83,1	m
G19		81,2	w
G20		70,8	w
G21		73,5	w
G22		68,1	w

Das Probenmaterial wurde von Marburg nach Homburg auf Trockeneis verschickt und am Universitätsklinikum Homburg bei -20°C asserviert.

Die untersuchten Proben der an Guillain-Barré-Syndrom erkrankten Patienten (n=22) entstammen der Liquor/Serumbank der Neurologischen Klinik des Universitätsklinikums Homburg unter der Leitung von Professor Dr. med. Klaus Fassbender. Die klinischen Angaben zu den Patienten wurden ebenfalls den Patientenakten entnommen (s. Tabelle 2, S. 33). Das Durch-

schnittsalter der untersuchten Patienten betrug 52,5 Jahre. Die männlichen Probanden (n=9) waren durchschnittlich 63,1 Jahre alt. Die weiblichen Probanden (n=13) wiesen ein Durchschnittsalter von 45,2 Jahren auf. Zu betonen bleibt, dass auch in diesem Fall nur Patienten untersucht wurden, die zum Zeitpunkt der Blutentnahme und zuvor keinerlei medikamentöse immunsuppressive Therapie erhalten hatten. Allerdings erfolgte die Blutentnahme bei zwei Patienten nach einer (Patient G4) bzw. zwei (Patient G17) Plasmapheresebehandlungen.

Die Serumproben der gesunden Kontrollen (n=32) entstammen der Serumbank des Instituts für klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikum Homburg (s. Tabelle 3, S. 34). Sie wurden aus Serumgel-Monovetten gewonnen und bei -70°C asserviert. Die Verwendung der Kontroll-Seren wurde durch ein Ethikvotum der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes genehmigt. Darüber hinaus lag von allen Kontrollpersonen eine schriftliche Einverständniserklärung vor. Das Durchschnittsalter der gesunden Kontrollprobanden betrug 42,2 Jahre. Die männlichen Probanden (n=11) wiesen ein Durchschnittsalter von 51,6 Jahren auf. Die weiblichen Probanden (n=21) waren im Mittel 37,3 Jahre alt.

Tabelle 3 Patientenkollektiv Gesunde Kontrollen

(Durchschnittsalter: 42,2 Jahre, 11 ♂ \bar{x} =51,6 Jahre, 21 ♀ \bar{x} =37,3 Jahre)

Kontrolle	Geschlecht	Alter (Jahre)
N19	w	19,5
N236	w	20,3
N255	w	22,3
N7	m	22,4
N114	w	22,9
N17	w	23,2
N267	w	25,7
N186	w	27,7
N11	w	28,4
N90	m	30,6
N214	w	30,9
N10	w	33,7
N3	w	34,4
N104	w	37,3
N219	w	38,7
N181	w	40,4

Kontrolle	Geschlecht	Alter (Jahre)
N35	m	43,0
N97	w	46,6
N240	m	47,9
N33	w	52,9
N233	w	53,8
N84	w	53,9
N217	w	55,9
N160	w	56,2
N161	m	58,0
N258	m	58,0
N168	w	58,8
N162	m	59,0
N141	m	60,5
N9	m	61,1
N198	m	62,6
N136	m	64,7

3.3 Methoden

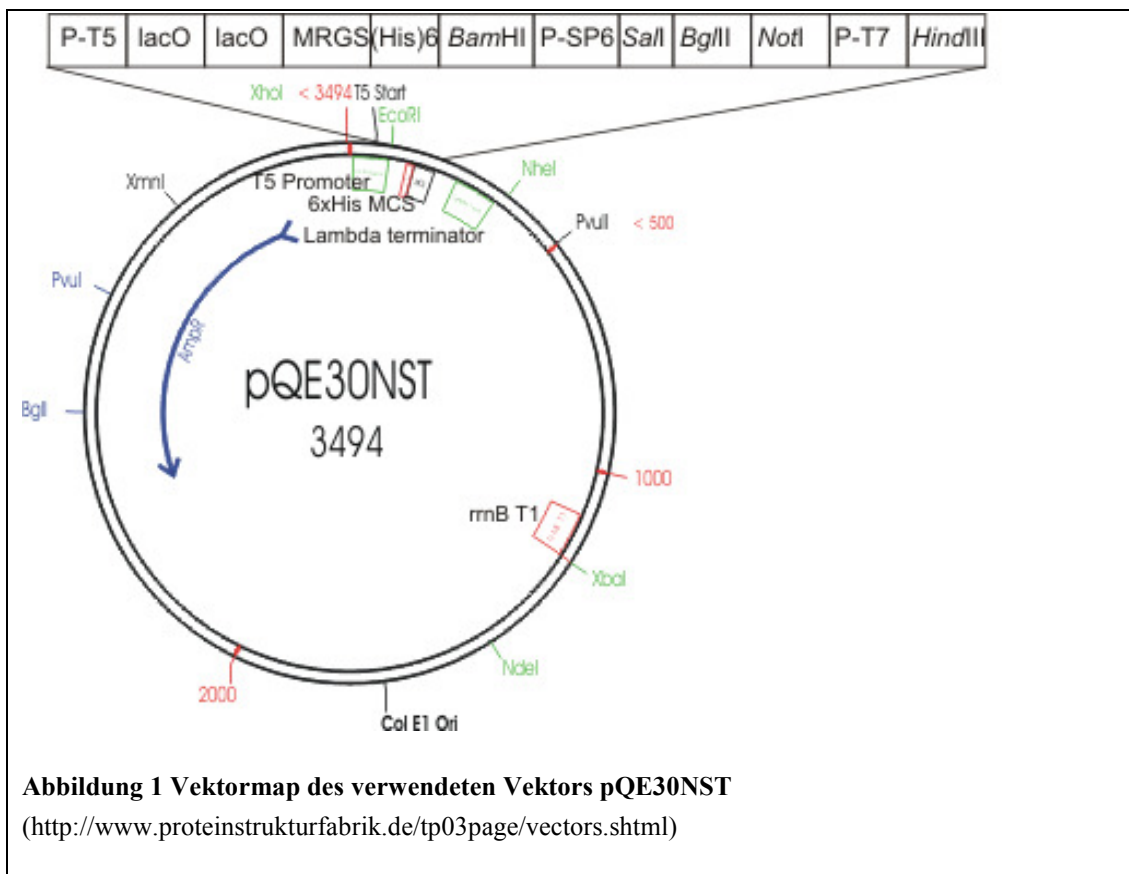
3.3.1 Proteinmacroarray-Screening

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Filtermembranen lassen sich letztlich auf einen am Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD, Berlin) entwickelten Proteinmacroarray zurückführen. Dieser basiert wiederum auf der sogenannten hEx1-Expressionsbank, einer cDNA-Bank, die aus fetalem Hirngewebe gewonnen wurde und schätzungsweise 38.000 Expressionsklone umfasst [76]. Die Herstellung des RZPD-Proteinmacroarray soll im Folgenden näher erläutert werden.

Zunächst wurde die hEx1-Bibliothek in den Plasmidvektor pQE30NST einkloniert (s. Abbildung 1, S. 36), welcher anschließend zur Transformation von *Escherichia coli* SC1-Zellen diente. Danach erfolgte das Ausplattieren der transformierten Bakterienkolonien auf Agarplatten und deren Anzucht über Nacht bei 37°C. Mittels Robotertechnologie konnten die transformierten *E. coli* Kolonien in 384-well Mikrotiterplatten eingebracht werden, in welchen sie wiederum über Nacht bei 37°C inkubiert wurden. Anschließend wurden die Bakterienklone robotergesteuert in Duplikaten auf Polyvinylidenfluorid-Membranen (PVDF) aufgebracht, welche einem Luria-Bertani-Agar aufliegen. Im Anschluss wurden die Klone bei 30°C über Nacht inkubiert. Nach Induktion der Proteinexpression der einklonierten cDNA-Sequenzen durch Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) erfolgte eine weitere, dreistündige Inkubation der Membran bei 37°C. Abschließend wurden die Kolonien auf der Filtermembran lysiert, die Membran getrocknet und bis zur Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

Mit den so hergestellten, ca. 38.000 Expressionsklone umfassenden Proteinmacroarrays wurde in Vorarbeiten am Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD, Heidelberg) zunächst ein Primärscreening von insgesamt 30 Serumpools von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen durchgeführt. Das Krankheitsspektrum der Patienten reichte dabei von malignen Tumoren (Prostatakarzinome, Lungenkarzinome, Meningeome, Gliome) über autoimmun-entzündliche Erkrankungen wie beispielsweise Colitis ulcerosa und Morbus Crohn bis hin zu neurovaskulären Erkrankungen

(Schlaganfall). Nach Inkubation der Serumpools mit dem Proteinarray konnten die an die Filtermembran gebundenen humanen Antikörper mit Hilfe eines enzym-gekoppelten sekundären Antikörpers (anti-human IgG/IgM/IgA conjugated with HRP, Dianova) detektiert werden.



Diejenigen Klone, gegen die sich nach manueller Auswertung in wenigstens einem der erwähnten Serumpools eine Antikörper-Reaktivität zeigte, wurden zu einem eigenen Subarray zusammengestellt.

Der resultierende Proteinmacroarray, der auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit Verwendung fand, umfasst insgesamt 1827 immunogene Klone, welche - basierend auf den Ergebnissen des Primärscreenings - potentielle humane Autoantigene darstellen. Der Array befindet sich auf einer PVDF-Membran, die lediglich sieben mal elf Zentimeter misst, was nicht nur ökonomische Vorteile im Hinblick auf experimentellen Aufwand und Kosten mit sich bringt sondern auch die Handhabung der Arrays extrem erleichtert. Desweiteren erlaubt das Design die Unterteilung des Proteinmacroarrays in viele Subarrays, die sich aus jeweils fünf mal fünf spot areas inklusive eines wei-

ßen Referenzpunktes zusammensetzen. Die 1827 Klone sind jeweils in Duplikaten auf die Filtermembran aufgespottet. Auf einem Subarray können folglich zwölf verschiedene Proteine immobilisiert werden.

Die praktische Durchführung des Proteinmacroarray-Screenings erstreckt sich über drei Versuchstage.

Versuchstag 1:

Zur Aktivierung aller Proteinbindungsstellen auf den Proteinmacroarrays wurden diese zunächst in 96%igem Ethanol geschwenkt. Anschließend wurden die Filtermembranen zweimal mit destilliertem Wasser gespült, um die Alkoholreste zu entfernen. Danach wurden die Membranen in einfachem TBST-T-Puffer eingelegt und vorsichtig mit fusselfreien Labortüchern (Kimwipes) abgerieben, um die auf den Membranen befindlichen Reste der lysierten Bakterienkolonien zu entfernen. Es folgten zwei jeweils zehnminütige Waschschriffe in einfachem TBST-T-Puffer auf dem Plattformschüttler. Danach wurden die Proteinmacroarrays mit einfachem TBS-Puffer gespült und anschließend zwei zehnminütigen Waschschriffen mit einfachem TBS-Puffer unterzogen. Es folgte eine zweistündige Inkubation der Filtermembranen in einer Blockierungslösung (TBST-T mit 3% Milchpulver) bei Zimmertemperatur, welche dazu diente, unspezifische Bindungen auf den Proteinmacroarrays zu minimieren. Im Anschluss wurden die zu untersuchenden Patientenserum in einer 1:1000 Verdünnung in Blockierungslösung auf die Filtermembranen gegeben und über Nacht bei 4 °C auf dem Plattformschüttler inkubiert.

Versuchstag 2:

Die verdünnten Patientenserum wurden zunächst von den Filtermembranen entfernt und in entsprechend beschrifteten Falcon-Röhrchen bei 4 °C für die zweite Inkubation asserviert. Anschließend wurden die Filtermembranen wieder drei zehnminütigen Waschschriffen mit einfachem TBST-Puffer unterzogen. Im Anschluss wurden die Filtermembranen 30 Minuten mit der zuvor auf 70 °C erhitzten Strippinglösung benetzt. Die Strippinglösung entfernt alle zuvor an die Filtermembran gebundenen Antikörper. Unspezifische Antikörper, die gegen bakterielle Proteine auf den Filtermembranen gerichtet sind,

können auf diese Weise aus den Patientenseren eliminiert werden. Hintergrundreaktionen, die auf solchen Kreuzreaktivitäten beruhen, werden folglich minimiert und die Spezifität der detektierten Signale wird somit gesteigert. Im Anschluss daran wurden wieder zwei zwanzigminütige Waschschriffe mit einfachem TBST-T-Puffer durchgeführt. Danach wurden die Proteinmacroarrays mit einfachem TBS-Puffer gespült, um anschließend zweimal jeweils zehn Minuten mit einfachem TBS-Puffer gewaschen zu werden. Es folgte eine zweistündige Inkubation der Filtermembranen in Blockierungslösung. Anschließend wurden die Filtermembranen erneut mit den zuvor konservierten Serumverdünnungen über Nacht bei 4°C auf dem Plattformschüttler inkubiert.

Versuchstag 3:

An Versuchstag drei wurden die Serumproben von den Filtermembranen abgenommen um die Filtermembranen anschließend drei zehninütigen Waschschriffen mit einfachem TBST-Puffer zu unterziehen. Im Anschluss daran wurden die Proteinmacroarrays mit einem sekundären, Cy5 markierten Antikörper (Anti-HumanIgG,IgM,IgA(H+L)-Cy5) in einer 1:1000 Verdünnung in Blockierungslösung zwei Stunden auf dem Plattenschüttler inkubiert. Der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper lagert sich spezifisch an die konstante F_c-Region des an die Filtermembran gebundenen humanen Antikörpers an. Es folgten wiederum vier zehninütige Waschschriffe in einfachem TBST-Puffer. Abschließend wurden die Proteinmacroarrays zweimal in einfachem TBS-Puffer gewaschen und, in Whatmanpapier eingeschlagen, über Nacht getrocknet.

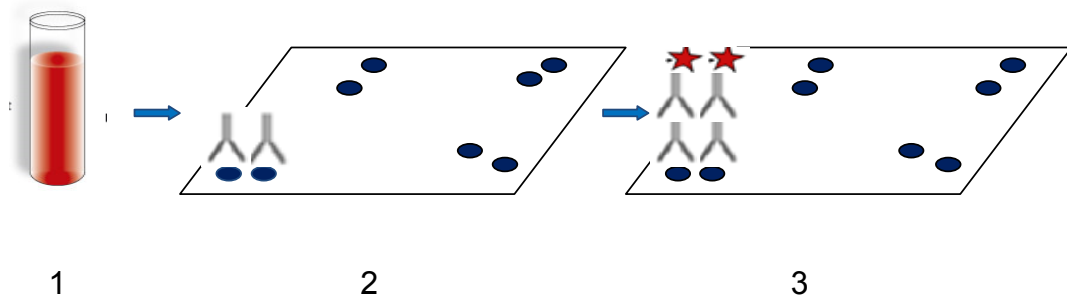


Abbildung 2 Schematische Darstellung des Proteinmacroarray-Screenings

1 Die Filtermembranen werden mit den zu untersuchenden Patientenseren inkubiert. 2 Die in den Patientenseren befindlichen Autoantikörper binden an die Antigene auf dem Proteinmacroarray. 3 Der Cy5 markierte Fluoreszenzantikörper lagert sich spezifisch an die konstante F_c-Region des an die Filtermembran gebundenen humanen Antikörpers an. Die Intensitäten der Cy5-Signale können durch Scannen der Filtermembranen mit Hilfe des GE-Healthcare Scanners bei 570 nm detektiert werden.

Am nachfolgenden Tag wurden die Intensitäten der Cy5-Signale mit Hilfe eines GE Healthcare Typhoon Scanners bei 570 nm detektiert und digital dokumentiert. Das Proteinmacroarray-Screening ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

3.3.2 Statistische Auswertung

Die weitere Auswertung des beschriebenen Proteinmacroarray-Screenings wurde in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Bioinformatik der Universität des Saarlandes (Prof. H. P. Lenhof) durchgeführt. Umfassendere Informationen zur statistischen Analyse der experimentellen Daten sind der einschlägigen Fachliteratur zu entnehmen.

3.3.2.1 Computergestützte Bildanalyse der Proteinarrays

Die weitere Auswertung der Intensitätswerte der auf den Proteinarrays befindlichen Klone wurde mittels einer computergestützten Software zur automatischen Bildverarbeitung bewerkstelligt, welche am Zentrum für Bioinformatik der Universität des Saarlandes etabliert wurde.

Die angewandte Methode umfasst dabei im Wesentlichen vier Bearbeitungsschritte. Zunächst erfolgt eine Standardisierung der gescannten Filtermembranen. Im Zuge dieser werden geringfügige Rotationen der Bilder korrigiert. Zudem wird eine akkurate Kürzung der Bildecken vorgenommen. Im nächs-

ten Schritt erfolgt das sogenannte *Addressing* der Proteinmacroarrays: Hierbei wird jedem Proteinspot ein rechteckiges Areal zugewiesen, das die Spot-Pixel sowie die umgebenden Hintergrundpixel enthält. Dieses Areal wird im Folgenden als *Target Area* bezeichnet. Anschließend kommt das sogenannte *K-means Clustering* zur Anwendung, das dazu dient, jede Target Area in Vorder- und Hintergrundpixel einzuteilen. In einigen Fällen überschreiten die Spots ihre zugewiesene Target Area oder zwei benachbarte Spots laufen ineinander, sodass die betreffenden Target Areas entsprechend angepasst werden müssen. Um die dunklen Vordergrundspots von den blassen Hintergrundpixeln trennen zu können, wird im letzten Schritt der sogenannte *Black-Top-Hat-Operator* eingesetzt. Die Intensität der Proteinspots lässt sich anschließend aus dem Mittelwert der dunklen Vordergrundpixel berechnen. Da jeder immunogene Klon in Duplikaten auf dem Array aufgebracht ist, wird abschließend das arithmetische Mittel aus den Intensitätswerten beider Duplikate gebildet. Die mit Hilfe dieses Auswerteverfahrens erhaltenen Intensitätswerte können Werte zwischen 0 und 255 annehmen. Somit wurde jedem der 1827 Klone auf dem Proteinarray ein Intensitätswert zwischen 0 und 255 zugewiesen.

Lässt sich in einer Target-Area kein Spot detektieren, wird diese automatisch mit „not available“ (NA) gekennzeichnet. Von den weiteren Betrachtungen wurden diejenigen Klone ausgeschlossen, die in mehr als zehn der untersuchten Seren als not available charakterisiert wurden.

Um eine angemessene Vergleichbarkeit der Proteinarrays untereinander zu erzielen, wurde eine Quantil-Normalisierung der Datensätze vorgenommen.

Die anschließenden Trennungsberechnungen wurden anhand der festgesetzten Intensitätswerte durchgeführt. Auf die Wahl eines Schwellenwertes, der nur Klone bestimmter Intensität als positiv kennzeichnet, wurde verzichtet, da dieser einen Informationsverlust und somit möglicherweise eine mangelnde Differenzierung der durchzuführenden Trennung zur Folge hätte.

