

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
Tübingen
Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz**

**Identifizierung von Alpha-Tubulin als neues
Targetantigen von Antikörpern bei Patienten mit
neuropsychiatrischer Manifestation einer
Kollagenerkrankung**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der
Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
Tübingen**

**vorgelegt von
Mathias Dumakude Ndhlovu
Berlin**

2011

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Frau Professor Dr. R. Klein

2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Stevanovic

3. Berichterstatter: Professor Dr. U. Müller-Ladner

Inhaltsverzeichnis	Seite
Abkürzungen	V
A. Einführung	1
1. Kollagenosen im Allgemeinen	1
2. Kollagenosen in der Geschichte	2
3. Klinisches Spektrum der neuropsychiatrischen Symptome	3
4. Pathologische Veränderungen bei Patienten mit Kollagenosen	6
5. Bildgebende Diagnostik	7
6. Antikörper-Phänomene	7
7. Anti-ZNS-Antikörper	8
8. Ziel der Arbeit	9
B. Patienten, Material und Methoden	10
1. Patienten	10
2. Materialien	12
2.1 Labormaterialien und Geräte	12
2.2 Reagenzien	13
2.3 Antikörper und Antigen	15
2.4 Pufferansätze und andere selbsthergestellte Flüssigkeiten	16
2.5 Restriktionsenzyme	20
2.6 Anhang	21
3. Methoden	25
3.1 Präparation des ZNS-Antigens aus Rinderhirn	25
3.2 Proteinbestimmung nach Bradford	25
3.3 Methoden zum Nachweis von Autoantikörpern	26
3.3.1 ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)	26

3.3.2	Gelelektrophorese und Westernblot	27
3.3.2.1	Westernblot unter Verwendung des 100 000 g SN aus Rinderhirn	27
3.3.2.2	Westernblot unter Verwendung der eluierten Antigenbande	27
3.3.2.3	Westernblot unter Verwendung des rekombinant hergestellten Proteins	28
3.3.2.4	Transferbedingungen	28
3.3.2.5	Inkubation und Anfärbung der PVDF Transfer Membranen	28
3.4	Coomassie-Blue-Färbung	29
3.5	Elektroelution	29
3.6	Lyophilisation	30
3.7	Molekulargewichtsmarker und DNA-Leiter	30
3.8	Sequenzierung von Antigen determinanten	31
3.9	Herstellung des rekombinanten Antigens	31
3.9.1	Isolierung von mRNA aus Chang-Zellen	33
3.9.2	Herstellung von komplementärer cDNA aus mRNA	33
3.9.3	Basensequenz des Proteins	35
3.9.4	Primer zur Amplifikation der gewünschten cDNA-Sequenz	35
3.9.5	Amplifikation der gewünschten cDNA-Sequenz	37
3.9.6	Aufreinigung des PCR-Produkts	39
3.9.7	Ligation der cDNA mit Plasmid	39
3.9.8	Herstellung kompetenter Escherichia coli	40
3.9.9	Transformation von kompetenten E. coli	40
3.9.10	Kontrollen der erfolgten Transformation	40
3.9.11	Herstellung von Glycerin Stocks	43
3.9.12	Expression und Aufreinigung von Proteinen	43
3.9.13	Kurzer Einschub zum Verständnis der Funktionsweise von Plasmid und His-tagged Proteinen (engl.: tag = Anhänger)	47
C.	ERGEBNISSE	48
1.	Screening nach Antigen-Determinanten	48