3.3.2.2 Statistische Datenanalyse mittels Support vector machine

Zur Kategorisierung der Datensätze in Myasthenie- bzw. GBS-Seren und Kontroll-Seren wurde eine Support Vector Machine (SVM) samt linearem Kernel verwendet.

Die Support Vector Machine (SVM) wurde erstmals im Jahr 1995 von Vapnik vorgestellt [77]. Sie zählt zu den angewandten Techniken maschinellen Lernens und stellt mittlerweile eines der weit verbreitetsten Klassifikations- und Regressionsverfahren dar.

Die Funktionsweise der SVM soll im Folgenden kurz erläutert werden. Voraussetzung für die Konzipierung einer SVM stellt eine Menge von Trainingsobjekten dar, die jeweils eindeutig einer von zwei Klassen zugeordnet werden können. Jedes Objekt der zu trennenden Datenmenge wird hierbei durch einen Punktvektor im Vektorraum repräsentiert. Aufgabe der SVM ist es nun, in den beschriebenen Vektorraum eine Hyperebene einzufügen. Diese fungiert als Trennfläche für die vorliegende Datenmenge und ermöglicht es, folglich die Trainingsobjekte eindeutig in zwei Klassen einzuteilen. Die Distanz derjenigen Punktvektoren, die der Hyperebene am nächsten liegen, soll hierbei durch die eingefügte Hyperebene maximiert werden. Beide Klassen werden mittels der eingefügten Hyperebene also mit maximalem Abstand (*margin*) getrennt, um später eine zuverlässige Klassifizierung anderer, von den Trainingsobjekten abweichender Objekte, zu gewährleisten. Die Support Vector Machine wird infolgedessen auch als *Large margin Classifier* bezeichnet. Zur exakten mathematischen Beschreibung der Hyperebene sind alleinig die ihr am nächsten liegenden Vektoren notwendig (minimaler margin), weshalb diese auch als *Stützvektoren (support vectors)* bezeichnet werden.

Oftmals ist es nicht möglich, die zu klassifizierenden Trainingsobjekte vermittels einer Hyperebene linear zu separieren. In diesen Fällen bedient man sich eines sogenannten *Kernels*. Dieser ermöglicht es alle im Eingangsraum (*Inputspace*) befindlichen Trainingsvektoren in einen höherdimensionalen

Merkmalsraum (*Feature Space*) zu transferieren, in dem sich die zu klassifizierende Vektormenge schließlich linear trennen lässt.

Die mittels der Support Vector Machine durchgeführten Klassifikationsberechnungen sahen zunächst eine zehnfache Kreuzvalidierung der experimentellen Daten vor.

Im Zuge der zehnfachen Kreuzvalidierung wird ein aus Myasthenie- bzw. GBS-Seren und Kontroll-Seren bestehender Datensatz in zehn Teilmengen gleicher Größe unterteilt. Die entstehenden Teilmengen setzen sich hierbei sowohl aus Serumproben von Kranken als auch von Gesunden zusammen. Auf eine annähernd gleiche Verteilung innerhalb der gebildeten Teilmengen im Sinne einer Stratifikation wurde jedoch zunächst verzichtet. Die ersten neun Zehntel des Datensatzes fungieren als sogenannte Trainingssets. Sie dienen der Bildung eines Klassifizierungsalgorithmus, dessen Güte letztlich anhand des verbleibenden Zehntels des Datensatzes bestimmt werden soll. Dieses letzte Zehntel wird als sogenanntes Testset bezeichnet. Insgesamt werden 10 Testläufe (*runs*) gestartet, wobei Test- und Trainingssets bei jedem Durchgang variieren. Wenn nach 10 Durchläufen jede Teilmenge einmal zur Evaluierung des Modells im Testdatensatz beigetragen hat, kann anschließend der Mittelwert der in den einzelnen Testläufen erhobenen Gütekriterien ermittelt werden. Im Einzelnen wird die Genauigkeit des Klassifizierungsalgorithmus durch folgende Evaluierungsparameter dargestellt: Die Sensitivität, auch als Richtigpositiv-Rate bezeichnet, gibt den Anteil der als richtig klassifizierten MG-/GBS-Seren an der Gesamtheit der tatsächlich getesteten MG-/GBS-Seren an. Sie ist also ein Maß für die Empfindlichkeit einer Testung. Die Spezifität beschreibt hingegen den Anteil der durch die Testung als gesunde Kontroll-Seren klassifizierte Seren an der Gesamtheit der tatsächlich getesteten gesunden Kontroll-Seren. Synonym hierzu wird auch die Bezeichnung Richtignegativ-Rate verwendet. Die Genauigkeit oder auch Accuracy errechnet sich aus dem Quotient aller richtig klassifizierten Seren (MG/GBS/Kontrollen) gegenüber der Gesamtheit aller getesteten Seren. Sie stellt somit ein generelles Maß für die Qualität einer Klassifikation dar.

Bei angewandten Techniken maschinellen Lernens, wie in diesem Fall bei der Verwendung der Support Vector Machine, besteht immer die Gefahr, dass sich das verwendete Klassifikationssystem zu sehr an die gewählte Stichprobe adaptiert, anstatt von speziellen Beispielen auf funktionale Zusammenhänge in der Grundgesamtheit zu schließen. Um diesem Phänomen des sogenannten "Overfittings" bzw. „Overtrainings“ Abhilfe zu schaffen, wurde das beschriebene Procedere, die Einteilung der Daten in Test- und Trainingssets samt zehnfacher Kreuzvalidierung, anhand neuer Aufteilungen des Datensatzes in zehn Teilmengen hundertfach wiederholt. Im Anschluss daran wurde wiederum das arithmetische Mittel aus den erhobenen Gütekriterien ermittelt. Neben den Mittelwerten von Spezifität, Sensitivität und Genauigkeit, wurden zudem die jeweiligen 95% Konfidenzintervalle bestimmt.

Um ausschließen zu können, dass das System trotz Einteilung des Datensatzes in Test- und Trainingssets und der nachfolgenden hundertfach wiederholten zehnfachen Kreuzvalidierung einem Overtraining unterliegt, wurde es abschließend stratifizierten Permutationstests unterzogen. Im Rahmen derer erfolgte eine zufällige Zuordnung des Datensatzes in erkrankte (MG bzw. GBS) Seren und gesunde Kontroll-Seren. Anhand dieser neuen, zufälligen Einteilung wurde nun die oben beschriebene Vorgehensweise zum wiederholten Male praktiziert. Zu betonen bleibt, dass es sich bei dieser Kontrolluntersuchung um stratifizierte Permutationstests handelt. Der Datensatz wurde folglich in zehn Teilmengen aufgesplittet, die neben gleichem Umfang auch eine annähernd gleiche Verteilung aufwiesen. Die Stratifikation dient hierbei der Minimierung der Varianz. Letztlich wurden auch die gemittelten Werte von Spezifität, Sensitivität und Genauigkeit sowie die 95% Konfidenzintervalle der stratifizierten Permutationstests bestimmt.

AUC-Wertberechnung

Um eine Aussage treffen zu können, wie gut einzelne Klone der Klassifikation gesunder versus kranker Seren dienen, wurde für jedes Antigen eine sogenannte Receiver Operator Characteristics Curve (ROC-Kurve) erstellt.

Bei der Receiver Operator Characteristics Curve handelt es sich um eine aus der Signaltechnik stammende Evaluationskurve zur Bewertung und Optimierung von Entscheidungsfunktionen. Konzipiert wurde die ROC-Analyse während des zweiten Weltkrieges: Sie diente damals der Rauschunterdrückung in der Radartechnik. Seit den sechziger Jahren wird sie auch in der Medizin zur Evaluierung diagnostischer Tests eingesetzt. Auch auf dem Sektor des maschinellen Lernens findet sie seit einigen Jahren zunehmend Anwendung.

Zur Erstellung einer ROC-Kurve (s. Abbildung 3, S. 45) für ein bestimmtes Antigen werden zunächst alle normalisierten Intensitätswerte des entsprechenden Klonen als mögliche Klassifikationsschwellenwerte herangezogen. Jeder gemessene Intensitätswert dieses bestimmten Klonen dient also als Cut-off-Wert der Klassifikation: Intensitätswerte erkrankter Seren, die den gewählten Schwellenwert übersteigen, werden folglich als richtigpositiv (true positive, t_p) eingestuft. In Analogie dazu werden Seren gesunder Kontrollen, die den Schwellenwert unterschreiten, als richtignegativ (true negative, t_n) eingeordnet. Als falschpositiv (false positive, f_p) gelten alle Testinstanzen, die den Schwellenwert überschreiten, aber tatsächlich der gesunden Kontrollgruppe angehören. Im Umkehrschluss werden alle diejenigen Testinstanzen als falschnegativ (false negative, f_n) betrachtet, deren Intensitätswerte den Cut-off-Point zwar unterschreiten, tatsächlich aber erkrankt sind. Für alle Klassifikationsschwellenwerte lassen sich sogenannte Konfusionsmatrizes erstellen, die den tatsächlichen Zustand des Patienten (krank versus gesund) dem anhand des jeweiligen Cut-off-Wertes ermittelten Klassifikationsergebnis gegenüberstellen. Aus den absoluten Werten der Konfusionsmatrix lassen sich für jeden möglichen Cut-Off-Point relative Kennwerte wie die Sensitivität, synonym auch die Richtigpositivrate (siehe oben), oder auch die Falschpositivrate ermitteln. Die Falschpositivrate (1-Spezifität) bezeichnet hierbei den Anteil der gesunden Kontrollen, die fälschlicherweise als krank klassifiziert wurden.

Im Zuge der ROC-Analyse werden also zunächst für jeden potentiellen Klassifikationsschwellenwert sowohl die Sensitivität als auch die entsprechende Spezifität ermittelt. Die Konstruktion des ROC-Graphen erfolgt anschließend,

indem die Sensitivitäten gegen die jeweiligen Falschpositivraten in einem Koordinatensystem, dem sogenannten Einheitsquadrat, gegeneinander aufgetragen werden. Die ROC-Kurve gibt also die Sensitivität (Ordinate) als Funktion von eins minus der Spezifität (Abszisse) für alle in den Testdaten vorhandenen Schwellenwerte an. Der Ursprung sowie der Punkt (1/1) stellen fixe Punkte der ROC-Kurve dar.

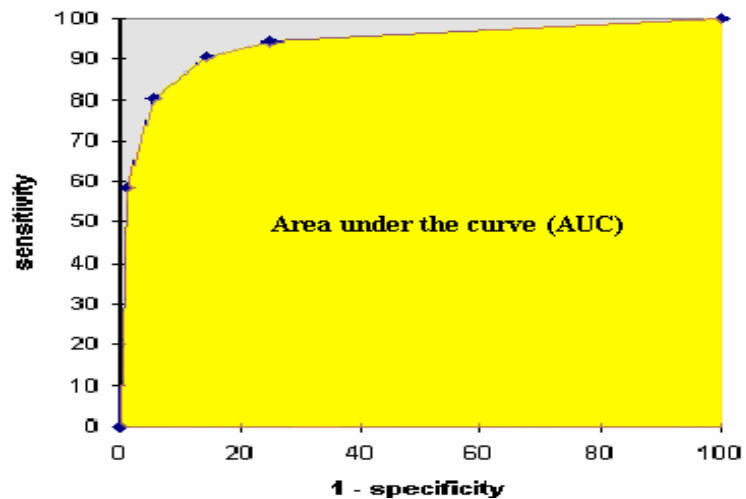


Abbildung 3 Receiver operator characteristics curve (ROC)

Die Fläche unter der Kurve (area under the curve =AUC) ist ein Maß für die Güte des Klassifikators

Um die Performanz eines beliebigen Klonen als Klassifikator auf einen Wert abbilden zu können, wird die Fläche unter der ROC-Kurve mittels Integralrechnung bestimmt. Der sogenannte AUC-Wert (*area under the curve*) entspricht hierbei der Wahrscheinlichkeit, dass der Klassifikator einer zufällig gewählten positiven (kranken) Testinstanz einen höheren Wert zuweist als einer zufällig gewählten negativen (gesunden) Testinstanz. Er kann dabei Werte zwischen Null und Eins annehmen. Ein AUC-Wert von 0,5 entspräche hierbei einfachem Raten, da in diesem Falle ebenso viele Testinstanzen korrekt wie auch falsch klassifiziert würden. Nimmt die Fläche unter der ROC-Kurve hingegen einen Wert von Eins an, spricht das für eine optimale Trennung der Testinstanzen durch den entsprechenden Klon.

Zudem sollte der AUC-Wert eines jeden Klonen eine direkte Aussage darüber ermöglichen, ob dieser nun höhere Intensitätswerte im kranken oder aber im gesunden Serum aufweist. Infolgedessen wurden die AUC Wer-

te derjenigen Klone, deren Intensitätswerte im kranken Serum im Vergleich zum gesunden Serum erhöht waren, von eins subtrahiert. Klone mit AUC Werten $< 0,5$ traten im kranken Serum also mit höherer Intensität auf als im gesunden Serum. Im Umkehrschluss wiesen Klone, deren AUCs einen Wert von $> 0,5$ annahmen höhere Intensitäten im gesunden Serum im Vergleich zum kranken Serum auf.

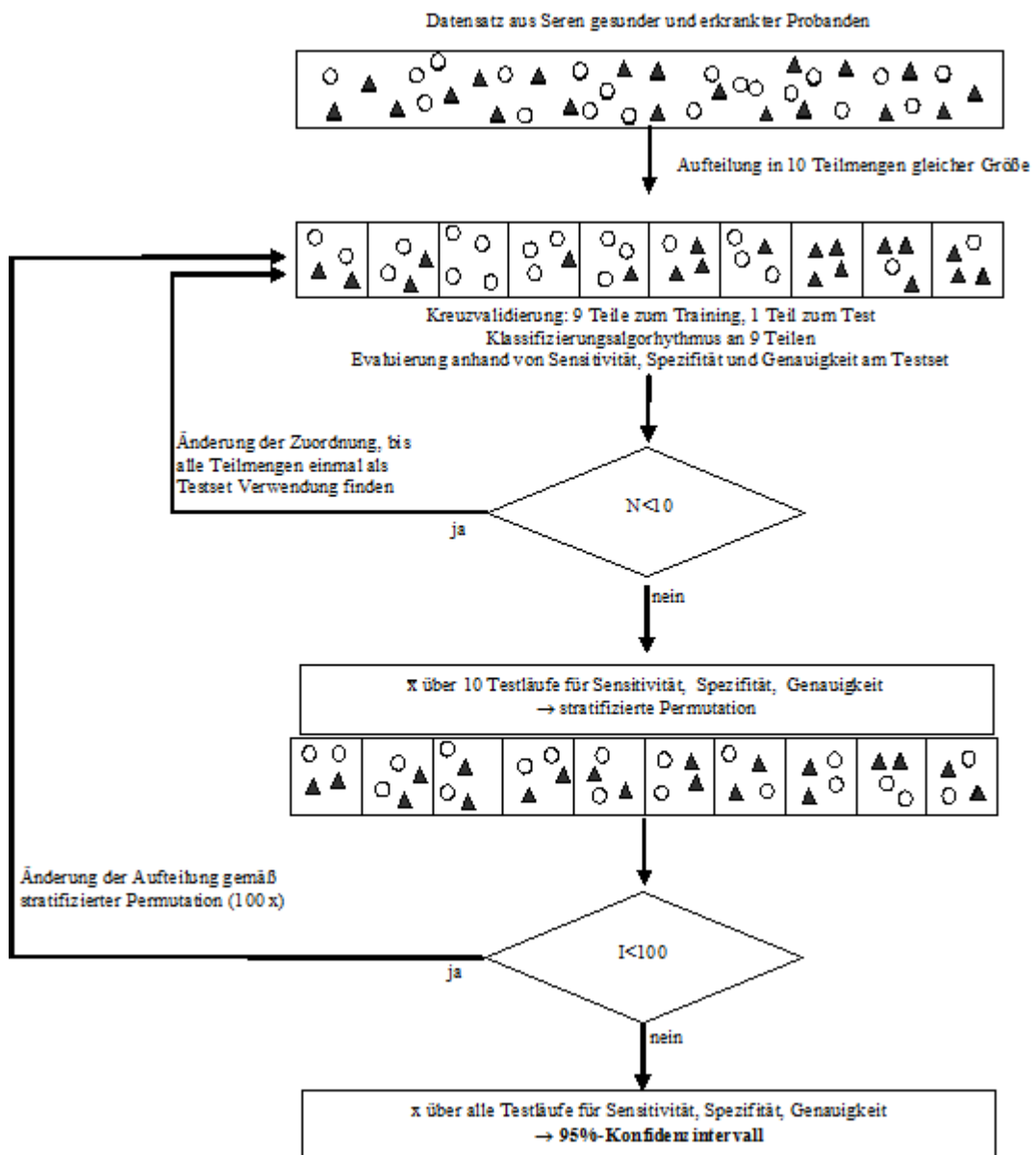


Abbildung 4 Kreuzvalidierung und stratifizierte Permutation der Datenmenge

○ gesunde, Δ erkrankte Probanden (Erläuterung s. Text)

Demnach implizieren AUC-Werte sowohl von 1 als auch von 0 eine ausgezeichnete Trennung gesunder versus kranker Seren anhand des zugehörigen Klones.

Für die weiteren statistischen Betrachtungen wurden nur diejenigen Antigene als informativ erachtet, deren AUC Werte entweder im Intervall von ≥ 0 und $< 0,3$ oder aber im Intervall von $> 0,7$ und ≤ 1 zu finden waren.

Zuletzt wurde für alle immunogenen Klone die Häufigkeit ihres Auftretens bestimmt, die sogenannte Frequenz der Seroreaktivität. Dazu wurden alle Seren als seropositiv definiert, deren normalisierte Serointensitätswerte mehr als 50 betragen.

Die Frequenz der Seroreaktivität eines beliebigen Klones x errechnete sich hierbei aus dem Quotienten aus der Anzahl der Seren, die eine positive Reaktion bezüglich Klon x aufwiesen (Intensitätswerte ≥ 50) und der Gesamtzahl der Seren, denen eine Seroreaktivität gegen Klon x in Form eines Intensitätswertes zugeordnet werden konnte.

4 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Autoantikörperprofile in Serumproben von Patienten mit generalisierter Myasthenia gravis sowie von Patienten mit Guillain-Barré-Syndrom im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen mit Hilfe eines 1827 Autoantigene umfassenden Proteinmacroarrays zu analysieren.

Insgesamt konnten im Rahmen dieser Arbeit 79 Serumproben mittels des Proteinmacroarray-Screenings erfolgreich untersucht werden. Im Einzelnen wurden hierbei 25 Proben an Myasthenie erkrankter Patienten, 22 Proben an Guillain-Barré-Syndrom erkrankter Patienten und 32 Serumproben gesunder Kontrollprobanden gescreent.

Die zum Screening verwendeten Proteinarrays umfassen 1827 E. coli exprimierte potentielle humane Autoantigene, die jeweils in Duplikaten auf den Filtermembranen aufgetragen sind. Diese 1827 Expressionsklone konnten im Rahmen eines Primärscreenings als potentielle Autoantigene identifiziert werden. In Vorarbeiten (Ressourcenzentrum für Genomforschung, Berlin) wurde hierzu die hex1 Bank, eine circa 38.000 Expressionsklone umfassende cDNA Bank aus fötalem Hirngewebe [76] mit 30 Serumpools von Patienten mit tumorösen, neurodegenerativen oder auch autoimmun-entzündlichen Erkrankungen sowie entsprechenden gesunden Probanden gescreent (siehe Kapitel 3.3.1, S. 35). Hierbei ließen sich insgesamt 1827 Klone identifizieren, die in mindestens einem der 30 Serumpools zu einer Seroreaktion führten. Diese 1827 Expressionsklone wurden als potentielle humane Autoantigene angesehen, da in mindestens einem der untersuchten Serumpools Antikörper gegen diese Antigene vorhanden waren. Diese 1827 Klone wurden auf einem „customized“ Subarray zusammengeführt, welcher wiederum die Grundlage des im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Screenings darstellt.

Das Proteinmacroarray-Screening wurde gemäß dem in Kapitel 3.3.1, S. 35 ausführlich beschriebenen Protokoll durchgeführt. Die Identifikation gebundener humaner Autoantikörper erfolgte anhand eines fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers. Die weitere Auswertung der mit Hilfe des GE Typhoon

9410 Scanners detektierten Cy5 Signale erfolgte am Zentrum für Bioinformatik in Saarbrücken (Prof. H. P. Lenhof). Die vom Zentrum für Bioinformatik eigens für das Proteinmacroarray-Screening entwickelte Bildverarbeitungs-Software weist jedem der 1827 aufgespotteten Klone einen Intensitätswert zwischen 0 und 255 zu. Nach anschließender Quantilnormalisierung der ermittelten Intensitätswerte wurden letztlich 102 Klone von allen weiteren Berechnungen ausgeschlossen, da sie in mehr als zehn Seren von der Bildauswertungssoftware als „not available“ gekennzeichnet wurden. Die normalisierten Intensitätswerte der übrigen 1725 immunogenen Klone stellten die Grundlage für die weiteren statistischen Berechnungen dar. Abbildung 5, S. 49 zeigt exemplarisch einen entwickelten und eingescannten Proteinmacroarray (Patient G8).

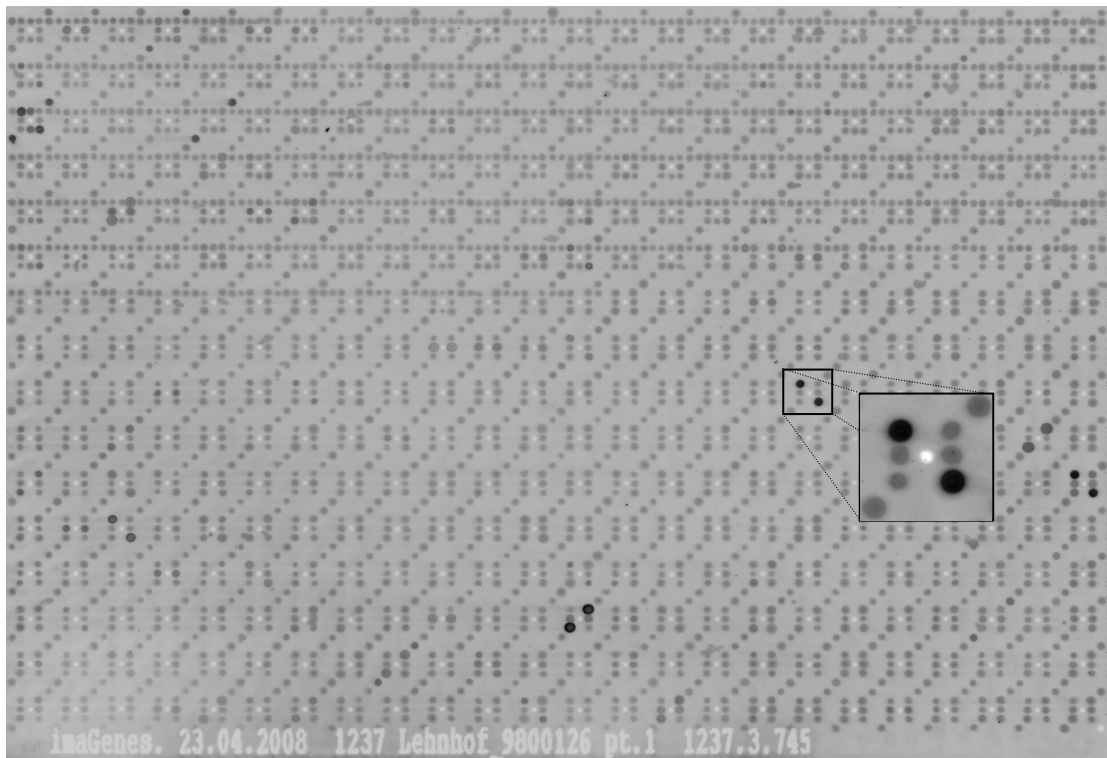


Abbildung 5 Proteinmacroarray, wie er im Rahmen des Screenings verwendet wurde.

Insgesamt 1827 potentielle Autoantigene sind in Duplikaten auf dem Proteinmacroarray aufgetragen. Auf dem vergrößerten Bildausschnitt sind deutlich die Proteinspots zu erkennen (graue Punkte), die beiden schwarz aufleuchtenden Spots zeigen eine positive Seroreaktion des verwendeten Testserums gegenüber dem entsprechenden Expressionsklon an. Der weiße Punkt in der Mitte, der sogenannte *reference spot*, ist für die automatische Bildauswertung von Bedeutung.

Anzumerken bleibt, dass sich angesichts der zufälligen Einklonierung der cDNA Sequenzen in den Expressionsvektor (s. Kapitel 3.3.1., S. 35) die entsprechenden cDNA Sequenzen nur mit einer Wahrscheinlichkeit von 1/3 im korrekten Leserahmen (sog. „in-frame“-Klone) befinden. In 2/3 der Fälle liegen die einklonierten Sequenzen jedoch nicht im korrekten Leserahmen vor (sog. „out-of-frame“-Klone). Bei den von out-of-frame-Klonen exprimierten Proteinen handelt es sich somit um artefizielle Proteine, die in dieser Form aller Wahrscheinlichkeit nach nicht in nativen Zellen produziert werden. Zudem brechen out-of-frame-Proteine verfrüht ab, nachdem sie aufgrund des verschobenen Leserahmens vorzeitige Stop-Kodone enthalten. Trotzdem können von out-of-frame-Klonen produzierte Proteine von Autoantikörpern erkannt werden [78, 79]. Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür ist, dass die von den out-of-frame-Klonen exprimierten Proteine als sogenannte Mimotope fungieren. Unter Mimotopen versteht man Peptide, deren Struktur ähnlich zu einem anderweitigen antigenen Epitop ist, wobei die Aminosäuresequenz des Mimotopes nicht zwangsläufig derer des anderweitigen antigenen Epitopes entsprechen muss. Bei Antikörperreaktionen gegen von out-of-frame-Klonen exprimierte Proteine, könnte es sich um eine Kreuzreaktion mit einem von dem out-of-frame-Klon kodierten Mimotop handeln, welches eine Ähnlichkeit zu einem natürlich vorkommenden Antigen aufweist.

Ein weitere Erklärung für Antikörperreaktivitäten gegen von out-of-frame-Klonen produzierte Proteine besteht darin, dass der Translationsbeginn einer einklonierten cDNA nicht zwingend am im Vektor enthaltenen Start-Kodon liegen muss, sondern auch an einem in der cDNA befindlichen Start-Kodon liegen kann. In diesem Fall könnte auch eine cDNA, die „out of frame“ mit dem Vektor-Start Kodon (ATG) vorliegt, ein korrektes „in-frame“-Protein produzieren [76]. Abbildung 6, S. 51 soll die beschriebene Problematik nochmals anhand eines Beispiels verdeutlichen.

a) 5'3' Frame 1

```
atgagaggatcgcatcaccatcaccatcacggatcctatttaggtgacactatagaatcg
M R G S H H H H H H G S Y L G D T I E S
tcgaccacgcgctccggcggagtcagacggcgctatgtacgccctctctcctggccag
S T H A S G G V R R R Y V R P L P P G Q
cctcctggcgcggtctagccggccggctcctggactgaaagaatgaccaggggctc
P P G R G S S R P G P W T E R M H Q G L
ggcagtggtgtccagaatgtgaagacggcgctccgactcggggcagtgaaagcactgct
G S V V P E C E D G V R L R G S E A L P
gcagaccgttggacaagccaacagtgaaatccctcctcgacatagcaaaagcgt
A D R L E Q A N S E I P S L R H M Q R R
tgtaccgcgactggatgatgtgaaggacaatccactgaggaggagatcctgttta
C H R S W Y A E G Q C H - G G D P C L
ctggagaagacctgtgactggctccgaaccgaacatgtctgctcatgcaaggagat
L G E D L - L A S E T E H V C F M Q G D
agtggactcctaccctctcatctggacatcattaaggagaaatgagccgtcctgg
S G L L P P C H P G H H - R R N E P S W
Ggag
G
```

M = Vektor ATG

HHHHHH = 6-fach His Tag

Gelb = Sequenz des Proteins, das bei Benutzung des Vektor ATGs produziert werden würde. Für dieses Protein findet sich in einer Protein-BLAST Suche keine signifikanten Übereinstimmungen mit bekannten Proteinen, d.h. es ist ein out-of-frame-Protein. Hierfür spricht auch der vorzeitige Abbruch des Proteins an dem blau markiertem Stop-Kodon

b) 5'3' Frame 2

```
atgagaggatcgcatcaccatcaccatcacggatcctatttaggtgacactatagaatcgt
- E D R I T I T I T D P I - V T L - N R
cgaccacgcgctccggcggagtcagacggcgctatgtacgccctctctcctggccagc
R P T R P A E S D G A M Y A L F L L A S
ctcctggcgcggtctagccggccggctcctggactgaaagaatgaccaggggctcgc
L L G A A L A G P V L G L K E C T R G S
gcagtggtgtccagaatgtgaagacggcgctccgactcggggcagtgaaagcactgcctg
A V W C Q N V K T A S D C G A V K H C L
cagaccgttggacaagccaacagtgaaatccctcctcgacatagcaaaagcgtt
Q T V W N K P T V K S L P C D I C K D V
gtcaccgcagctggatgatgtgaaggacaatgccactgaggaggagatcctgtttac
V T A A G D M L K D N A T E E E I L V Y
ftggagaagacctgtgactggctccgaaccgaacatgtctgctcatgcaaggagata
L E K T C D W L P K P N M S A S C K E I
gtggactcctaccctctcatctggacatcattaaggagaaatgagccgtcctggg
V D S Y L P V I L D I I K G E M S R P G
gag
E
```

Gleiche Sequenz wie oben, Übersetzung in anderem Leserahmen. Gelb markiert ist ein langes Protein, beginnend mit einem Start-Kodon (M). Eine Protein-Blast Suche zeigt eine 100%-ige Übereinstimmung dieses Proteins mit dem humanem Protein prosaposin (gb|EAW54436.1).

Bei Antikörperreaktivitäten gegen diesen Klon könnte es sich somit um eine Reaktion mit dem in a dargestellten out-of-frame-Protein handeln, dieses Protein könnte z.B. ein Mimotop darstellen, also eine Ähnlichkeit zu einem anderweitigem natürlicherweise vorkommenden Antigen haben.

Falls jedoch ein Translationsstart an dem ATG innerhalb der cDNA Sequenz vorkommen sollte würden Antikörperreaktivitäten gegen diesen Klon für das Vorhandensein von Autoantikörpern gegen prosaposin sprechen (siehe b).

Abbildung 6 Verschiedene Möglichkeiten der Proteinexpression durch out-of-frame-Klone, am Beispiel des Klons G23538

Um dennoch eine Vorstellung davon zu erhalten, welche Proteine möglicherweise von den out-of-frame-Klonen auf dem Array exprimiert worden sein könnten, wurden die out-of-frame-Klone, die aufgrund ihrer AUC-Werte bzw. der errechneten Frequenzen als interessant erschienen, einem Protein BLAST unterzogen. Eine solche BLAST-Suche ermöglicht es, experimentell ermittelte Proteinsequenzen auf Homologien zu anderen bereits in der Datenbank registrierten Peptidsequenzen zu überprüfen. Die BLAST-Analysen der entsprechenden out-of-frame-Klone ergaben jedoch in der überwiegenden Zahl keine Homologien zu bisher bekannten humanen Proteinen.

Entsprechend der statistisch zu erwartenden Verteilung setzen sich in der vorliegenden Arbeit die 1725 nach der Quantilnormalisierung verbleibenden Expressionsklone aus insgesamt 476 (27,6%) in-frame- und 1249 (72,4%) out-of-frame-Klonen zusammen.

4.1 Klassifikationsergebnisse

Ein wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin zu untersuchen, ob sich Serumproben an Myasthenie respektive an GBS erkrankter Patienten aufgrund ihrer Seroreaktivitätsprofile von gesunden Probanden unterscheiden lassen. Die zur Klassifikation notwendigen Trennungsberechnungen wurden dabei mittels einer Support vector machine samt linearem Kernel durchgeführt (s. Kapitel 3.3.2.). Wir analysierten hiermit die Intensitätswerte der nach der Normalisierung verbleibenden 1725 Klone. Mit Hilfe der SVM wurden die folgenden Klassifikationen vorgenommen: Zunächst erfolgte die statistische Differenzierung der Intensitätswerte der Myasthenie-Seren von den Seren der gesunden Kontrollen. In Analogie dazu sollten anschließend auch die Intensitäten der GBS-Seren von denen der gesunden Kontrollgruppe statistisch separiert werden.

Tabelle 4 Klassifikationsergebnisse

Alle angegebenen Werte für Sensitivität, Spezifität und Genauigkeit stellen gemittelte Werte einer 100fach wiederholten, nichtstratifizierten, zehnfachen Kreuzvalidierung dar. Die entsprechenden 95% Konfidenzintervalle sind in Klammern angegeben. Zudem sind die Resultate der stratifizierten Permutationstests aufgeführt.

Klassifikation	Sensitivität [%] (Konfidenz-intervall)	Spezifität [%] (Konfidenzintervall)	Genauigkeit [%] (Konfidenzintervall)
Myasthenie versus Normal	43,4 (40,3-46,5)	62,0 (59,4-64,6)	53,9 (51,9-55,8)
Permutationstest	37,0 (32,5-41,5)	54,7 (51,5-57,9)	46,9 (44,0-49,9)
GBS versus Normal	30,5 (27,3-33,6)	67,3 (65,4-69,3)	52,3 (50,5-54,2)
Permutationstest	36,1 (32,3-40,0)	63,4 (60,9-66,0)	52,3 (50,1-54,6)

Alle von der SVM erstellten Klassifikationen wurden anhand der Gütekriterien Sensitivität, Spezifität und Genauigkeit evaluiert. Zudem wurden jeweils die 95% Konfidenzintervalle angegeben. Tabelle 4 stellt die Klassifikationsergebnisse zusammenfassend dar. Alle in Tabelle 4 angegebenen Parameter sind als gemittelte Werte (mean value) von 100 Wiederholungen einer nicht stratifizierten, zehnfachen Kreuzvalidierung zu verstehen.

Um die erstellten Klassifikationen auf ein mögliches Overfitting hin zu überprüfen, wurden zusätzlich stratifizierte Permutationstests durchgeführt (siehe Kapitel 3.3.2, S. 39). Im Zuge derer wurden die Kontrolldaten ebenso wie die realen Datensätze 100 Durchläufen einer zehnfachen Kreuzvalidierung unterzogen. Die gemittelten Werte für Sensitivität, Spezifität und Genauigkeit dieser Kontrolluntersuchungen sind samt ihrer 95% Konfidenzintervalle ebenfalls in Tabelle 4, S. 53 dargelegt.

Die Klassifikation der 25 an Myasthenie erkrankten Patienten versus der 32 gesunden Probanden erreichte eine Sensitivität von 43,4% und eine Spezifität von 62,0%. Konkret bedeutet dies, dass lediglich 43,4% der 25 gescreeenten MG Seren basierend auf den im Zuge des Protein Macroarray-Screenings erstellten Seroreaktivitätsprofile korrekt als Seren von Patienten mit MG eingestuft werden konnten. Im Gegensatz dazu konnten 62,0% der 32 untersuchten Normalseren vermittels der im Screening erzielten Resultate korrekterweise als Serumproben der gesunden Kontrollgruppe klassifiziert werden. Demzufolge ergab sich eine statistische Genauigkeit (Accuracy) von

53,9%: Insgesamt gesehen ließen sich also lediglich 53,9% aller getesteten Seren mit Hilfe des Proteinmacroarray-Screenings korrekt als MG-Seren bzw. als gesunde Kontroll-Seren identifizierten.

Wie in Kapitel 3.3.2. ausführlich beschrieben, erfolgte im Rahmen der anschließenden Kontrolluntersuchung eine neue, zufällige Einteilung des bestehenden Datensatzes in erkrankte Seren sowie gesunde Kontroll-Seren. In diesem Fall wurden die 32 gesunden Kontroll-Seren sowie die 25 Myasthenie-Seren willkürlich zu einer neuen, 32 Proben umfassenden „gesunden Kontrollgruppe“ bzw. zu einer neuen, 25 Serumproben umfassenden „Myastheniegruppe“ zusammengestellt. Anhand der neu konzipierten Gruppen wurden die oben beschriebenen Klassifikationsberechnungen nochmals vollzogen. Für diese Permutationstests konnte eine Sensitivität von 37,0% ermittelt werden. Die Spezifität der Kontrolluntersuchung betrug 54,7%. Daraus resultierte eine durchschnittliche Genauigkeit von 46,9%. Demnach wurden also 46,9% der insgesamt 57 gescreenten Serumproben korrekt der gesunden Kontrollgruppe bzw. der MG-Gruppe zugewiesen. Da diese errechnete Genauigkeit der Zufallswahrscheinlichkeit für eine binäre Entscheidung entspricht, kann eine Überanpassung des verwendeten statistischen Modells nahezu ausgeschlossen werden.

Die statistische Differenzierung der 22 an Guillain-Barré-Syndrom erkrankten Patienten versus der 32 gesunden Kontrollen erbrachte eine Sensitivität von 30,5%, sowie eine Spezifität von 67,3%. Infolgedessen ließen sich 30,5% der 22 untersuchten GBS-Seren korrekt als solche identifizieren. Hingegen konnten 67,3% der gescreenten Normalseren anhand ihrer Seroreaktivitätsmuster korrekt der gesunden Kontrollgruppe zugewiesen werden. Dementsprechend betrug die Genauigkeit dieser Klassifikation im Mittel 52,3 %. Somit wurden insgesamt 52,3% der 54 untersuchten Proben vermittels des Proteinmacroarray-Screenings korrekt klassifiziert.