2.	Isolation und Identifikation der Antigen determinante	49
3.	Verifizierung der Anwesenheit von Alpha-Tubulin in der 31 kD-Determinante und Etablierung von Referenzbanden im Westernblot	50
4.	Westernblot der isolierten 31 kD-Antigen determinante	52
5.1	Rekombinante Herstellung von Alpha-Tubulin	54
5.2	Analyse des Alpha-Tubulin synthetisierenden Bakterienklons	55
6.	Überprüfung der Funktionstüchtigkeit des rekombinant hergestellten Alpha-Tubulins und Gegenüberstellung mit 100 000 g SN aus Rinderhirn	57
7.	Westernblots mit rekombinant hergestelltem Alpha-Tubulin	59
8.	Ausschluss unspezifischer Reaktionen im Westernblot mit rekombinant hergestelltem Alpha-Tubulin	60
9.	Gegenüberstellung Westernblot und Elisa	61
10.	Ergebnisse des Elisa	61
11.	Ergebnisse des Elisa und des Westernblots der Kontrollgruppe von MS-Patienten	62
12.	Ergebnisse des Elisa der Kontrollgruppe von Epilepsie-Patienten	63
13.	Zusammenfassung der Ergebnisse	63
D.	Diskussion	65
1.	Fragestellung der Dissertation	65
2.	Nachweis von Antikörpern in Westernblot und Elisa	66
3.	Wahl des Untersuchungsmaterials	67
4.	Schwierigkeit der Vergleichbarkeit der Untersuchungsergebnisse von Westernblot und Elisa	68
5.	Analyse der Sequenzierung der 31 kD Determinante	69
6.	Wahl des Expressionssystems für die rekombinante Herstellung von Alpha-Tubulin	70

7.	Grundvoraussetzungen und Probleme bei der rekombinanten Herstellung von Alpha-Tubulin	71
8.	Proteinexpression und ausgetauschte Aminosäuren	72
9.	Untersuchungen mit rekombinant hergestelltem Alpha-Tubulin	73
10.	Alpha-Tubulin und seine Funktion	74
11.	Zugang der Anti-neuronalen-Antikörper in das ZNS	75
12.	Pathomechanismen bei der Entstehung neuropsychiatrischer Symptome	76
13.	Antikörper gegen Mikrotubuli assoziierte Proteine	77
14.	Auto-Antikörper und weitere Phänomene bei neuropsychiatrischen Manifestationen einer Kollagenose	78
15.	Neuropsychiatrischer Manifestationen bei Kollagenosen - ein multifaktorielles Geschehen	80
16.	Grundprobleme in Therapie und Forschung	81
E.	Zusammenfassung	83
F.	Literaturnachweis	85

Abkürzungen

A	Adenin
ACR	American College of Rheumatology
AEC	Amino-Ethylcarbazol (engl.: Amino-Ethylcarbazole)
Ag	Antigen
AK	Antikörper
bp	Basenpaar
BSA	Albumin aus Rinderseren (engl.: bovine serum albumine)
c	Cytosin
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure (engl.: copy deoxyribonucleic acid)
D	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: deoxyribonucleic acid)
dNTP	desoxy-Nukleosid-Tri-Phosphat
E. coli	Escherichia coli
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FCS	Fetales Kalbsserum (engl.: fetale calf sera)
g	Guanin
Map	Microtubulin-assoziiertes-Protein
Min	Minute
MG	Molekulargewicht
mRNA	messenger RNA
NPSLE	Neuropsychiatrischer systemischer Lupus erythematodes
kD	kilo Dalton
OD600	Optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
SN	Überstand (engl.: Supernatant)
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)
Rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: rounds per minutes)

RT	reverse Transkriptase
t	Thymin
u	Uracil
V	Volt
ZNS	Zentrales Nervensystem
()	Zahlen in runden Klammern verweisen auf das Literaturverzeichnis

A. Einführung

1. Kollagenosen im Allgemeinen

Kollagenosen sind eine Krankheitsgruppe, deren gemeinsames Merkmal Autoimmunphänomene sind, die zu systemischen Gefäßentzündungen sowie entzündlichen Prozessen des Bindegewebes bzw. interstitieller Fasern führen (64). In Deutschland leiden 0.2 % der Bevölkerung an Kollagenosen (Gesundheitsberichterstattung des Bundes 1999), wobei Frauen deutlich häufiger betroffen sind als Männer (Gynätropie).

Zu der Krankheitsgruppe der Kollagenosen gehören im engeren Sinne der systemische und chronisch diskoidale Lupus erythematoses, die progressive systemische Sklerodermie, das Sharp-Syndrom, das primäre Sjögren-Syndrom, die Dermatomyositis und die Polymyositis. Vor allem beim systemischen Lupus erythematoses handelt es sich um eine sehr komplexe Multisystemerkrankung. Sie zeichnet sich durch diverse klinische Manifestationen in unterschiedlichen Organen des Körpers mit variablem Verlauf und unterschiedlicher Prognose aus. Dabei reicht das klinische Bild von Allgemeinbeschwerden (95 %), Muskel-/ Gelenkbeschwerden (Polyarthritiden > 80 %, Myositis 40 %), Hautveränderungen (> 70 %) bis hin zu Organveränderungen wie kardiopulmonalen Veränderungen (60 – 70 %), Nierenveränderungen (60 – 70 %) und neuropsychiatrischen Manifestationen (26 – 70 %) (siehe Tabelle 1) (15, 28, 29, 38, 51, 77, 90, 99).

Unter diesen Manifestationen ist vor allem die Beteiligung des Nervensystems von grosser Bedeutung, da sie in einem hohen Prozentsatz zur Morbidität und Mortalität des systemischen Lupus erythematoses (SLE) beiträgt. Durch jahrelange Forschung ist es zu einem deutlichen Rückgang der Todesfälle bei neuropsychiatrischen systemischen Lupus erythematoses (NPSLE) gekommen (in den Jahren 1950 - 1955 ca. 26 % der Todesfälle bei SLE) (25), es werden jedoch immer noch ca. 7 - 13 % der Todesfälle

des SLE einer neuropsychiatrischen Beteiligung zugeschrieben (29, 31, 34, 93, 105, 122).

Tab. 1: Häufigkeit der Manifestationen bei systemischem Lupus erythematodes

Häufigkeit der Manifestationen bei SLE	in %
Arthralgien	95
Haut	80
Hämatologische Veränderungen	85
Neuropsychiatrische Veränderungen	60
Pulmonal/Respiratorisch	60
Nieren	55
Myalgien	50
Herz	50
Gastrointestinal	45
Hepatosplenomegalie	35
Sicca-Syndrome	10
Thrombophlebitis	9

2. Kollagenosen in der Geschichte

Historisch gesehen lässt sich die Beschreibung einer ZNS-Beteiligung bei Patienten mit SLE erstmals 1872 in der Literatur von Kaposy feststellen (62). Er und Hebra beschrieben 1875 die Symptome Stupor und Koma bei Patienten mit SLE (46). Erst Jahrzehnte später, zwischen 1949 und 1966, beleuchteten Harvey et al (45). sowie Dubois und Kollegen (23-25) das klinische Spektrum des NPSLE. Die ersten publizierten Diskussionen über die

Pathoätiologie des NPSLE wurden 1968 von Johnson und Richardson (58) veröffentlicht. In den darauffolgenden Jahren versuchten zahlreiche unterschiedliche Forschergruppen mögliche Pathomechanismen aufzudecken.

3. Klinisches Spektrum der neuropsychiatrischen Symptome

Die Symptome bei Patienten mit neuropsychiatrischem SLE sind oft unspezifisch, sehr vielfältig und breit gefächert. Zu ihnen gehören unter anderem neurologische Symptome wie Kopfschmerzen, aber auch psychiatrische Symptome wie Depressionen. Um einen Überblick zu bekommen, welche Symptome in das Spektrum des NPSLE gehören, wurde in der Vergangenheit eine Liste von Haupt- und Nebensymptomen aufgestellt (siehe Tabelle 2), die als Ausdruck einer neuropsychiatrischen Beteiligung bei Patienten mit Kollagenosen gewertet wurden (51, 66).

Das Problem dieser und anderer Einteilungen lag jedoch darin, dass sie sowohl für die Forschung als auch die Diagnostik des NPSLE unzureichend waren und sich deshalb eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse von Untersuchungen schwierig gestaltete. Dies resultierte unter anderem aus mangelnden Definitionen für individuelle Krankheitsmanifestationen, als auch aus der mangelnden Standardisierung der Erkrankung.