Die zugehörige Kontrolluntersuchung, die auf der willkürlichen Einteilung der 54 gescreenten Proben in 22 „GBS-Seren“ und 32 „Normalseren“ basierte, ergab eine Sensitivität von 36,1% sowie eine Spezifität von 63,4%. Demzu-

folge betrug die ermittelte Genauigkeit der stratifizierten Permutationstests 52,3%. Da dieser Wert auch mit Hilfe einfachen Ratens hätte erreicht werden können, ist auch in diesem Fall ein Overfitting unwahrscheinlich.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass für keine der beiden vorgenommenen Klassifikationen ausreichend hohe Werte für Sensitivität, Spezifität und Genauigkeit erzielt werden konnten, um an Hand der erstellten Seroreaktivitätsprofile eine zuverlässige Zuordnung der Serumproben zu an MG erkrankten respektive an GBS erkrankten Patienten und gesunden Kontrollen zu gewährleisten. Keines der von der SVM erstellten statistischen Modelle vermochte folglich ein Ereignis, in diesem Fall die Zugehörigkeit einer unbekanntes Testinstanz (Serumprobe) zu einer der drei untersuchten Gruppen, besser voraussagen zu können als der Zufall. Da sich demzufolge weder die Myasthenie-Patienten noch die Guillain-Barré-Syndrom-Patienten von den gesunden Kontrollprobanden anhand ihrer Seroreaktivitätsprofile ausreichend zuverlässig statistisch separieren ließen, erscheint die Verwendung des Proteinmacroarray-Screenings im Sinne eines diagnostischen Testes nicht sinnvoll.

Dennoch konnten mit Hilfe des durchgeführten Screenings eine Anzahl von Klonen identifiziert werden, die bei Patienten und Kontrollen unterschiedlich häufig zu Antikörperantworten führten. Dieser Aspekt soll in Abschnitt 4.3. näher beleuchtet werden.

4.2 AUC-Auswertung klassifikationsrelevanter Klone

Um den Informationsgehalt einzelner Antigene des Proteinmacroarrays hinsichtlich der erstellten Klassifikationen quantifizieren zu können, wurde für alle immunogenen Klone die „Area under the Receiver Operator Characteristics Curve (AUC)“ berechnet. Mit Hilfe dieses AUC-Wertes ist es möglich, die Performanz eines Antigenes als Klassifikator auf einen Zahlenwert abzubilden. Detaillierte Informationen zur Berechnung der AUC Werte sind Kapitel 3.3.2. zu entnehmen. Wie beschrieben, entspricht ein AUC Wert von 1 bzw. 0 einer perfekten Diskriminierung gesunder versus kranker Testseren anhand des zugehörigen Klones. Hingegen erlaubt ein Klon mit einem AUC-

Wert von 0,5 keine effiziente Differenzierung gesunder versus kranker Seren. Die Receiver Operator Characteristics Curve nähme in diesem Fall die Form einer Winkelhalbierenden an: Es würden demnach ebenso viele Testinstanzen korrekt wie auch unzutreffend klassifiziert werden. Im Folgenden wurden diejenigen Klone als potentiell interessant erachtet, deren AUCs entweder Werte ≥ 0 und $<0,3$ oder aber Werte $>0,7$ und ≤ 1 annahmen.

Tabelle 5 Quantitative Verteilung der Klone gemäß der errechneten AUC-Werte

Für jedes AUC-Intervall ist sowohl die absolute Anzahl der Klone insgesamt als auch die absolute Anzahl der entsprechenden in-frame-Klone angegeben. Klone, deren AUCs entweder Werte $<0,3$ oder aber $>0,7$ betragen, wurden als wertvoll für die Klassifikation erachtet (fettgedruckte Werte).

AUC Werte	Myasthenie versus Normal		GBS versus Normal	
	Anzahl Klone insgesamt	Anzahl Klone inframe	Anzahl Klone insgesamt	Anzahl Klone inframe
[0,0 -0,1[0	0	0	0
[0,1 -0,2[0	0	0	0
[0,2 -0,3[5	1	5	3
[0,3 -0,4[99	34	200	74
[0,4 -0,5[760	220	704	201
[0,5 -0,6]	706	184	638	162
]0,6 -0,7]	153	37	162	35
]0,7 -0,8]	2	0	16	1
]0,8 -0,9]	0	0	0	0
]0,9 -1,0]	0	0	0	0

Tabelle 5 stellt die quantitative Verteilung der nach der Quantilnormalisierung verbleibenden 1725 Klone gemäß ihrer AUC-Werte in den drei untersuchten Populationen in der Übersicht dar.

Wie aus Tabelle 5 zu ersehen, konnten im Hinblick auf die Klassifikation Myasthenie versus Gesunde sieben Klone identifiziert werden, deren AUC-Werte in oben genannten Intervallen lagen und somit als informativ für die Differenzierung gesunder versus kranker Seren angesehen wurden. Unter diesen sieben informativen Klonen befand sich auch ein in-frame-Klon, welcher das Gen „*poly (A) binding protein*“ (PABPC1) repräsentiert (s. Tabelle 6, S. 57).

Tabelle 6 Informativer in-frame-Klon der Klassifikation Myasthenie versus Gesunde

In-frame-Klon, der als informativ für die Klassifikation Myasthenie versus Gesunde erachtet wurde. Neben dem AUC-Wert der Klassifikation Myasthenie versus Gesunde ist zum Vergleich auch der entsprechende AUC-Wert der Klassifikation GBS versus Gesunde angegeben.

PABPC1= poly(A) binding protein, cytoplasmic 1

Klon ID	Ensembl	Gename	AUC Myasthenie versus Gesunde	AUC GBS versus Gesunde
E12540	ENSG00000070756	PABPC1	0,279	0,305

Die sechs out-of-frame-Klone, die aufgrund ihrer AUC-Werte als relevant für die Klassifikation Myasthenie versus Gesunde erachtet wurden, sind samt ihrer Identitäten sowie der zugehörigen AUC-Werte ebenfalls in tabellarischer Form zusammengestellt (s. Tabelle 7 S. 57). Wie bereits angemerkt, repräsentieren die in Tabelle 7 angeführten Klone out-of-frame-Sequenzen. Es wurde daher das von der ursprünglich in den vektor einklonierten Sequenz kodierte Protein angegeben, auch wenn diese sich nicht im korrekten Leserahmen bezogen auf das Vektor-ATG befindet (analog Abbildung 6b, S. 51). Es bleibt letztlich somit unklar, ob die Expressionsprodukte dieser Klone auf dem Array wirklich den nachfolgenden Proteinen entsprechen: Im Einzelnen handelte es sich dabei um die „mitogen-activated protein kinase 11“ (MAPK11), den „opiod growth factor receptor“ (OGFR), den „ADP- ribosylation factor 5“ (ARF5), das „paraneoplastic antigen MA3“ (PNMA3) und das „solute carrier family 22, member 17“ (SLC22A17).

Tabelle 7 Informative out-of-frame-Klone der Klassifikation Myasthenie versus Gesunde

Übersicht über die out-of-frame-Klone, die als informativ für die Klassifikation Myasthenie versus Gesunde erachtet wurden. Neben den AUC-Werten der Klassifikation Myasthenie versus Gesunde sind zum Vergleich auch die entsprechenden AUC-Werte der Klassifikation GBS versus Gesunde angegeben.

MAPK11= mitogen-activated protein kinase 11; OGFR= opioid growth factor receptor; ARF5= ADP-ribosylation factor 5; PNMA3= paraneoplastic antigen MA3; SLC22A17= solute carrier family 22, member 17; *= Klon technisch bedingt nicht sequenzierbar

Klon ID	NM_Nummer	Gename	AUC Myasthenie versus Gesunde	AUC GBS versus Gesunde
N14589	NM_002751.5	MAPK11	0,240	0,504

Klon ID	NM_Nummer	Genname	AUC Myasthenie versus Gesunde	AUC GBS versus Gesunde
H24544	NM_007346.2	OGFR	0,265	0,357
I08518*			0,269	0,430
C08577	NM_001662.2	ARF5	0,273	0,347
A08546	NM_013364.4	PNMA3	0,701	0,687
J02576	NM_016609.3	SLC22A17	0,717	0,667

Hinsichtlich der Klassifikation Guillain-Barré-Syndrom versus Gesunde konnten 21 Klone, einschließlich vier in-frame-Klonen identifiziert werden, deren zugehörige AUCs < 0,3 oder >0,7 betragen.

Die klassifikationsrelevanten in-frame-Klone tragen dabei die cDNA Sequenzen der Gene „*tumor protein p53*“ (TP53), „*metastasis associated 1*“ (MTA1), „*vimentin*“ (VIM) und „*amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 1*“ (APBB1) (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8 Informative in-frame-Klone der Klassifikation GBS versus Gesunde

Übersicht über die in-frame-Klone, die als informativ für die Klassifikation GBS versus Gesunde erachtet wurden. Neben den AUC-Werten der Klassifikation GBS versus Gesunde sind zum Vergleich auch die entsprechenden AUC-Werte der Klassifikation Myasthenie versus Gesunde angegeben.

TP53= tumor protein p53; MTA1= metastasis associated 1; VIM= vimentin; APBB1= amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 1

Klon ID	Ensembl	Genname	AUC GBS versus Gesunde	AUC Myasthenie versus Gesunde
E16568	ENSG00000141510	TP53	0,274	0,453
F13546	ENSG00000182979	MTA1	0,282	0,437
B17512	ENSG00000026025	VIM	0,290	0,439
D08595	ENSG00000166313	APBB1	0,700	0,576

Die out-of-frame-Klone, die als informativ für die Klassifikation GBS versus Gesunde erachtet wurden, sind in Tabelle 9, S. 59 in der Übersicht dargestellt. Hier muss ebenfalls darauf verwiesen werden, dass die cDNA Sequen-

zen der in Tabelle 9 angeführten Gene außerhalb des korrekten Leserahmens einkloniert wurden und deren Expression somit nicht zwangsläufig zur Produktion der von ihnen kodierten Proteinen führt.

Tabelle 9 Informative out-of-frame-Klone der Klassifikation GBS versus Gesunde

Übersicht über die out-of-frame-Klone, die als informativ für die Klassifikation GBS versus Gesunde erachtet wurden. Neben den AUC-Werten der Klassifikation GBS versus Gesunde sind zum Vergleich auch die entsprechenden AUC-Werte der Klassifikation Myasthenie versus Gesunde angegeben.

YBX1= Y box binding protein 1; PGF= placental growth factor; RPS15= ribosomal protein S15; CKB= brain creatine kinase; AKR7A2= aldo-keto reductase family 7, member A2 (aflatoxin aldehyde reductase); NEUROD2= neurogenic differentiation 2; LRRC3B= leucine rich repeat containing 3B; MIDN= midnolin; TUBB3= tubulin, beta 3; PODXL2= podocalyxin-like 2; ERICH1= glutamate-rich 1; CASKIN1= CASK interacting protein 1; NKAIN2= Na⁺/K⁺ transporting ATPase interacting 2; *= Klon technisch bedingt nicht sequenzierbar

Klon ID	NM_Nummer	Gename	AUC GBS versus Ge- sunde	AUC Myasthenie ver- sus Gesunde
J19558	NM_004559.3	YBX1	0,284	0,406
E22586	NM_002632.4	PGF	0,286	0,473
C06545	NM_001018.3	RPS15	0,700	0,674
H14513	NM_001823.3	CKB	0,702	0,440
D07572	NM_004559.3	YBX1	0,705	0,672
G05508	NM_003689.2	AKR7A2	0,707	0,511
L08598	NM_006160.3	NEUROD2	0,708	0,661
K09597	NM_052953.2	LRRC3B	0,709	0,646
C09518	NM_177401.4	MIDN	0,711	0,628
G01515	NM_006086.2	TUBB3	0,714	0,496
H11522*			0,721	0,590
J08580*			0,723	0,550
P11601	NM_015720.2	PODXL2	0,732	0,619
C08596	NM_207332.1	ERICH1	0,732	0,656
K14599*			0,749	0,621
G10602	NM_020764.2	CASKIN1	0,767	0,619
A07579	NM_001040214. 1	NKAIN2	0,793	0,653

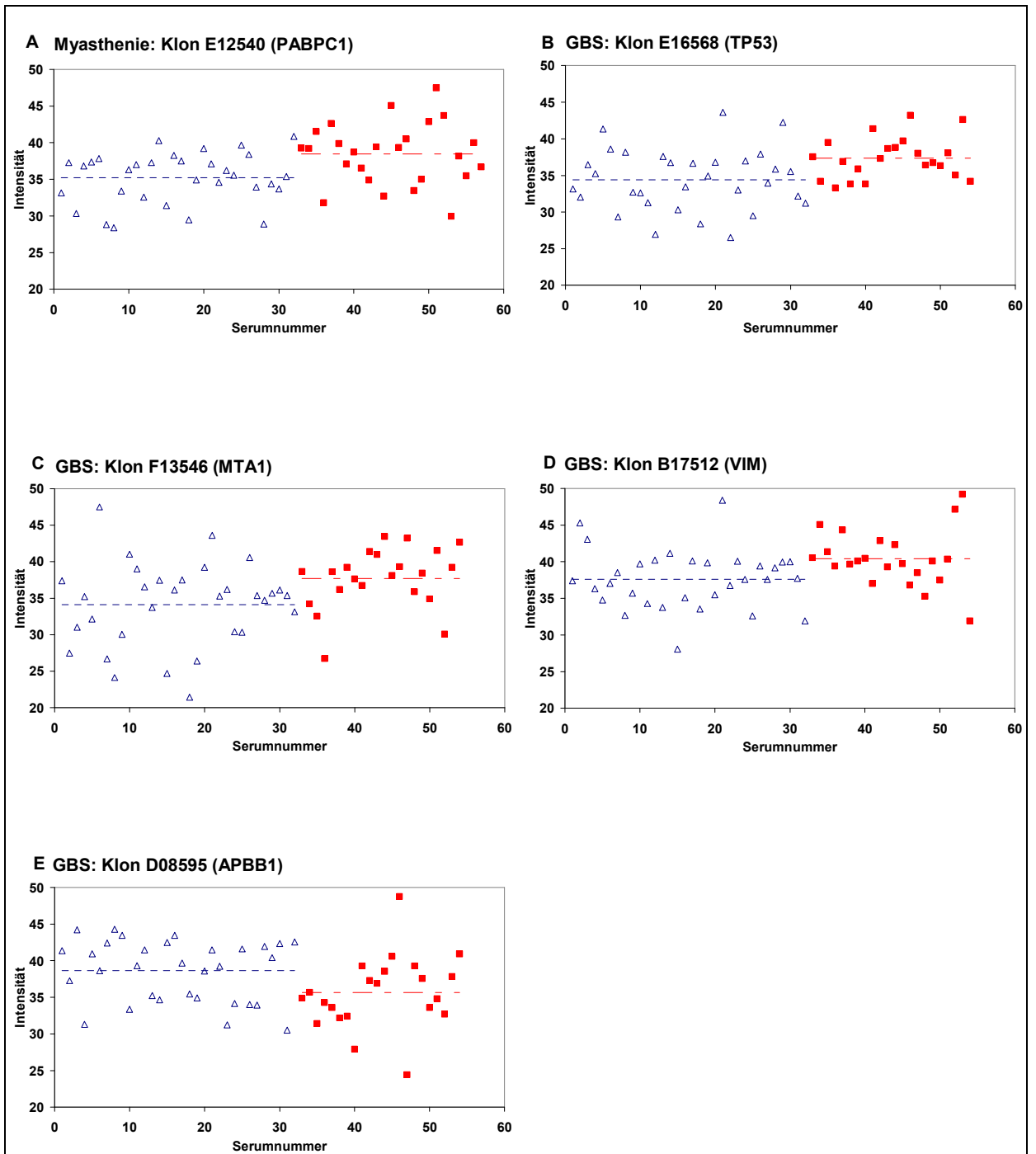


Abbildung 7 Seroreaktivitäten hinsichtlich der informativen in-frame-Klone beider Klassifikationsszenarien

Die Intensitätswerte der Seroreaktivitäten (Ordinate) sind gegen die getesteten Seren (Abszisse) aufgetragen. Der Mittelwert der Seroreaktivität ist als horizontale gestrichelte Linie dargestellt.

A: Seroreaktivität gegenüber Klon E12540, der das Gen PABPC1 repräsentiert in gesunden Kontrollen (Δ) und Myasthenieseren (\blacksquare); B: Seroreaktivität gegenüber Klon E16568, der das Gen TP53 repräsentiert, in gesunden Kontrollen (Δ) und GBS-Seren (\blacksquare); C: Seroreaktivität gegenüber Klon F13546, der das Gen MTA1 repräsentiert, in gesunden Kontrollen (Δ) und GBS-Seren (\blacksquare); D: Seroreaktivität gegenüber Klon B17512, der das Gen VIM repräsentiert, in gesunden Kontrollen (Δ) und GBS-Seren (\blacksquare); E: Seroreaktivität gegenüber Klon D08595, der das Gen APBB1 repräsentiert, in gesunden Kontrollen (Δ) und GBS-Seren (\blacksquare);

4.3 Frequenzanalyse der Autoantikörperantwort in den untersuchten Probandengruppen

Über die reinen Klassifikationsberechnungen hinaus, sollten anhand des durchgeführten Proteinmacroarray-Screenings Erkenntnisse darüber gewonnen werden, ob bei Patienten mit Myasthenia gravis beziehungsweise mit Guillain-Barré-Syndrom Autoantikörperreaktivitäten gegen neue, bislang unbekannte Proteine existieren.

Zu diesem Zweck war es vor allem von Interesse zu prüfen, mit welcher Häufigkeit die einzelnen Klone des verwendeten Arrays zu einer Antikörperantwort in den Serumproben an MG respektive GBS erkrankter Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen führten. Um für jeden der nach der Quantilnormalisierung verbleibenden 1725 Klone die entsprechende Frequenz der Seroreaktivität angeben zu können, musste zunächst ein Schwellenwert festgelegt werden, der eine seropositive Reaktion in einem Testserum eindeutig definiert. Hierfür wurden basierend auf Erfahrungen vorangegangener vom Institut für Humangenetik durchgeführter Autoantikörper-Screenings [80] alle Seren als seropositiv erachtet, die Intensitätswerte von ≥ 50 aufwiesen. Somit galten Seren, deren Intensitätswerte unter 50 lagen als seronegativ. Die Frequenz der Seroreaktivität eines beliebigen Klones x errechnete sich hierbei aus dem Quotienten aus der Anzahl der Seren, die eine positive Reaktion bezüglich Klon x aufwiesen (Intensitätswerte ≥ 50) und der Gesamtzahl der Seren, denen eine Seroreaktivität gegen Klon x in Form eines Intensitätswertes zugeordnet werden konnte.

Tabelle 10, S. 62 stellt die zahlenmäßige Verteilung der 1725 immunogenen Klone auf die Frequenzintervalle von 0 bis 100% in den drei untersuchten Probandengruppen in der Übersicht dar.