Tab. 2: Symptome der neuropsychiatrischen Manifestationen bei Kollagenerkrankungen

	neurologische Symptome	psychiatrische Symptome
Hauptsymptome	<ul style="list-style-type: none"> -zerebrale Anfälle/Lähmungen -fokale motorische oder sensible Ausfälle, Hemiparesen, Hirnnervenausfälle, Bewegungs- oder Gleichgewichtsstörungen, transverse Myelitis, fokale, periphere oder kraniale Neuropathie -generalisierte Störungen: Bewusstseinsstörungen, Enzephalomyelitis, organisches Psychosyndrom 	<ul style="list-style-type: none"> -Psychose: klinische (endogene) Depression, zyloaffektive Störungen, schizophreniforme Störungen -organisches Psychosyndrom (Störungen der Orientierung, der Wahrnehmung und des Gedächtnisses)
Nebensymptome	<ul style="list-style-type: none"> -Parästhesien ohne objektiven Befund -allgemeine Verlangsamung ohne objektiven Befund -Kopfschmerzen (jeder Art, andauernd) -Pseudopapillenödem und benigne intrakranielle Hypertension 	<ul style="list-style-type: none"> -reaktive Depression -Stimmungsschwankungen -kognitive Störungen -starke Angstgefühle oder andere psychoneurotischen Störungen -Verhaltensstörungen

Um dieses Problem zu lösen hat 1999 das American College of Rheumatology (ACR) Ad Hoc Committee on Neuropsychiatric Lupus Nomenclatur 19 neuropsychiatrischen Syndrome der Erkrankung definiert (siehe Tabelle 3) und Richtlinien für eine Berichterstattung aufgestellt.

Tab. 3: Neunzehn neuropsychiatrische Syndrome des SLE definiert durch die ACR Ad Hoc Committee on Neuropsychiatric Lupus Nomenclature (1)

Zentrales Nervensystem	Peripheres Nervensystem
Aseptische Meningitis	Akut entzündliche
	demyelinisierende Polyradikuloneuropathie (Guillain-Barré-Syndrom)
Zerebrovaskuläre Erkrankungen	Autonome Erkrankungen
Demyelinisierende Syndrome	Mononeuropathie einfach/multiplex
Kopfschmerzen (inklusive Migräne und benigner intrakranieller Hypertension)	Myasthenia gravis
Bewegungsstörungen (Chorea)	Neuropathie, kranial
Myelopathie	Plexuserkrankungen
Anfallsleiden	Polyneuropathie
Akute Verwirrtheitszustände	
Angststörungen	
Kognitive Dysfunktionen	
Stimmungsschwankungen	
Psychosen	

Es besteht jedoch weiterhin die Schwierigkeit, diese Syndrome, die als Organmanifestation im Rahmen der Grunderkrankung auftreten können, von neuropsychiatrischen Krankheitsbildern anderer Genese (z.B. Therapie/Steroid-bedingt, Urämie, reaktive Depression, Infektion etc.) (1, 55, 101) abzugrenzen.

Beim SLE sind beispielsweise eine Vielfalt von psychischen Erkrankungen bekannt, inklusive Depressionen, Psychosen, Angststörungen etc. (14, 73, 83, 98, 99, 102). Die Problematik liegt in der Zuordnung, ob diese Erscheinungen durch den SLE verursacht wurden oder sie durch eine physiologische Reaktion aufgrund des Stresses, eine schwerwiegende chronische systemische Erkrankung zu haben, bedingt sind. Darüberhinaus besteht das Problem, dass psychische Abnormitäten und kognitive Dysfunktionen nur schwer validierbar sind.

So wurde in den letzten Jahrzehnten intensiv versucht, die Ätiologie und die Pathomechanismen, die diesen neuropsychiatrischen Manifestationen des NPSLE zu Grunde liegen, aufzudecken. Darüberhinaus war man bestrebt, bildgebende Verfahren, sowie zuverlässige Marker und Kriterien zu detektieren, um eine neuropsychiatrische Beteiligung sicher und frühzeitig diagnostizieren zu können und neue effiziente Therapiekonzepte zu entwickeln.

4. Pathologische Veränderungen bei Patienten mit Kollagenosen

Auf der Suche nach pathologischen Befunden bei Patienten mit NPSLE werden in der Literatur unterschiedliche morphologische Veränderungen beschrieben, die mit neuropsychiatrischen Manifestationen bei Kollagenosen einher gehen. Die am häufigsten gefundene pathologische Veränderung im Autopsiematerial von NPSLE-Patienten sind nicht-entzündliche Prozesse, wie proliferative Vaskulopathien kleiner zerebraler Gefäße. Diese werden von Hyalinisierung geprägt und sind gelegentlich mit Gefäßverschlüssen, perikapillärer Mikroglia, Mikroinfarkten und Mikrohämmorrhagien assoziiert (20, 28, 58).