Insgesamt 25 Klone wurden von über 60% der untersuchten MG-Seren erkannt. Von diesen 25 Klonen stellten sechs in-frame-Klone dar. Gegen insgesamt 797 Klone - darunter 218 in-frame-Klone - ließ sich keine Antikörperantwort in den Serumproben an Myasthenie erkrankter Patienten nachweisen.

Im Hinblick auf die Serumproben der an GBS erkrankten Patienten führten 20 Klone zu einer humoralen Immunantwort in über 60% der untersuchten GBS-Seren. Unter diesen 20 Klonen waren auch 5 in-frame-Klone zu finden. 838 Klone, unter diesen 237 in-frame-Klone, führten zu keiner messbaren Seroreaktion.

In den gesunden Kontroll-Seren konnten bei insgesamt 771 Klonen - darunter 224 in-frame-Klone - keine Seroreaktivität verzeichnet werden. Die gescreenten Kontroll-Seren reagierten gegen insgesamt 29 Klone mit einer Frequenz von über 60%. Unter diesen befanden sich wiederum 5 in-frame-Klone.

Tabelle 10 Frequenz von Autoantikörpern gegen immunogene Klone in den drei untersuchten Probandengruppen

Für jedes Frequenzintervall sind die absolute Anzahl der Klone insgesamt sowie die absolute Anzahl der entsprechenden in-frame-Klone in allen drei untersuchten Probandengruppen angegeben.

Frequenzintervalle [%]	Myasthenie		GBS		Normal	
	Anzahl Klone insgesamt	Anzahl Klone inframe	Anzahl Klone insgesamt	Anzahl Klone inframe	Anzahl Klone insgesamt	Anzahl Klone inframe
[0]	797	218	838	237	771	224
]0-10 [579	166	559	146	611	170
[10-20[209	65	192	62	206	59
[20-30[122	33	113	30	109	25
[30-40[48	11	58	18	55	14
[40-50[38	8	23	6	25	8
[50-60[9	2	24	5	21	4
[60-70[17	4	10	4	14	2
[70-80[4	1	5	0	7	2
[80-90[2	1	3	1	5	1
[90-100]	2	0	2	0	3	0

Klone, gegen die sich in den untersuchten Seren Autoantikörper mit einer sehr hohen Frequenz zeigten ($\geq 80\%$) waren oftmals innerhalb der untersuchten Gruppen identisch und erlaubten somit keine Abgrenzung zwischen den drei betrachteten Probandengruppen. Offensichtlich handelt es sich hierbei um Antigene, gegen die viele Individuen schon unter normalen Umständen Antikörper bilden.

In einem nächsten Schritt wurden deshalb die Klone identifiziert, gegen welche in den Serumproben der MG-, respektive der GBS-Patienten mindestens doppelt so häufig Antikörper als in den gesunden Kontroll-Seren vorlagen.

Hinsichtlich der gescreenten MG-Seren entsprachen insgesamt 331 Klone, darunter 97 in-frame-Klone, dieser Bedingung.

Im Hinblick auf die untersuchten GBS-Serumproben wurden dieser Anforderung 313 Klone des Arrays gerecht. Unter diesen befanden sich auch 90 Klone, die in frame exprimiert wurden. Die quantitative Verteilung jener Klone auf die Frequenzintervalle von 0-100% ist für beide Patientenpopulationen in Tabelle 11 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 11 Anzahl der Klone, gegen die bei Patienten mit Myasthenie bzw. GBS im Vergleich zu gesunden Kontrollen mindestens doppelt so häufig Antikörper gebildet wurden

Hier sind lediglich diejenigen Klone berücksichtigt, die im kranken Serum doppelt so häufig zu einer Seroreaktion führten wie im entsprechenden Normalserum. Für alle Frequenzintervalle sind sowohl die absolute Anzahl der Klone insgesamt sowie die absolute Anzahl der entsprechenden in-frame-Klone angegeben.

Frequenzintervalle [%]	Myasthenie		GBS	
	Anzahl Klone insgesamt	Anzahl Klone in frame	Anzahl Klone insgesamt	Anzahl Klone in frame
]0-10%[251	71	233	60
[10-20[56	19	58	21
[20-30[17	5	15	5
[30-40[6	2	4	2
[40-50[1	0	2	2
[50-60[0	0	1	0
[60-70[0	0	0	0
[70-80[0	0	0	0
[80-90[0	0	0	0
[90-100]	0	0	0	0

Für die folgenden statistischen Auswertungen, berücksichtigten wir ausschließlich diejenigen Klone, die eine Frequenz von mindestens 20% aufwiesen (fettgedruckte Werte in Tabelle 11).

Betrachtet man lediglich die untersuchte MG-Gruppe, fanden sich insgesamt 24 (darunter 7 in frame) Klone, gegen die mindestens doppelt so häufig Anti-

körper bei MG-Patienten als bei gesunden Kontrollen vorlagen und zudem eine Frequenz von mindestens 20% aufwiesen. Insgesamt 17 dieser Klone (darunter 5 in frame) wiesen Frequenzen auf, die sich im Intervall ≥ 20 Prozent und kleiner als 30 Prozent bewegten. Sechs der betreffenden Klone (darunter 2 in frame) traten mit Frequenzen ≥ 30 Prozent und < 40 Prozent in den Myasthenie-Seren auf. Im Intervall ≥ 40 und < 50 Prozent hielt sich lediglich der Frequenzwert eines out-of-frame-Klones auf.

Analog zur obigen Auswertung ließen sich insgesamt 22 Klone identifizieren, die in den GBS-Serumproben doppelt so hohe Frequenzen aufwiesen wie in den zugehörigen Normalseren und deren Frequenzen darüber hinaus mindestens 20% betrug. Unter diesen waren auch neun Klone zu finden, die auf dem Array in frame exprimiert wurden. Im Frequenzintervall $\geq 20\%$ und $< 30\%$ bewegten sich hierbei 15 dieser Klone (davon 5 in frame). Insgesamt 4 der 22 Klone (davon 2 in frame) wiesen dabei Frequenzen $\geq 30\%$ und $< 40\%$ auf. Zwei in-frame-Klone erreichten Frequenzen, die sich im Intervall ≥ 40 und < 50 bewegten. Ein out-of-frame-Klon erzielte eine Frequenz, die im Intervall ≥ 50 und $< 60\%$ lag.

Um abschließend beurteilen zu können, ob die Frequenz von Antikörpern gegen die oben angeführten Klone in den Patienten-Seren signifikant im Vergleich zu den Seren gesunder Kontrollen erhöht ist, wurden für alle Klone die entsprechenden p-Werte anhand des zweiseitigen Fishers Exact Probability Tests berechnet.

Hinsichtlich der untersuchten MG-Seren konnten mittels dieses Unabhängigkeitstestes für insgesamt sechs Klone signifikante p-Werte ($p < 0,05$) errechnet werden. Bei zweien dieser Klone handelte es sich um in-frame-Klone. Diese in-frame-Klone repräsentieren dabei wiederum die Gene „40S ribosomal protein S13“ (RPS13) respektive „proteasome subunit alpha type 1“ (PSMA1). In Tabelle 12, S. 65 sind die entsprechenden Klone samt ihrer Identitäten, ihrer Frequenzen und der entsprechenden p-Werte nochmals aufgeführt.

Tabelle 12 In-frame-Klone, gegen die in Myasthenie-Seren signifikant häufiger Antikörper als in Kontroll-Seren vorliegen

Übersicht über die in-frame-Klone, für die mit Hilfe des Fishers Exact Probability Testes signifikante p-Werte errechnet werden konnten. Für beide Klone sind jeweils die absoluten Frequenzen in Myasthenie- und entsprechenden Normalseren angegeben. In eckigen Klammern sind die Frequenzen zusätzlich in prozentualen Werten angegeben.

RPS13=40S ribosomal protein S13; PSMA1=proteasome(prosome, macropain) subunit alpha type 1

Klon ID	Ensembl	Genname	Frequenz Myasthenie [%]	Frequenz Normal [%]	p
K02549	ENSG00000110700	RPS13	5/24 [20,83]	0/32 [0,00]	0,01113
E05529	ENSG00000129084	PSMA1	6/24 [25,00]	1/32 [3,13]	0,03458

Die verbleibenden vier out-of-frame-Klone, deren Frequenzen sich in den Myasthenie-Seren von denen in entsprechenden Normalseren signifikant unterscheiden, sind in Tabelle 13, S. 65 zusammengestellt. Wie bereits diskutiert, lässt sich nicht mit letzter Sicherheit sagen, ob sich bei den von diesen Klonen produzierten Proteinen um artifizielle out-of-frame-Proteine handelt, oder ob korrekte Proteine beginnend von einem internen Start-Kodon innerhalb der cDNA Sequenz translatiert werden (siehe Abbildung 6, S. 51). In Tabelle 13 sind diejenigen Gene aufgelistet, die bei einem Translationsstart an einem internen Start-Kodon innerhalb der cDNA-Sequenz abgelesen werden könnten. Es handelt sich um das „*prosaposin*“ (PSAP), den „*scaffold attachment factor b*“ (SAFB), die „*brain creatine kinase*“ (CKB) sowie „*MARCKS-like 1*“ (MARCKSL1).

Tabelle 13 Out-of-frame-Klone, gegen die in Myasthenie-Seren signifikant häufiger Antikörper als in Kontroll-Seren vorliegen

Übersicht über die out-of-frame-Klone, für die mit Hilfe des Fishers Exact Probability Testes signifikante p-Werte errechnet werden konnten. Für alle Klone sind jeweils die absoluten Frequenzen in Myasthenie- und entsprechenden Normalseren angegeben. In eckigen Klammern sind die Frequenzen zusätzlich in prozentualen Werten angegeben

PSAP= prosaposin; SAFB= scaffold attachment factor b; CKB= brain creatine kinase; MARCKSL= Marcks-like 1

Klon ID	NM_Nummer	Genname	Frequenz Myasthenie [%]	Frequenz Normal [%]	p
G23538	NM_001042466.1	PSAP	6/23 [26,09]	1/27 [3,70]	0,03863
G04526	NM_002967.2	SAFB	8/25 [32,00]	3/32 [9,38]	0,04460

Klon ID	NM_Nummer	Genname	Frequenz Myasthenie [%]	Frequenz Normal [%]	p
H06573	NM_001823.3	CKB	8/25 [32,00]	3/32 [9,38]	0,04460
O03548	NM_023009.5	MARCKSL1	9/23 [39,13]	3/24 [12,50]	0,04899

Die statistische Signifikanz der beobachteten Unterschiede von GBS- und Kontroll-Seren wurden analog zu den Myasthenie-Seren mit Hilfe des Fishers Exact Probability-Testes überprüft. Für sieben der zuvor identifizierten Klone konnten mit Hilfe des Fishers Exact Probability Testes signifikante p-Werte ermittelt werden. Zwei dieser immunogenen Klone stellen in-frame-Klone dar. Bei denen von diesen Klonen repräsentierten Genen handelt es sich um das „*tubulin beta 2A*“ (TUBB2A) sowie das „*ribosomal protein L29*“ (RPL29). Auch diese Klone sind in einer Übersicht (s. Tabelle 14, S. 66) samt Frequenzen, Identitäten und zugehörigen p-Werte erfasst.

Tabelle 14 In-frame-Klone gegen die in GBS-Seren signifikant häufiger Antikörper als in Kontroll-Seren vorliegen

Übersicht über die in-frame-Klone, für die mit Hilfe des Fishers Exact Probability Testes signifikante p-Werte errechnet werden konnten. Für alle Klone sind jeweils die absoluten Frequenzen in GBS- und entsprechenden Normalseren angegeben. In eckigen Klammern sind die Frequenzen zusätzlich in prozentualen Werten angegeben.

TUBB2A= tubulin beta 2A; RPL29= ribosomal protein L29

Klon ID	Ensemble	Genname	Frequenz GBS [%]	Frequenz Normal [%]	p
B09575	ENSG00000137267	TUBB2A	5/21 [23,81]	0/30 [0,00]	0,00866
C14513	ENSG00000162244	RPL29	5/22 [22,73]	1/32 [3,13]	0,03552

Die fünf out-of-frame-Klone, die entsprechende Differenzen auf 5% Signifikanzunterschiede aufwiesen, enthalten Leserahmen für die Gene „*phosphoinositide 3-kinase-interacting protein1*“ (PIK3IP1), „*phosphodiesterase 4D interacting protein isoform 3*“ (PDE4DIP), „*brain creatine kinase*“ (CKB), „*FEZ family zinc finger 2*“ (FEZF2) sowie „*chromosome 19 open reading frame 70*“

(C19orf70) (siehe Tabelle 15, S. 67). Auch hier sei darauf verwiesen, dass es sich um out-of-frame-Klone handelt und somit keine sichere Aussage darüber getroffen werden kann, ob die von den oben angeführten Genen kodierten Proteine tatsächlich auf der Filtermembran exprimiert wurden oder nicht.

Tabelle 15 Out-of-frame-Klone, gegen die in GBS-Seren signifikant häufiger Antikörper als in Kontroll-Seren vorliegen

Übersicht über die out-of-frame-Klone, für die mit Hilfe des Fishers Exact Probability Testes signifikante p-Werte errechnet werden konnten. Für alle Klone sind jeweils die absoluten Frequenzen in GBS- und entsprechenden Normalseren angegeben. In eckigen Klammern sind die Frequenzen zusätzlich in prozentualen Werten angegeben.

PIK3IP1= phosphoinositide -3- kinase interacting protein 1; PDE4DIP= phosphodiesterase 4D interacting protein; CKB= brain creatine kinase; FEZF2= FEZ family zinc finger 2; C19orf70= chromosome 19 open reading frame 70

Klon ID	NM_Nummer	Gename	Frequenz GBS [%]	Frequenz Normal [%]	p
D24528	NM_001135911.1	PIK3IP1	11/22 [50,00]	5/32 [15,63]	0,01374
N01564	NM_022359.4	PDE4DIP	7/22 [31,82]	2/32 [6,25]	0,02320
O17544	NM_001823.3	CKB	5/22 [22,73]	1/32 [3,13]	0,03552
G08534	NM_018008.3	FEZF2	5/22 [22,73]	1/32 [3,13]	0,03552
H03573	NM_205767.1	C19orf70	5/22 [22,73]	1/32 [3,13]	0,03552

5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, Autoantikörperprofile in Serumproben an Myasthenie erkrankter Patienten respektive an Guillain-Barré-Syndrom erkrankter Patienten sowie entsprechender gesunder Kontrollen mit Hilfe eines 1827 Autoantigene umfassenden Proteinmacroarrays zu analysieren. Die erstellten Seroreaktivitätsprofile sollten hierbei im Wesentlichen Aussagen hinsichtlich folgender Fragestellungen ermöglichen: Erstens sollte untersucht werden, ob die ermittelten Antikörpersignaturen eine statistische Differenzierung der MG-Patienten bzw. der GBS-Patienten von entsprechenden gesunden Kontrollpersonen erlauben. Zweitens sollten Erkenntnisse darüber gewonnen werden, ob neben den bisher bekannten Zielantigenen bislang unbeschriebene Autoantigene existieren, gegen die sich im Rahmen einer Myasthenia gravis bzw. eines Guillain-Barré-Syndromes eine Immunantwort ausbildet.

Bei den betrachteten Krankheitsbildern handelt es sich um Erkrankungen autoimmuner Genese, d.h. um Erkrankungen, denen eine überschießende Immunreaktion gegen körpereigenes Gewebe zugrunde liegt. Die Bedeutung humoraler Immunmechanismen ist insbesondere für die Myasthenie erwiesen: Bei Patienten mit Myasthenia gravis lassen sich Anti-AChR-Antikörper im Serum nachweisen, die eine pathogenetische Relevanz besitzen. Daneben sind bei der Myasthenie auch autoreaktive Antikörper gegen andere muskuläre und nicht-muskuläre Zielantigene beschrieben worden [17-19].

Hinsichtlich der Ätiopathogenese des Guillain-Barré-Syndroms existieren ebenfalls klare Hinweise auf eine Beteiligung humoraler Immunmechanismen. Die Zielstrukturen, gegen die sich die vermuteten Autoantikörper dabei richten, sind jedoch bislang unbekannt.

5.1 Methodische Aspekte: Proteinmacroarray-Screening

Die im Rahmen des Screenings verwendeten Proteinarrays ermöglichen eine Breitspektrum-Analyse von Autoantikörperprofilen: Insgesamt 1827 potentielle Autoantigene sind auf einer PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran immobilisiert, und erlauben somit in einem einzigen multiparallelen Ansatz ein brei-

tes Screening auf Autoantikörperreaktivitäten in den untersuchten biologischen Proben. In nur einem Experiment lässt sich folglich eine immense Datenmenge generieren. Die Applikation des Proteinmacroarray-Screenings bleibt dabei nicht alleinig auf die Detektion von Autoantikörpern in Patientenserum beschränkt. Weitere Anwendungsgebiete umfassen die Epitopkartierung von Antikörpern, die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen sowie die Identifizierung von Proteinkinase-Substraten und DNA- bzw. RNA-bindender Proteine. Die verwandte Methodik zeichnet sich zudem durch einen geringen Materialverbrauch aus: Zur Durchführung eines entsprechenden Screenings sind lediglich geringe Mengen des zu untersuchenden Patientenserums erforderlich. Zeit-, Kosten- und Materialeffizienz machen das Proteinmacroarray-Screening zu einem höchst ökonomischen Verfahren.

Die Synthese der auf der PVDF-Membran aufgetragenen rekombinanten Proteine basiert auf einem rein bakteriellen Expressionssystem. Die verwendeten *E. coli*-Zellen stellen aufgrund ihres schnellen und robusten Wachstums ideale Wirtsorganismen für die Gewinnung großer Mengen an rekombinanten Proteinen dar. Dennoch kann die Expression eukaryotischer Proteine durch *E. coli*-Kulturen problematisch sein: So fehlt der bakteriellen Zelle beispielsweise die Fähigkeit, die exprimierten Proteine posttranslational zu modifizieren, wie es in entsprechenden Säugerzellen der Fall wäre. Bestimmten eukaryotischen Proteinen können infolgedessen die für sie typischen Glykosylierungs- bzw. Phosphorylierungsmuster fehlen, die für deren adäquate biologische Aktivität und Bindungseigenschaften von Bedeutung sind. Posttranslationale Modifikationen gehören neben Genaktivierung, -überexpression und -mutation zu den Mechanismen, mittels derer körpereigene Antigene eine Immunreaktion initiieren können. Ein potentiell autoantigen erhält unter Umständen erst nach vollendeter posttranslationaler Modifikation eine immunogene Relevanz. Im Falle des systemischen Lupus erythematodes erfordert die Erkennung bestimmter Autoepitope durch entsprechende Antikörper beispielsweise deren Methylierung und Phosphorylierung [81, 82]. Eine andere Problematik bakterieller Expressionssysteme besteht in der Formation sogenannter Einschlusskörperchen (inclusion bodies) und/

oder aber im vorzeitigen Abbau der Expressionsprodukte durch die *E. coli*-Wirtszelle [83].

Die rekombinant exprimierten Proteine des Arrays unterscheiden sich zudem hinsichtlich ihrer strukturellen Konformation von den in der nativen Zelle exprimierten Proteinen. Die rekombinanten Proteine werden unter denaturierenden Bedingungen extrahiert und auf den PVDF-Membranen immobilisiert. Die zum Screening verwendeten Proteinarrays umfassen folglich lediglich Epitope, die sich aus der primären Aminosäuresequenz der Expressionsprodukte ergeben. Sie stellen sogenannte lineare (sequentielle) Epitope dar. In vivo exprimierte Proteine nehmen hingegen eine dreidimensionale Struktur (Tertiärstruktur) an. Autoantikörper, die lediglich konformationale Epitope erkennen wie z.B. die im Rahmen des Morbus Basedow gebildeten Anti-TSH-Rezeptor-Antikörper [84], können auf diese Weise folglich nicht detektiert werden.

Es sollte erwähnt werden, dass sich keine Sequenzen der AChR auf dem von uns verwendeten Proteinmacroarray befanden. AChR-Antikörper binden ebenfalls typischerweise an konformationelle Epitope, die in dem verwendeten System nicht exprimiert werden können.

Zu berücksichtigen ist außerdem, dass es sich bei der Durchführung als auch der computergestützten Auswertung des Proteinmacroarray-Screenings um ein hochgradig standardisiertes Verfahren handelt, das bereits bei der Untersuchung verschiedener Hirn- und Lungentumoren bewährt hat [80, 85].

Wie bereits in Kapitel 4 ausführlich diskutiert, wurden, wie aus stochastischen Gründen zu erwarten, ca. zwei Drittel der cDNA-Sequenzen nicht im korrekten Leserahmen in den bakteriellen Expressionsvektor inkloniert [86]. Die Expression dieser sogenannten out-of-frame-Klone kann zu kurzen, instabilen Peptiden führen, die einem verfrühten Abbau in der *E. coli*-Wirtszelle unterliegen [76]. Es ist aber auch denkbar, dass die Expressionsprodukte im Sinne sogenannter Mimotope fungieren: Cepok et al. konnten Reaktivitäten gegen bestimmte out-of-frame-Klone in Seren von Patienten mit Multipler Sklerose nachweisen, welche letztlich auf gewissen strukturellen Ähnlichkei-

ten der out of frame Epitope zu den Peptidsequenzen der EBV-Virusproteine EBNA-1 und BRRF2 beruhte. Die verzeichneten Seroreaktivitäten ließen sich folglich auf eine Kreuzreaktion der im Patientenserum befindlichen Antikörper mit den entsprechenden Mimotopen dieser out-of-frame-Proteine zurückführen [79]. Zudem ist auch möglich, dass das einklonierte cDNA-Insert über ein vom Vektor-Start-Kodon unabhängiges Start-Kodon verfügt: Unter diesen Umständen könnte auch eine cDNA-Sequenz, die außerhalb des korrekten Leserahmens in einen bakteriellen Vektor einkloniert wurde, zur Expression des ursprünglich einklonierten Genes und somit zur Produktion eines korrekten Proteines führen [76]. Nachdem die genaue Identität der von den out-of-frame-Klonen kodierten Proteinen in der vorliegenden Arbeit offenbleiben musste, wird in der weiteren Diskussion nur auf Antikörperreaktivitäten gegen in-frame-Klone genauer eingegangen, da in diesem Fall die Identität der exprimierten Proteine eindeutig ist.

5.2 Klassifikationsergebnisse

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Klassifikationsberechnungen wurden mittels einer Support vector machine samt linearem Kernel durchgeführt.

Die statistische Differenzierung der Intensitätswerte der Myasthenie-Seren von den gesunden Kontroll-Seren erzielte dabei eine Sensitivität von 43,4% und eine Spezifität von 62,0%. Daraus resultierte eine statistische Genauigkeit (Accuracy) von 53,9%. Demnach konnten 53,9% aller getesteten Seren basierend auf den im Zuge des Proteinmacroarray-Screenings erstellten Seroreaktivitätsprofile korrekt als MG-Seren bzw. als gesunde Kontroll-Seren klassifiziert werden.

Die Klassifikation der Intensitäten der GBS-Seren versus der entsprechenden Normalseren erbrachte ähnliche Resultate: Die errechnete Sensitivität betrug 30,5%, die Spezifität dieser statistischen Differenzierung erreichte 67,3%. Demzufolge ergab sich eine statistische Genauigkeit von 52,3%: Somit konnten lediglich 52,3% der untersuchten Serumproben anhand der er-

mittelten Autoantikörperprofile korrekt der GBS-Gruppe bzw. der gesunden Kontrollgruppe zugeordnet werden.

Unter Verwendung derselben Methodik zur Breitspektrum-Analyse von Autoantikörperprofilen gelang es Ludwig et al. Gliompatienten von gesunden Kontrollprobanden mit einer Sensitivität von 85,93%, einer Spezifität von 90,45% und einer Genauigkeit von 88,49% statistisch zu differenzieren. Darüber hinaus war es sogar möglich WHO Grad IV Gliome von entsprechenden Normalseren mit einer Sensitivität von 80,93%, einer Spezifität von 98,45% und einer Genauigkeit von 92,88% statistisch zu separieren [80]. Ähnliche Ergebnisse erzielten Ludwig et al. auch im Hinblick auf Meningiome: Die statistische Differenzierung von Meningiomen versus gesunde Kontrollen erreichte hierbei eine Sensitivität von 91,8%, eine Spezifität von 95,6% und eine Genauigkeit von 93,8% (Ludwig et al. eingereicht).

Ein anderes Verfahren zum Antikörperprofiling von biologischen Proben stellt die sogenannte Phage-Display-Technik dar. Es handelt sich dabei um eine Form der Expressionsklonierung, bei der das rekombinierte Gen als Kapsid-fusionsprotein an der Oberfläche des Phagen erscheint. Mittels dieser Methodik konnten Wang et al. Patienten mit Prostatakarzinomen mit einer Sensitivität von 81,6% und einer Spezifität von 88,2% identifizieren [87]. Somers et al. konnten unter Verwendung der Phage-Display-Technik Antikörpersignaturen in Liquorproben von Patienten mit multipler Sklerose ermitteln, die eine statistische Differenzierung der MS-Patienten von den gesunden Kontrollpersonen mit einer Sensitivität von 45% und einer Spezifität von 86% ermöglichten [88].

Vergleicht man die im Rahmen der vorliegenden Untersuchung erzielten Klassifikationsergebnisse mit denen anderer Studien, die sich mit der Etablierung von Autoantikörperprofilen zu diagnostischen Zwecken beschäftigen, wird nochmals deutlich: Keine der beiden vorgenommenen Klassifikationen erbrachte ausreichend hohe Werte für die Gütekriterien Sensitivität, Spezifität und Genauigkeit, die eine klare Trennung der an Myasthenie respektive an Guillain-Barré-Syndrom erkrankten Patienten von den gesunden Kontroll-

Seren erlaubt hätten. Eine eindeutige Zuordnung einer unbekanntes Testinstanz zu einer der untersuchten Probandengruppen ist, basierend auf den im Rahmen des Proteinmacroarray-Screenings ermittelten Seroreaktivitätsmuster, folglich nicht möglich.

Weshalb die verwandte Methodik so viel erfolgreicher bei Tumorerkrankungen als bei den untersuchten Autoimmunerkrankungen eingesetzt werden kann, gibt Anlass zur Spekulation. Im Rahmen von malignen Tumoren kommt es offenbar zu einer wesentlich deutlicheren Verschiebung globaler Autoantikörperprofile als dies im Rahmen der Myasthenia gravis oder des Guillain-Barré-Syndromes der Fall ist.

Die sich im Rahmen von Tumorerkrankungen manifestierende humorale Immunantwort gegen vom Tumor exprimierte Antigene führt möglicherweise zu einer breiteren Verschiebung des globalen Antikörperrepertoires als die humorale Autoimmunantwort bei Patienten mit MG und GBS. Dies mag zunächst überraschend wirken, da insbesondere bei der MG als klassischer humoral vermittelter Autoimmunerkrankung eine Alteration globaler Autoantikörperprofile denkbar erschien. Unsere Daten sprechen allerdings nachdrücklich dafür, dass es sich bei der humoralen Immunantwort gegen den AChR bei der MG um einen relativ fokussierten Prozess handelt, der nicht von einem global veränderten Autoantikörperprofil begleitet wird.

5.3 AUC-Auswertung klassifikationsrelevanter Klone

Um den Informationsgehalt einzelner Klone des Proteinmacroarrays hinsichtlich der erstellten Klassifikationen auf einen Zahlenwert abbilden zu können, wurde für jeden Klon der sogenannte AUC-Wert berechnet (siehe Kapitel 4.2, S. 55). Klone, deren AUCs Werte $< 0,3$ oder $> 0,7$ annahmen, wurden dabei als besonders informativ erachtet.

Für die Klassifikation Myasthenie versus Gesunde ließ sich ein in-frame-Klon identifizieren, der mit einem AUC-Wert von 0,279 den oben genannten Anforderungen entsprach und demnach über einen hohen Informationsgehalt bezüglich dieser statistischen Trennung verfügte. Es handelte sich dabei um das Antigen „*poly (A) binding protein*“ (PABPC1).

Das „*poly (A) binding protein*“ ist an der mRNA-Translation sowie am Abbau derselbigen beteiligt [89]. An Hefen, die gentechnisch dahingehend manipuliert wurden, so dass die Expression von PABPC1 nahezu unterblieb, konnte eine Hemmung der Translationsinitiation sowie eine Beeinträchtigung der Kürzung des Poly(A)-Schwanzes demonstriert werden [90]. Die Kürzung der Poly(A)-Sequenz stellt wiederum die Voraussetzung für die Degradation zytoplasmatischer mRNA in Hefen und höheren Eukaryonten dar.

Auf eine mögliche prognostische Bedeutung des PABPC1 hinsichtlich Tumorprogression und mittlerer postoperativer Überlebensdauer bei Ösophaguskarzinomen wiesen Takashima et al. hin: Ihren Studien zufolge ist eine verminderte PABPC1-Expression in der Ösophagusschleimhaut mit einer lokalen Progression des Karzinoms assoziiert. Eine reduzierte PABPC1-Expression korreliert demnach zudem mit einer signifikant kürzeren postoperativen, mittleren Überlebenszeit verglichen mit Patienten mit hoher PABPC1-Expression [91]. Diese Beobachtung könnte dahingehend interpretiert werden, dass eine Herunter-Regulation von PABPC1 aufgrund mangelnder Kontrolle des mRNA-Umsatzes einer Proliferation maligner Zellen zuträglich ist.

Hinsichtlich der Klassifikation GBS versus Gesunde wurden folgende in-frame-Klone als informativ erachtet: Das „*tumor protein p53*“ (TP53), das „*metastasis associated 1*“ (MTA1), „*vimentin*“ (VIM) und das „*amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 1*“ (APBB1).

Das „*tumor protein p53*“ (TP53) verfügte mit einem AUC-Wert von 0,274 über den höchsten Informationsgehalt. Das TP53-Gen kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der die Expression bestimmter Zielgene reguliert, die an der Kontrolle des Zellzyklus, an DNA-Reparaturen oder am programmierten Zelltod, der sogenannten Apoptose, beteiligt sind. Im Falle eines DNA-Schadens induziert p53 über die Aktivierung bestimmter Gene (unter anderem des p21-Gens) eine Arretierung des Zellzyklus in der G1-Phase, was der Zelle ermöglicht, die eingetretene Schädigung adäquat zu reparieren. In Abhängigkeit vom Ausmaß des zellulären DNA-Schadens kann p53 auch die Apopto-

se der betreffenden Zelle einleiten. P53 fungiert somit als Tumorsuppressor, der einer unkontrollierten Proliferation bzw. Anhäufung geschädigter und mutierter Zellen Einhalt gebietet. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde das p53 auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet.

Mutationen des p53 können bei einer Vielzahl humaner Tumoren nachgewiesen werden. Mutiertes p53 ist im Stande, eine humorale Immunantwort zu induzieren. Die Prävalenz der p53-Autoantikörper korreliert hierbei nachgewiesenermaßen mit der p53-Überexpression bzw. p53-Mutationen, die zu nachfolgender Akkumulation des mutierten Proteins in der entarteten Zelle führen [67]. Das Auftreten der p53-Autoantikörper war bei vielen Tumoren mit einer schlechten Prognose verbunden [68, 69].

Serum-Autoantikörper, deren Epitope sich gegen p53 richten, wurden bereits in Zusammenhang mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen beschrieben: Di Cesare et al. konnten mittels ELISA in 9,4% der untersuchten Diabetes Typ1-Patientenseren entsprechende p53-Autoantikörper detektieren [92]. Kovacs et al. wiesen bei 32% der an SLE erkrankten Probanden und bei einigen an rheumatoider Arthritis und an Systemischer Sklerodermie erkrankten Patienten p53-Serum-Autoantikörper nach [93]. Mariette et al. konnten ebenfalls bei Patienten mit rheumatoider Arthritis Autoantikörper gegen p53 dokumentieren [94] und Fenton et al. gelang der Nachweis der p53-Antikörper auch bei 4,2% der untersuchten Patienten mit autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen [95].

Weshalb p53-Autoantikörper im Rahmen der aufgeführten Erkrankungen produziert werden, ist bislang unklar. In der Regel kommt es jedoch bei Autoimmunerkrankungen zu einer durch Entzündungsprozesse bedingten Gewebeschädigung. So ist auch das Guillain-Barré-Syndrom durch multifokal auftretende inflammatorische Läsionen des gesamten peripheren Nervensystems charakterisiert. Verschiedenen experimentellen Studien zufolge weisen eine Reihe entzündlicher Erkrankungen, darunter auch Erkrankungen autoimmuner Genese wie beispielsweise Morbus Crohn und die rheumatoide Arthritis, eine Überexpression von p53 auf [96-98]. DNA-Schäden, die durch

aus entzündlichem Gewebe stammenden Oxidantien verursacht werden, können eine Überexpression von p53 induzieren [99]. Proinflammatorische Zytokine bewirken ebenfalls eine vermehrte Expression von p53 [100]. Die gesteigerte Expression im Rahmen von Entzündungsprozessen, wie sie zweifelsohne auch beim GBS auftreten, könnte die Initiierung einer humoralen Immunantwort gegen p53 begründen.

Erwähnenswert ist auch, dass eine Autoantikörperantwort gegen p53 - zumindest bei Brustkrebskrankungen - die Formation eines Komplexes bestehend aus p53 und dem Hitze-Schockprotein Hsp70 erfordert [101]. Interessanterweise konnten Zhang et al. in entzündlichen Läsionen an EAN erkrankter Lewisratten unter anderem eine gesteigerte Expression von Hsp70 demonstrieren [102].

Das „*metastasis associated 1*“ (MTA1) zählte mit einem AUC Wert von 0,282 ebenfalls zu den klassifikationsrelevanten in-frame-Klonen. Das „*metastasis associated 1*“ (MTA1) wurde ursprünglich aus Adenokarzinomzelllinien der Brust isoliert [103]. Anhand von Northern-Blot-Analysen konnten Toh et al. damals eine bis zu vierfach erhöhte mRNA-Expression des MTA1-Genes im metastatischen Zellmaterial verglichen mit nichtmetastasiertem Zellgewebe feststellen. Welche Bedeutung ihm bei der Metastasierung maligner Tumoren genau zukommt, ist bislang nicht hinreichend geklärt. Nicolson et al. konnten demonstrieren, dass eine Hemmung endogener MTA1-Proteinexpression, die durch Applikation von Antisense-Oligonukleotiden herbeigeführt wurde, ein vermindertes Wachstum sowie eine verminderte Invasivität von MDA-MB-231 Brustkrebszellen bedingt [104]. In anderen Studien ließ sich die Überexpression von MTA1 signifikant mit einer gesteigerten Invasivität, einer vermehrten Metastasierung und einer schlechteren Prognose des Ösophaguskarzinoms korrelieren [105]. Struktur und Aktivität des MTA1 deuten auf wichtige Funktionen hinsichtlich zellulärer Signaltransduktion, Chromosomenmodifikation und Transkriptionsregulation hin.

Bei „Vimentin“ (VIM) handelt es sich um ein Typ3 Intermediärfilament aus der Gruppe der Desmine. Als intrazellulärer Bestandteil des Zytoskeletts erfüllt

es eine Stützfunktion und verleiht der Zelle somit mechanische Stabilität und Widerstandsfähigkeit. Exprimiert wird Vimentin vor allem in Zellen mesenchymaler Herkunft wie beispielsweise Endothelzellen und Fibroblasten.

Eine Überexpression von Vimentin konnte bei verschiedenen Hirntumoren demonstriert werden, vor allem aber bei Glioblastomen [106]. Dass Vimentin im Sinne eines Autoantigenes fungiert und als solches im Stande ist humorale Immunantworten zu induzieren, legen die Resultate verschiedener experimenteller Studien nahe: Hong et al. konnten bei 44% der untersuchten, an Pankreaskarzinom erkrankten Patienten eine Autoantikörperproduktion gegen eine bestimmte Isoform des Vimentins nachweisen. Im Gegensatz dazu wies keiner der untersuchten Kontrollprobanden und lediglich einer der in die Studie einbezogenen Patienten mit chronischer Pankreatitis Reaktivitäten gegen die besagte Vimentin-Isoform auf [107].

Autoreaktive Antikörper gegen Vimentin treten auch im Zusammenhang mit klassischen systemischen Autoimmunerkrankungen wie beispielweise der rheumatoiden Arthritis auf. Wagner et al. untersuchten Autoantikörper, deren Epitope sich gegen mutiertes und citrulliniertes Vimentin (anti-MCV-Antikörper) richteten, hinsichtlich ihrer Eignung als diagnostische und prognostische Marker für die rheumatoide Arthritis. Ihren Untersuchungen zufolge zeichnen sich die anti-MCV-Titer durch eine höhere Sensitivität bei seronegativen Patienten aus als andere diagnostische Marker wie beispielsweise Rheumafaktoren oder Anti-CCP-Autoantikörper. Zudem konnte eine signifikante Korrelation zwischen dem anti-MCV-Titer und der Krankheitsaktivität (DAS= disease activity score) demonstriert werden [108]. Erwähnenswert in diesem Kontext ist, dass auch bei anderen Autoimmunerkrankungen wie dem Sjögrens Syndrom und dem systemischen Lupus erythematoses entsprechende anti-MCV-Antikörper nachgewiesen werden konnten [109-111].

Einige Autoantigene entfalten erst durch strukturelle Modifikationen ihr autoimmunes Potential. Strukturell modifizierte Antigene können beispielsweise durch die enzymatische Aktivität verschiedener apoptotischer Proteasen entstehen. Diese proteolytischen Enzyme generieren neue Fragmente eines

Autoantigenes, die unter Umständen im Stande sind eine autoreaktive Immunantwort zu induzieren. Die Proteolyse des intakten, nativen Vimentins im Zuge apoptotischer Prozesse könnte somit ebenfalls eine Rolle für die Induktion einer humoralen Immunantwort spielen. Byun et al. konnten demonstrieren, dass es infolge induzierter Apoptose zu einem Caspasen-vermittelten Abbau des Vimentins in viele proteolytische Spaltprodukte kommt. Eines der proteolytischen Fragmente scheint zudem selbst eine pro-apoptotische Wirkung zu besitzen [112].