Es sind aber auch entzündliche Geschehen im zentralen Nervensystem am NPSLE beteiligt. Sie führen zu einer Neurodegradation und gehen mit

erhöhten Spiegelneuronaler und astrozytärer Degradationsprodukte einher (113, 114).

Das Spektrum der möglichen Pathomechanismen, die diesen morphologischen Veränderungen zu Grunde liegen, ist sehr breit. Es reicht von Mikrovaskulopathien mit hämorrhagischen und ischämischen Insulten (20, 28, 58) bis hin zu Autoimmungeschehen.

5. Bildgebende Diagnostik

Um die o.g. morphologischen Veränderungen zu detektieren hat sich seitens der bildgebenden Diagnostik die Magnetresonanztomographie versucht zu etablieren. Mittels Magnetresonanztomographie des Gehirns besteht die Möglichkeit, sogar kleine Läsionen zu detektieren, die mit den ZNS-Manifestationen des SLE korrelieren (85). Dabei hat die Magnetresonanztomographie eine Sensitivität von 50 – 87 %, wobei die Abnormalitäten, die in der Bildgebung gefunden werden, nicht spezifisch sind und auch in 16 – 52 % der asymptomatischen Patienten gefunden werden (120). Des Weiteren schließt eine negative Magnetresonanztomographie einen NPSLE nicht aus.

6. Antikörper-Phänomene

Auch durch serologische Untersuchungen hat man versucht, neuropsychiatrische Manifestationen bei Kollagenosen nachzuweisen. Dabei wurden unterschiedliche Auto-Antikörper im Serum oder Liquor von Patienten mit Kollagenosen detektiert. In der Literatur sind verschiedene Auto-Antikörper beschrieben, die bei der Entstehung des NPSLE eine Rolle (126) spielen. Einige dieser Antikörper richten sich gegen Gehirn-spezifische Antigene (Neuronale (siehe Tabelle 4), Ganglioside, Synaptosomen, Glia, Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren), andere sind gegen systemische Antigene

(Kerne, zytoplasmatische Antigene, Phospholipide, endotheliale Zellen, Lymphozyten) gerichtet.

Tab. 4: Antigenziele neuronaler Auto-Antikörper bei neuropsychiatrischem SLE (37)

Antigenziel
Menschliche Neuroblastom Zelllinien (7)
Neurofilament Proteine (92)
Ratten und menschliches Gehirn (40, 71)
Synaptische Membranproteine von Rindern (43)
Rattenhirnsynaptosomen (39, 41)

7. Anti-ZNS-Antikörper

1990 gelang es Klein et al. organspezifische Antikörper gegen Epitope des zentralen Nervensystems bei Patienten mit ANA positiven Kollagenerkrankungen zu detektieren. Diese Antikörper ließen sich im Serum oder Liquor von Patienten durch die Verwendung eines 100 000 g Überstands aus Rinderhirn als Antigen in Westernblot und Elisa nachweisen. Es hat sich gezeigt, dass der Titeranstieg von Anti-ZNS-Antikörpern im Patientenserum mit dem Auftreten von neuropsychiatrischen Symptomen korreliert (71). Dieser Zusammenhang besteht nicht nur zwischen dem Anstieg des Titers von Anti-ZNS-Antikörpern und dem Auftreten von neuropsychiatrischen Symptomen, sondern auch zwischen dem Titerabfall und einer damit einhergehenden Befundbesserung.

Die detektierten Antikörper reagierten im Westernblot mit 10 unterschiedlichen Determinanten des 100 000 g Überstands aus Rinderhirn. 4 Hauptdeterminanten der Molekulargewichte 29, 48, 56 und 68 kD, sowie 6 Nebendeterminanten der Molekulargewichte 130, 110, 84, 60, 38 und 34 kD konnten unterschieden werden.

Die Organspezifität der Anti-ZNS-Antikörper, ihr Nachweis im Liquor, sowie der direkte Zusammenhang mit dem Auftreten von neuropsychiatrischen Symptomen, lassen auf eine pathogenetische Rolle schließen.

8. Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die spezifischen Antikörper-/Antigen-Systeme bei Patienten mit Kollagenosen näher zu charakterisieren und genauere Erkenntnisse über die Ätiopathogenese der neuropsychiatrischen Manifestationen bei Kollagenerkrankungen zu gewinnen. Des Weiteren sollte das entsprechende Antigen rekombinant hergestellt werden, um anschließend seine immunologische Reaktionsfähigkeit in aufgereinigter Form in weiteren Untersuchungen zu bestätigen.

B. Patienten, Material und Methoden

1. Patienten

Es wurden die Seren von 17 Patienten (Angaben über Alter, Geschlecht, Kollagenose und ANA-Status der Patienten siehe Tabelle 5 und 6) untersucht, bei denen die Krankengeschichte bekannt und die neuropsychiatrische Beteiligung der Kollagenerkrankung durch die klinische Betreuung durch PD. Dr. Stefan Weiner an der Universität Freiburg gesichert war. Die klinische Diagnose einer neuropsychiatrischen Manifestation wurde dann gestellt, wenn eine zerebrale Alteration anderer Genese (Medikamente, Infektionen, Urämie, Hypertonus, Steroid Behandlung) ausgeschlossen werden konnte. Die in Tabelle 2 (51, 66) aufgelisteten Haupt- und Nebensymptome wurden als Ausdruck einer zerebralen Manifestation gewertet.

Die Diagnose des systemischen Lupus erythemathodes wurde unter Zugrundelegung der 1982 revidierten ARA-Kriterien gestellt (107). Desweiteren wurden Seren von 45 anti-ZNS-positiven Patienten, bei denen in Voruntersuchungen im Westernblot eine starke Autoantikörperreaktion mit dem 100 000 g Überstand aus Rinderhirn nachgewiesen werden konnte (Angaben über Alter, Geschlecht, Kollagenose und ANA-Status der Patienten siehe Tabelle 7 und 8) untersucht. Bei diesen Patienten wurde die systemische Kollagenerkrankung klinisch und serologisch gesicherte. Darüberhinaus wurden zur Kontrolle Seren von 107 Patienten, die an Multipler Sklerose erkrankt sind und Seren von 8 Patienten mit Epilepsie untersucht. Bei allen Patienten fand ein Screening mittels ELISA statt, die weiteren Untersuchungsmethoden variierten und wurden teilweise modifiziert.

Tab. 5: Alter und Geschlecht der 17 Patienten mit klinisch gesicherter neuropsychiatrischer Manifestation einer Kollagenerkrankung

	Anzahl	Mittleres Alter	Jahre
Insgesamt	17	47.7	28-81
Männlich	3	57.3	45-81
Weiblich	14	45.6	28-64

Tab. 6: Aufteilung der 17 Patienten mit klinisch gesicherter neuropsychiatrischer Manifestation einer Kollagenerkrankung

Kollagenose	Zahl n	ANA positiv	ANA negativ
SLE	16	16	0
M. Sjögren	1	1	0

Tab. 7: Alter und Geschlecht der 45 Patienten mit Kollagenose

	Anzahl	Mittleres Alter	Jahre
Insgesamt	45	44.9	17-80
Männlich	7	38.2	32-43
Weiblich	38	45.8	17-80

Tab. 8: Aufteilung der 45 Kollagenose-Patienten

Kollagenose	Zahl n	ANA positiv	ANA negativ
SLE	41	40	1
M. Sjögren	2	2	0
M. Sharp	2	2	0
Dermato-/ Polymyositis	0	0	0
progressive systemische Sklerodermie	0	0	0

2. Materialien

2.1 Labormaterialien und Geräte

Materialien

- *Beckman ultra-clear™ centrifuge tubes* (Beckman, Palo Alto, CA, USA)
- *Bovines Serum Albumin* (PAA Laboratories, Pasching, Österreich)
- *Cuvettes 10x4x45 mm* (Sarstedt, Nümbrecht)
- *Cryo S. Kryoröhrchen* (Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen)
- *Hitplates* (NUNC™ Brand Products, Roskilde, Dänemark)
- *Immuno Plates Maxi Sorp™ Surface* (NUNC™ Brand Products, Roskilde, Dänemark)
- *Immobilon PVDF Transfer Membranen* (Millipore, Bedford, MA, USA)
- *Parafilm M* (Pechiney, Chicago, USA)
- *Pasteurpipetten Plastibrand®* (Brand GmbH, Wertheim)
- *PCR Tubes DNase + RNase free 200 µl* (Roche, Mannheim)
- *Pipettenspitzen 1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl* (Eppendorf, Hamburg)
- *Reaktionsgefäße mit Deckel 1.5 ml* (Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen)
- *Reaktionsgefäße ohne Deckel 1.5 ml* (Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen)
- *Schale 94/16 Lot.nr.: 3030261* (Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen)
- *Skalpell Feather* (Dr. Junghans Medical GmbH, Bad Lausick)
- *Zellkulturflasche 250 ml* (Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen)