Desweiteren wird auch die Translokation intrazellulärer Autoantigene als Mechanismus zur Initiierung autoimmuner Reaktionen diskutiert. Interessanterweise können proinflammatorische Zytokine wie TNF α eine Sezernierung von Vimentin durch aktivierte Makrophagen triggeren. Antiinflammatorisch wirkendes Interleukin 10 (IL10) inhibiert jedoch die Sekretion [113]. Da das Guillain-Barré-Syndrom, wie andere Erkrankungen autoimmuner Genese, typischerweise mit Entzündungsprozessen einhergeht, könnte diese Beobachtung ebenfalls eine Erklärung für die Autoantikörperproduktion gegen dieses Intermediärfilament liefern.

Beim „*amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 1(Fe65)*“ (APBB1) handelt es sich um ein Adapterprotein aus der Genfamilie der Fe65-Proteine. Es wurde postuliert, dass der Interaktion zwischen Fe65 und dem Alzheimer precursor protein (APP) eine Bedeutung hinsichtlich der Zellmotilität zukommt [114]. Andere experimentelle Studien deuten auf transkriptionsregulierende Eigenschaften des Fe65 hin [115].

5.4 Frequenzanalyse der Autoantikörperantwort in den untersuchten Probandengruppen

Um weitere, bislang unbeschriebene Autoantigene zu identifizieren, die bei MG-Patienten bzw. GBS-Patienten zu einer humoralen Immunantwort führen, wurde anschließend eine Frequenzanalyse der Autoantikörperantwort in den drei untersuchten Probandengruppen durchgeführt (siehe Kapitel 4.3, S. 61). Für die nachfolgenden statistischen Auswertungen wurden nur diejenigen Klone berücksichtigt, welche mindestens doppelt so häufig zu Seroreaktivitäten in MG- bzw. GBS-Serumproben verglichen mit entsprechenden

Normalseren führten. Darüber hinaus sollten Reaktivitäten gegen die entsprechenden Klone in mindestens 20% der untersuchten Seren vorliegen.

Mit Hilfe des zweiseitigen Fisher Exact Probability Testes wurden unter den zuvor selektierten Klonen diejenigen bestimmt, die signifikant häufiger in Patienten-Seren im Vergleich zu Kontroll-Seren zu einer Antikörperantwort führten.

Im Einzelnen konnten hinsichtlich der untersuchten MG-Serumproben zwei in-frame-Klone identifiziert werden, die signifikante p-Werte aufwiesen. Die besagten in-frame-Klone repräsentieren dabei das „*40S ribosomal protein S13*“ (RPS13) sowie das „*proteasome (prosome, macropain) subunit alpha type 1*“ (PSMA1).

Beim „*40S ribosomal protein S13*“ (RPS13) handelt es sich um ein zytoplasmatisches Protein. Als Bestandteil der 40 S Untereinheit der Ribosomen ist es auch an deren enzymatischer Aktivität, der Proteinbiosynthese, beteiligt. Eine Autoimmunantwort gegen RPS13 wurde bereits im Zusammenhang mit dem systemischen Lupus erythematosus beschrieben: Mittels einer cDNA Phagen-Display-Bibliothek untersuchten Kemp et al. 15 Seren an SLE erkrankter Patienten auf mögliche Autoantigene. Im Rahmen dieses Immunoscreenings wurde unter anderem auch das RPS13 als potentielles SLE-assoziiertes Antigen identifiziert. Die Resultate wurden anschließend nochmals durch einen Radioimmunoassay verifiziert [116].

Das „*proteasome (prosome, macropain) subunit alpha type 1*“ (PSMA1) bildet eine der alpha-Untereinheiten des äußeren Ringes des 20S Proteasoms. Als Proteasome werden im Zellkern als auch im Zytosol vieler eukaryotischer Zellen vorkommende, multikatalytische Proteinasekomplexe bezeichnet, die einen proteolytischen Abbau geschädigter oder fehlgefalteter Peptide in einem ATP-/Ubiquitin-abhängigen Prozess vermitteln. In Eukaryoten setzt sich das Proteasom aus vier zylindrischen Ringen zusammen. Die beiden äußeren Ringe werden von sieben verschiedenen α -Untereinheiten gebildet. Die inneren Ringe bestehen aus sieben unterschiedlichen β -Untereinheiten. Eine Stimulation durch das Zytokin Interferon- α bewirkt in Säugerzellen einen

Austausch der aktiven β 1-, β 2- und β 5-Untereinheiten durch die sogenannten Immununtereinheiten LMP2(β 1i), MECL1(β 2i) und LMP7(β 5i). Die entstehenden modifizierten Proteasomen, die sogenannten Immunoproteasomen, zeichnen sich verglichen mit den konstitutiven Proteasomen durch eine verbesserte Generierung verschiedener MHC-Klasse-1-Epitope aus.

Autoantikörper, die sich gegen verschiedene Untereinheiten des 20S-Proteasoms richten, wurden bereits im Zusammenhang mit verschiedenen systemischen wie auch organspezifischen Autoimmunerkrankungen beschrieben: Feist et al. konnten bei 62% der untersuchten, an Myositis erkrankten Patienten und bei 58% der untersuchten, an SLE erkrankten Patienten spezifische Autoantikörper gegen Proteasomen detektieren. Die autoreaktiven Antikörper richteten sich dabei hauptsächlich gegen die Proteasomenuntereinheit HC9 (α 3) [117]. Scheffler et al. identifizierten mittels ELISA die Immununtereinheiten LMP2(β 1i) und LMP7(β 5i) als potentielle Autoantigene bei Patienten mit SLE, primärem Sjögren Syndrom und autoimmuner Myositis [118]. Mayo et al. beschrieben antiproteasomale Antikörper bei Patienten, die an multipler Sklerose erkrankt waren. Die Antikörper waren nicht nur im Serum (66%), sondern auch im Liquor (61%) der untersuchten Patienten nachweisbar. Die detektierten Autoantikörper richteten sich hierbei gegen die Proteasomenuntereinheiten HC8(α 7), HC9(α 3), Zeta(α 5) und HC2(α 6), welches mit dem von uns identifizierten PSMA1 identisch ist [119]. Interessanterweise konnten Egerer et al. bei verschiedenen Erkrankungen autoimmuner Genese wie beispielsweise dem SLE, der autoimmunen Myositis, dem primären Sjögren Syndrom und der rheumatoiden Arthritis erhöhte Serumkonzentrationen zirkulierender Proteasomen nachweisen. Die Serumkonzentrationen zirkulierender Proteasomen korrelierten dieser experimentellen Studie zufolge sogar mit der Krankheitsaktivität und dem Ausmaß des zellulären Schadens [120]. Ein Anstieg der Serumkonzentration zirkulierender Proteasomen im Rahmen autoimmuner Prozesse könnte die Induktion einer humoralen, antiproteasomalen Immunreaktion unter Umständen auch bei Patienten mit Myasthenie begründen. Möglicherweise sind die von uns detek-

tierten Antikörperspezifitäten auch als Epiphänomene zu werten, die sich bei unterschiedlichen autoimmun-vermittelten Erkrankungen finden lassen.

Hinsichtlich der GBS-Seren konnten ebenfalls zwei in-frame-Klone bestimmt werden, die signifikant häufiger in Patienten-Seren im Vergleich zu Kontroll-Seren zu einer Seroreaktivität führten. Im Einzelnen handelte es sich dabei um das „*tubulin beta 2A*“ (TUBB2A) und das „*ribosomal protein L29*“ (RPL29).

Bei „*tubulin beta 2A*“ (TUBB2A) handelt es sich um ein globuläres Protein, das am Aufbau der Mikrotubuli beteiligt ist. Diese bilden wiederum neben Mikrofilamenten und Intermediärfilamenten die Hauptbestandteile des Zytoskeletts.

Das „*ribosomal protein L29*“ (RPL29) zählt wie das oben angeführte RPS13 zu den ribosomalen Proteinen und ist als solches am Aufbau der 60S Unter-einheit der Ribosomen beteiligt.

Die Antigene „*tubulin beta 2A*“ (TUBB2A) und „*ribosomal protein L29*“ (RPL29) wurden bislang nicht im Kontext mit dem Guillain-Barré-Syndrom oder anderen Autoimmunerkrankungen beschrieben.

Zu betonen bleibt, dass im Rahmen der vorliegenden Untersuchung zwar neue, potentielle Autoantigene identifiziert werden konnten, diese jedoch - absolut gesehen - nicht allzu häufig zu Antikörperreaktivitäten in den untersuchten Serumproben führten. Autoantikörper gegen das „*40S ribosomal protein S13*“ (RPS13) wurden in 5 von 24 Myasthenie-Seren detektiert. Insgesamt 6 von 24 MG-Patienten wiesen Autoantikörper gegen das „*proteasome (prosome, macropain) subunit alpha type 1*“ (PSMA1) auf.

In 5 von 21 GBS-Serumproben waren Antikörper gegen das „*tubulin beta 2A*“ (TUBB2A) nachweisbar. Autoantikörper, die sich gegen das „*ribosomal protein L29*“ (RPL29) richteten, konnten in 5 von 22 GBS Serumproben detektiert werden.

In Anbetracht ihrer niedrigen Prävalenzen werden die von uns identifizierten Antigene wahrscheinlich keinen klinischen Nutzen im Sinne krankheitsspezi-

fischer Biomarker erfüllen können. Die eher geringe diagnostische Relevanz dieser neuen Antigene wird vor allem im Vergleich zum etablierten, serologischen Marker der Myasthenia gravis, dem nikotinischen Acetylcholinrezeptor, deutlich, welcher ausnahmslos bei allen 25 in die Studie einbezogenen Myasthenie-Patienten vorhanden war.

5.5 Konklusion

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass die mit Hilfe des Proteinmacroarray-Screenings erstellten Autoantikörperprofile weder eine zuverlässige statistische Differenzierung der Myasthenie-Patienten noch der GBS-Patienten von den gesunden Kontrollprobanden erlauben. Demzufolge besitzen die ermittelten Seroreaktivitätsprofile weder für die Myasthenia gravis noch für das Guillain-Barré-Syndrom eine diagnostische Aussagekraft.

Unsere Ergebnisse können somit dahingehend interpretiert werden, dass die Autoantikörperproduktion bei Patienten mit Myasthenia gravis einen relativ fokussierten antigen-spezifischen Prozess darstellt, der im Wesentlichen auf den nikotinischen Acetylcholinrezeptor beschränkt bleibt. Die Mechanismen, die zur Ausbildung einer zielgerichteten humoralen Immunantwort gegen den nikotinischen Acetylcholinrezeptor bei Patienten mit MG führen, verbleiben aktuell weiterhin unbekannt.

Patienten, die an Guillain-Barré-Syndrom erkrankt sind, weisen unseren Ergebnissen zufolge ebenfalls kein spezifisches, global verändertes Autoantikörperprofil auf.

Dennoch konnten einige bisher unbekannte Zielantigene identifiziert werden, gegen die sich im Rahmen einer Myasthenia gravis bzw. eines Guillain-Barré-Syndroms eine stärkere humorale Immunantwort als bei gesunden Kontrollen formiert.

Die Antigene „*tumor protein p53*“ (TP53) und „*vimentin*“ (VIM), die mit den höchsten Informationsgehalt für die Klassifikation der GBS-Seren versus der Kontroll-Seren besaßen, sind bereits im Kontext mit verschiedenen klassischen Autoimmunerkrankungen beschrieben.

Das „*ribosomal protein S13*“ (RPS13) sowie das „*proteasome subunit alpha type 1*“ (PSMA1), die den vorliegenden Ergebnissen zufolge signifikant häufiger in Myasthenie-Seren als in entsprechenden Kontroll-Seren zu einer Antikörperantwort führten, sind ebenfalls zuvor als potentielle Autoantigene identifiziert worden.

Inwieweit es sich bei den im Rahmen der vorliegenden Untersuchung identifizierten Autoantikörpern um Epiphänomene handelt, die sich bei unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen finden lassen oder ob ihnen tatsächlich eine mögliche Relevanz hinsichtlich der Ätiopathogenese der Myasthenia gravis beziehungsweise des Guillain-Barré-Syndroms zukommen könnte, muss in weiterführenden Studien untersucht werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Hughes, T., *The early history of myasthenia gravis*. Neuromuscul Disord, 2005. **15**(12): p. 878-86.
2. Grob, D., et al., *Lifetime course of myasthenia gravis*. Muscle Nerve, 2008. **37**(2): p. 141-9.
3. Lindstrom, J.M., *Acetylcholine receptors and myasthenia*. Muscle Nerve, 2000. **23**(4): p. 453-77.
4. Tzartos, S.J., et al., *Anatomy of the antigenic structure of a large membrane autoantigen, the muscle-type nicotinic acetylcholine receptor*. Immunol Rev, 1998. **163**: p. 89-120.
5. Tzartos, S.J., M.E. Seybold, and J.M. Lindstrom, *Specificities of antibodies to acetylcholine receptors in sera from myasthenia gravis patients measured by monoclonal antibodies*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(1): p. 188-92.
6. Patrick, J. and J. Lindstrom, *Autoimmune response to acetylcholine receptor*. Science, 1973. **180**(88): p. 871-2.
7. Sahashi, K., et al., *Ultrastructural localization of the terminal and lytic ninth complement component (C9) at the motor end-plate in myasthenia gravis*. J Neuropathol Exp Neurol, 1980. **39**(2): p. 160-72.
8. Engel, A.G., E.H. Lambert, and F.M. Howard, *Immune complexes (IgG and C3) at the motor end-plate in myasthenia gravis: ultrastructural and light microscopic localization and electrophysiologic correlations*. Mayo Clin Proc, 1977. **52**(5): p. 267-80.
9. Lennon, V.A., et al., *Role of complement in the pathogenesis of experimental autoimmune myasthenia gravis*. J Exp Med, 1978. **147**(4): p. 973-83.
10. Sahashi, K., et al., *Ultrastructural localization of immune complexes (IgG and C3) at the end-plate in experimental autoimmune myasthenia gravis*. J Neuropathol Exp Neurol, 1978. **37**(2): p. 212-23.
11. Drachman, D.B., et al., *Myasthenic antibodies cross-link acetylcholine receptors to accelerate degradation*. N Engl J Med, 1978. **298**(20): p. 1116-22.
12. Burges, J., et al., *A myasthenia gravis plasma immunoglobulin reduces miniature endplate potentials at human endplates in vitro*. Muscle Nerve, 1990. **13**(5): p. 407-13.
13. Gomez, C.M. and D.P. Richman, *Anti-acetylcholine receptor antibodies directed against the alpha-bungarotoxin binding site induce a unique form of experimental myasthenia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(13): p. 4089-93.
14. Lindstrom, J.M., et al., *Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis. Prevalence, clinical correlates, and diagnostic value*. Neurology, 1976. **26**(11): p. 1054-9.
15. Lefvert, A.K., et al., *Determination of acetylcholine receptor antibody in myasthenia gravis: clinical usefulness and pathogenetic implications*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1978. **41**(5): p. 394-403.
16. Vincent, A., et al., *Seronegative myasthenia gravis*. Semin Neurol, 2004. **24**(1): p. 125-33.

17. Hoch, W., et al., *Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies*. Nat Med, 2001. **7**(3): p. 365-8.
18. Baggi, F., et al., *Anti-titin and antiryanodine receptor antibodies in myasthenia gravis patients with thymoma*. Ann N Y Acad Sci, 1998. **841**: p. 538-41.
19. Mohan, S., et al., *Evaluation of myosin-reactive antibodies from a panel of myasthenia gravis patients*. Clin Immunol Immunopathol, 1994. **70**(3): p. 266-73.
20. Hohlfeld, R., et al., *Autoimmune human T lymphocytes specific for acetylcholine receptor*. Nature, 1984. **310**(5974): p. 244-6.
21. K., P.I., J.F. Howard, Jr., and B.M. Conti-Fine, *Myasthenia in SCID mice grafted with myasthenic patient lymphocytes: role of CD4+ and CD8+ cells*. Neurology, 1999. **52**(3): p. 484-97.
22. Kaul, R., M. Shenoy, and P. Christadoss, *The role of major histocompatibility complex genes in myasthenia gravis and experimental autoimmune myasthenia gravis pathogenesis*. Adv Neuroimmunol, 1994. **4**(4): p. 387-402.
23. Balandina, A., et al., *Functional defect of regulatory CD4(+)CD25+ T cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis*. Blood, 2005. **105**(2): p. 735-41.
24. Melms, A., et al., *T cells from normal and myasthenic individuals recognize the human acetylcholine receptor: heterogeneity of antigenic sites on the alpha-subunit*. Ann Neurol, 1992. **31**(3): p. 311-8.
25. Schlupe, M., et al., *Acetylcholine receptors in human thymic myoid cells in situ: an immunohistological study*. Ann Neurol, 1987. **22**(2): p. 212-22.
26. Landry, *Note sur la paralysie ascendante aigue*. Gaz hebdomadaire Méd Chir, 1859. **6**: p. 472-474, 486-488.
27. Guillain G, B.J., Strohl A, *Sur un syndrome de radiculonevrite avec hyperalbuminose du liquide cephalo-rachidien sans reaction cellulaire. Remarques sur les caracteres cliniques et graphiques des reflexes tendineux*. Bull Soc Med Hop Paris, 1916: p. 1462-70.
28. Draganesco H, C.J., *A case of curable radiculo-neuritis (Guillain and Barré's syndrome appeared during an osteo-myelitis of the arm)*. Revue Neurol, 1927. **48**: p. 517-521.
29. Hughes, R.A. and D.R. Cornblath, *Guillain-Barre syndrome*. Lancet, 2005. **366**(9497): p. 1653-66.
30. Van Koningsveld, R., et al., *Mild forms of Guillain-Barre syndrome in an epidemiologic survey in The Netherlands*. Neurology, 2000. **54**(3): p. 620-5.
31. Rees, J.H., et al., *Epidemiological study of Guillain-Barre syndrome in south east England*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1998. **64**(1): p. 74-7.
32. Hughes, R.A. and J.H. Rees, *Clinical and epidemiologic features of Guillain-Barre syndrome*. J Infect Dis, 1997. **176 Suppl 2**: p. S92-8.
33. Bogliun, G. and E. Beghi, *Incidence and clinical features of acute inflammatory polyradiculoneuropathy in Lombardy, Italy, 1996*. Acta Neurol Scand, 2004. **110**(2): p. 100-6.

34. Cosi, V. and M. Versino, *Guillain-Barre syndrome*. *Neurol Sci*, 2006. **27 Suppl 1**: p. S47-51.
35. Winer, J.B., et al., *A prospective study of acute idiopathic neuropathy. II. Antecedent events*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1988. **51(5)**: p. 613-8.
36. Allos, B.M., *Campylobacter jejuni infection as a cause of the Guillain-Barre syndrome*. *Infect Dis Clin North Am*, 1998. **12(1)**: p. 173-84.
37. Jacobs, B.C., et al., *The spectrum of antecedent infections in Guillain-Barre syndrome: a case-control study*. *Neurology*, 1998. **51(4)**: p. 1110-5.
38. Kaplan, J.E., et al., *Guillain-Barre syndrome in the United States, 1979-1980 and 1980-1981. Lack of an association with influenza vaccination*. *JAMA*, 1982. **248(6)**: p. 698-700.
39. Arnason, B.G. and A.K. Asbury, *Idiopathic polyneuritis after surgery*. *Arch Neurol*, 1968. **18(5)**: p. 500-7.
40. Asbury, A.K., B.G. Arnason, and R.D. Adams, *The inflammatory lesion in idiopathic polyneuritis. Its role in pathogenesis*. *Medicine (Baltimore)*, 1969. **48(3)**: p. 173-215.
41. Prineas, J.W., *Pathology of the Guillain-Barre syndrome*. *Ann Neurol*, 1981. **9 Suppl**: p. 6-19.
42. Waksman, B.H. and R.D. Adams, *Allergic neuritis: an experimental disease of rabbits induced by the injection of peripheral nervous tissue and adjuvants*. *J Exp Med*, 1955. **102(2)**: p. 213-36.
43. Creange, A., et al., *Matrix metalloproteinase-9 is increased and correlates with severity in Guillain-Barre syndrome*. *Neurology*, 1999. **53(8)**: p. 1683-91.
44. Kieseier, B.C., et al., *Advances in understanding and treatment of immune-mediated disorders of the peripheral nervous system*. *Muscle Nerve*, 2004. **30(2)**: p. 131-56.
45. Hughes, R., et al., *Subacute idiopathic demyelinating polyradiculoneuropathy*. *Arch Neurol*, 1992. **49(6)**: p. 612-6.
46. Schmidt, B., et al., *Inflammatory infiltrates in sural nerve biopsies in Guillain-Barre syndrome and chronic inflammatory demyelinating neuropathy*. *Muscle Nerve*, 1996. **19(4)**: p. 474-87.
47. Taylor, W.A. and R.A. Hughes, *T lymphocyte activation antigens in Guillain-Barre syndrome and chronic idiopathic demyelinating polyradiculoneuropathy*. *J Neuroimmunol*, 1989. **24(1-2)**: p. 33-9.
48. Hartung, H.P., et al., *T cell activation in Guillain-Barre syndrome and in MS: elevated serum levels of soluble IL-2 receptors*. *Neurology*, 1990. **40(2)**: p. 215-8.
49. Gold, R., H.P. Hartung, and K.V. Toyka, *Animal models for autoimmune demyelinating disorders of the nervous system*. *Mol Med Today*, 2000. **6(2)**: p. 88-91.
50. Hartung, H.P., et al., *Guillain-Barre syndrome: activated complement components C3a and C5a in CSF*. *Neurology*, 1987. **37(6)**: p. 1006-9.
51. Hafer-Macko, C.E., et al., *Immune attack on the Schwann cell surface in acute inflammatory demyelinating polyneuropathy*. *Ann Neurol*, 1996. **39(5)**: p. 625-35.

52. Willison, H.J. and N. Yuki, *Peripheral neuropathies and anti-glycolipid antibodies*. Brain, 2002. **125**(Pt 12): p. 2591-625.
53. Avrameas, S., *Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnothi seauton'*. Immunol Today, 1991. **12**(5): p. 154-9.
54. Casali, P., et al., *Human lymphocytes making rheumatoid factor and antibody to ssDNA belong to Leu-1+ B-cell subset*. Science, 1987. **236**(4797): p. 77-81.
55. Boes, M., *Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses*. Mol Immunol, 2000. **37**(18): p. 1141-9.
56. Avrameas, S. and T. Ternynck, *The natural autoantibodies system: between hypotheses and facts*. Mol Immunol, 1993. **30**(12): p. 1133-42.
57. Zhou, Z.H., et al., *The broad antibacterial activity of the natural antibody repertoire is due to polyreactive antibodies*. Cell Host Microbe, 2007. **1**(1): p. 51-61.
58. Chou, M.Y., et al., *Oxidation-specific epitopes are dominant targets of innate natural antibodies in mice and humans*. J Clin Invest, 2009. **119**(5): p. 1335-49.
59. Rosen, A. and L. Casciola-Rosen, *Autoantigens in systemic autoimmunity: critical partner in pathogenesis*. J Intern Med, 2009. **265**(6): p. 625-31.
60. Ichiyoshi, Y., M. Zhou, and P. Casali, *A human anti-insulin IgG autoantibody apparently arises through clonal selection from an insulin-specific "germ-line" natural antibody template. Analysis by V gene segment reassortment and site-directed mutagenesis*. J Immunol, 1995. **154**(1): p. 226-38.
61. Rodien, P., et al., *Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in autoimmune thyroid disease: relationship to antithyroperoxidase antibodies*. J Clin Endocrinol Metab, 1996. **81**(7): p. 2595-600.
62. Abramson, N., et al., *The interaction between human monocytes and red cells. Specificity for IgG subclasses and IgG fragments*. J Exp Med, 1970. **132**(6): p. 1207-15.
63. McMillan, R., et al., *In vitro platelet phagocytosis by splenic leukocytes in idiopathic thrombocytopenic purpura*. N Engl J Med, 1974. **290**(5): p. 249-51.
64. Singh, R.R., *SLE: translating lessons from model systems to human disease*. Trends Immunol, 2005. **26**(11): p. 572-9.
65. Dayan, C.M. and G.H. Daniels, *Chronic autoimmune thyroiditis*. N Engl J Med, 1996. **335**(2): p. 99-107.
66. Jones, D.E., *Pathogenesis of primary biliary cirrhosis*. Gut, 2007. **56**(11): p. 1615-24.
67. Soussi, T., *p53 Antibodies in the sera of patients with various types of cancer: a review*. Cancer Res, 2000. **60**(7): p. 1777-88.
68. Mayerhofer, K., et al., *Humoral p53 antibody response is a prognostic parameter in ovarian cancer*. Anticancer Res, 1999. **19**(1B): p. 875-8.
69. Kressner, U., et al., *Increased serum p53 antibody levels indicate poor prognosis in patients with colorectal cancer*. Br J Cancer, 1998. **77**(11): p. 1848-51.

70. Kurtenkov, O., et al., *Humoral immune response to MUC1 and to the Thomsen-Friedenreich (TF) glycotope in patients with gastric cancer: relation to survival*. *Acta Oncol*, 2007. **46**(3): p. 316-23.
71. Hamanaka, Y., et al., *Circulating anti-MUC1 IgG antibodies as a favorable prognostic factor for pancreatic cancer*. *Int J Cancer*, 2003. **103**(1): p. 97-100.
72. Nielen, M.M., et al., *Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors*. *Arthritis Rheum*, 2004. **50**(2): p. 380-6.
73. Arbuckle, M.R., et al., *Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus*. *N Engl J Med*, 2003. **349**(16): p. 1526-33.
74. Buyon, J.P. and R. Winchester, *Congenital complete heart block. A human model of passively acquired autoimmune injury*. *Arthritis Rheum*, 1990. **33**(5): p. 609-14.
75. Ravirajan, C.T., et al., *An analysis of clinical disease activity and nephritis-associated serum autoantibody profiles in patients with systemic lupus erythematosus: a cross-sectional study*. *Rheumatology (Oxford)*, 2001. **40**(12): p. 1405-12.
76. Bussow, K., et al., *A method for global protein expression and antibody screening on high-density filters of an arrayed cDNA library*. *Nucleic Acids Res*, 1998. **26**(21): p. 5007-8.
77. Vapnik, V.N., ed. *The Nature of Statistical Learning Theory*. 1995, Springer: Berlin.
78. Lin, H.S., et al., *Autoantibody approach for serum-based detection of head and neck cancer*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2007. **16**(11): p. 2396-405.
79. Cepok, S., et al., *Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(5): p. 1352-60.
80. Ludwig, N., et al., *Improving seroreactivity-based detection of glioma*. *Neoplasia*, 2009. **11**(12): p. 1383-9.
81. Brahms, H., et al., *The C-terminal RG dipeptide repeats of the spliceosomal Sm proteins D1 and D3 contain symmetrical dimethylarginines, which form a major B-cell epitope for anti-Sm autoantibodies*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(22): p. 17122-9.
82. Neugebauer, K.M., et al., *SR proteins are autoantigens in patients with systemic lupus erythematosus. Importance of phosphoepitopes*. *Arthritis Rheum*, 2000. **43**(8): p. 1768-78.
83. Makrides, S.C., *Strategies for achieving high-level expression of genes in Escherichia coli*. *Microbiol Rev*, 1996. **60**(3): p. 512-38.
84. Morgenthaler, N.G., et al., *Direct binding of thyrotropin receptor autoantibody to in vitro translated thyrotropin receptor: a comparison to radioreceptor assay and thyroid stimulating bioassay*. *Thyroid*, 1999. **9**(5): p. 466-75.
85. Leidinger, P., et al., *Novel autoantigens immunogenic in COPD patients*. *Respir Res*, 2009. **10**: p. 20.
86. Bussow, K., et al., *A human cDNA library for high-throughput protein expression screening*. *Genomics*, 2000. **65**(1): p. 1-8.

87. Wang, X., et al., *Autoantibody signatures in prostate cancer*. N Engl J Med, 2005. **353**(12): p. 1224-35.
88. Somers, V., et al., *Autoantibody profiling in multiple sclerosis reveals novel antigenic candidates*. J Immunol, 2008. **180**(6): p. 3957-63.
89. Wells, S.E., et al., *Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors*. Mol Cell, 1998. **2**(1): p. 135-40.
90. Sachs, A.B. and R.W. Davis, *The poly(A) binding protein is required for poly(A) shortening and 60S ribosomal subunit-dependent translation initiation*. Cell, 1989. **58**(5): p. 857-67.
91. Takashima, N., et al., *Expression and prognostic roles of PABPC1 in esophageal cancer: correlation with tumor progression and postoperative survival*. Oncol Rep, 2006. **15**(3): p. 667-71.
92. Di Cesare, E., et al., *Serum anti-p53 autoantibodies in patients with type 1 diabetes*. Ann Clin Lab Sci, 2001. **31**(3): p. 253-8.
93. Kovacs, B., et al., *Antibodies against p53 in sera from patients with systemic lupus erythematosus and other rheumatic diseases*. Arthritis Rheum, 1997. **40**(5): p. 980-2.
94. Mariette, X., et al., *Anti-p53 antibodies are rarely detected in serum of patients with rheumatoid arthritis and Sjogren's syndrome*. J Rheumatol, 1999. **26**(8): p. 1672-5.
95. Fenton, C.L., et al., *Autoantibodies to p53 in sera of patients with autoimmune thyroid disease*. Ann Clin Lab Sci, 2000. **30**(2): p. 179-83.
96. Krishna, M., et al., *Expression of p53 antigen in inflamed and regenerated mucosa in ulcerative colitis and Crohn's disease*. Mod Pathol, 1995. **8**(6): p. 654-7.
97. Tak, P.P., et al., *p53 overexpression in synovial tissue from patients with early and longstanding rheumatoid arthritis compared with patients with reactive arthritis and osteoarthritis*. Arthritis Rheum, 1999. **42**(5): p. 948-53.
98. Maacke, H., et al., *Overexpression of p53 protein during pancreatitis*. Br J Cancer, 1997. **75**(10): p. 1501-4.
99. Tak, P.P., et al., *Rheumatoid arthritis and p53: how oxidative stress might alter the course of inflammatory diseases*. Immunol Today, 2000. **21**(2): p. 78-82.
100. Ladiwala, U., et al., *p53 induction by tumor necrosis factor-alpha and involvement of p53 in cell death of human oligodendrocytes*. J Neurochem, 1999. **73**(2): p. 605-11.
101. Davidoff, A.M., J.D. Iglehart, and J.R. Marks, *Immune response to p53 is dependent upon p53/HSP70 complexes in breast cancers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(8): p. 3439-42.
102. Zhang, Z.Y., Z. Zhang, and H.J. Schluesener, *Toll-like receptor-2, CD14 and heat-shock protein 70 in inflammatory lesions of rat experimental autoimmune neuritis*. Neuroscience, 2009. **159**(1): p. 136-42.
103. Toh, Y., S.D. Pencil, and G.L. Nicolson, *A novel candidate metastasis-associated gene, mta1, differentially expressed in highly metastatic mammary adenocarcinoma cell lines. cDNA cloning, expression, and protein analyses*. J Biol Chem, 1994. **269**(37): p. 22958-63.
104. Nicolson, G.L., et al., *Tumor metastasis-associated human MTA1 gene and its MTA1 protein product: role in epithelial cancer cell inva-*

- sion, proliferation and nuclear regulation. Clin Exp Metastasis, 2003. 20(1): p. 19-24.*
105. Toh, Y., et al., *Expression of the metastasis-associated MTA1 protein and its relationship to deacetylation of the histone H4 in esophageal squamous cell carcinomas. Int J Cancer, 2004. 110(3): p. 362-7.*
 106. Colin, C., et al., *Relevance of combinatorial profiles of intermediate filaments and transcription factors for glioma histogenesis. Neuropathol Appl Neurobiol, 2007. 33(4): p. 431-9.*
 107. Hong, S.H., et al., *Identification of a Specific Vimentin Isoform That Induces an Antibody Response in Pancreatic Cancer. Biomark Insights, 2006. 1: p. 175-183.*
 108. Wagner, E., et al., *Antibody against mutated citrullinated vimentin: a new sensitive marker in the diagnosis of rheumatoid arthritis. Rheumatol Int, 2009. 29(11): p. 1315-21.*
 109. Bang, H., et al., *Mutation and citrullination modifies vimentin to a novel autoantigen for rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum, 2007. 56(8): p. 2503-11.*
 110. Alcover, A., et al., *Antibodies to vimentin intermediate filaments in sera from patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum, 1984. 27(8): p. 922-8.*
 111. Kurki, P., T. Helve, and I. Virtanen, *Antibodies to cytoplasmic intermediate filaments in rheumatic diseases. J Rheumatol, 1983. 10(4): p. 558-62.*
 112. Byun, Y., et al., *Caspase cleavage of vimentin disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis. Cell Death Differ, 2001. 8(5): p. 443-50.*
 113. Mor-Vaknin, N., et al., *Vimentin is secreted by activated macrophages. Nat Cell Biol, 2003. 5(1): p. 59-63.*
 114. Sabo, S.L., et al., *The Alzheimer amyloid precursor protein (APP) and FE65, an APP-binding protein, regulate cell movement. J Cell Biol, 2001. 153(7): p. 1403-14.*
 115. Bruni, P., et al., *Fe65, a ligand of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein, blocks cell cycle progression by down-regulating thymidylate synthase expression. J Biol Chem, 2002. 277(38): p. 35481-8.*
 116. Kemp, E.H., et al., *Immunoscreening of phage-displayed cDNA-encoded polypeptides identifies B cell targets in autoimmune disease. Biochem Biophys Res Commun, 2002. 298(1): p. 169-77.*
 117. Feist, E., et al., *Proteasome alpha-type subunit C9 is a primary target of autoantibodies in sera of patients with myositis and systemic lupus erythematosus. J Exp Med, 1996. 184(4): p. 1313-8.*
 118. Scheffler, S., et al., *Autoimmune reactivity against the 20S-proteasome includes immunosubunits LMP2 (beta1i), MECL1 (beta2i) and LMP7 (beta5i). Rheumatology (Oxford), 2008. 47(5): p. 622-6.*
 119. Mayo, I., et al., *The proteasome is a major autoantigen in multiple sclerosis. Brain, 2002. 125(Pt 12): p. 2658-67.*
 120. Egerer, K., et al., *Circulating proteasomes are markers of cell damage and immunologic activity in autoimmune diseases. J Rheumatol, 2002. 29(10): p. 2045-52.*

7 Publikationen

Myasthenia gravis: Analysis of serum autoantibody reactivities to 1827 putative human autoantigens by protein macroarrays

Anne Becker, Nicole Ludwig, Andreas Keller, Björn Tackenberg, Klaus Faßbender, Eckart Meese, Klemens Ruprecht

(in preparation)

8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Klaus Faßbender danke ich für die interessante Themenstellung und die Bereitschaft auftretende Schwierigkeiten konstruktiv anzugehen.

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Dr. med. Klemens Ruprecht, der zum kontinuierlichen Fortgang dieser Arbeit motivierte und diese kritisch durchsah.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Eckart Meese für die Möglichkeit die erforderlichen experimentellen Untersuchungen in den Laborräumen des Instituts für Humangenetik durchzuführen. Im Labor trug der freundliche Umgang der Mitarbeiter untereinander zu einer angenehmen Arbeitsatmosphäre bei.

Im Besonderen danke ich Dr. rer. nat. Nicole Ludwig für ihre fachkundigen Ratschläge und wertvollen Anregungen, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen. Nicole Ludwig war für mich eine zuverlässige Ansprechpartnerin, die mich freundschaftlich unterstützte.

Bei Herrn Prof. Dr. Klaus Faßbender, Herrn Dr. Bernhard Stephan und Herrn Dr. Björn Tackenberg bedanke ich mich für die Bereitstellung der erforderlichen Serumproben.

Den Mitarbeitern des Zentrums für Bioinformatik unter der Leitung von Prof. Dr. Hans-Peter Lenhof danke ich für die statistische Auswertung der experimentellen Daten des Proteinmacroarray-Screenings.

Meinen Eltern danke ich, die mir durch ihre finanzielle Unterstützung das Studium der Humanmedizin ermöglichten. Besonderer Dank gilt meinem Vater für die Durchsicht der Arbeit sowie für die kompetente Unterstützung bei EDV-technischen Fragen.

In meine Danksagung miteinbeziehen möchte ich Marc Weber, dem es gelang selbst kritische Situationen noch aufbauend zu kommentieren.

9 Lebenslauf

Name: Anne Becker

Adresse: Lebacher Straße 80
66571 Eppelborn

Geburtsdatum: 31.07.1985

Geburtsort: Göttingen

Familienstand: ledig

Familie: Dr. rer. nat. Dipl. Chem. Ludwig Becker
Ursula Pfangert- Becker, geb. Pfangert
Julia Becker

Schullaufbahn: Grundschule Dirmingen 1991-1995
Arnold-Janssen-Gymnasium St. Wendel 1995-2004
Abitur 18.06.2004

Studium: Beginn des Studiums der Humanmedizin im Wintersemester 2004/05 an der Universität des Saarlandes Homburg/Saar
31.08.2006 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung erfolgreich abgelegt

Famulaturen: 03/2007 Neurologie, Universitätsklinikum des Saarlandes
09/2007 Plastische Chirurgie, Caritasklinik Lebach
08/2008 Praxis für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Christiane Martin, Saarbrücken