Geräte

- *Biofuge 15 Centrifuge* (Heraeus Sepatech GmbH, Osterode)
- *Branson Sonifier 250* (Branson Sonic Power, Danbury, Conn., USA)
- *Branson Sonifier B-12* (Branson Sonic Power, Danbury, Conn., USA)
- *Brutschrank* (Heraeus Sepatech GmbH, Osterode)

- Drucker: *hp laserjet 1200 series* (Hewlett-Packard GmbH, Böblingen)
- *Electro-Eluter Model 422* (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- *Electrophoresis Power Supply EPS 500/400* (Pharmacia Biotech, Cambridge, England)
- Elisa-Reader: SLT Rainbow (SLT LabInstruments, Österreich), Software: Easybase (SLT Instruments, Crailsheim)
- *FLX 20 M UV-Licht-Aufnahme-Gerät* (Biometra, Göttingen)
- *Gene Quant II Photometer* (Pharmacia Biotech, Cambridge, England)
- *Heat Sealer LKB Wallac* (Wallac, Turku, Finnland)
- *Küchenmixer* (Braun GmbH, Kronberg/Taunus)
- *Lyophilisator Hetosicc FD 2.5* (Heto Lab Equipment, Allerød, Dänemark)
- pH-Meter (wissenschaftlich-technische Werkstätten, Tübingen)
- *Pipetboy IBS* (Integra Biosciences, Fernwald)
- *Scanner* (Agfa, Köln)
- *Scanner* (Epson, Meerbusch)
- *Schüttler SM 25* (Edmund Bühler Laborgerätebau, Tübingen)
- *Sorvall-Centrifuge RC-5-Superspeed Refridgerated* (DuPont Instruments, Wilmington, MA, USA)
- *Spectrophotometer Ultraspect III* (Pharmacia Biotech, Cambridge, England)
- *Thermomixer comfort* (Eppendorf, Hamburg)
- *Thermorüttler HG* (Infors AG, Bottmingen, Schweiz)
- *Ultracentrifuge TGA* (Kontron Instruments, Düsseldorf)
- *Uno-Thermoblock-PCR-Gerät* (Biometra, Göttingen)
- *Vortex-Genie* (Winn, Leek, Holland)
- Waage 5 g – 820 g (Sartorius, Göttingen)
- Waage, fein: Mettler H20T 0.001 g –160 g (Mettler Waagen GmbH, Gießen)

2.2 Reagenzien

- 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs, Frankfurt a. M.)
- α -Ketoglutarat-Dehydrogenase aus Schweineherz (SIGMA®-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- α -Phenylendiaminedihydrochloride (SIGMA®-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- AEC-Tablets (3-Amino-9-Ethylcarbazole-Tablets) Substrathomogen (SIGMA®-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- Ammonium persulfate, analytic grade (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg)
- Ammoniumbicarbonate (NH_4HCO_3) (SIGMA®-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- Agarose NEEO (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- Bovines Serum Albumin (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
- Coomassie® Brilliant Blue G-250 (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg)
- Dimethylformamid research grade (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg)
- Essigsäure 100 % wasserfrei (Merck, Darmstadt)
- EB-Medium (Embryoid Body Medium) (Invitrogen, Karlsruhe)
- Glycerin 87 % zur Analyse (Merck, Darmstadt)
- Kaleidoscope Prestained Standards (Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA)
- Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) (Merck, Darmstadt)
- Methanol (CH_3OH), reinst (Merck, Darmstadt)
- Natriumacetat-Trihydrat (CH_3COONa) (Merck, Darmstadt)
- Natriumcarbonat (NaCO_3) (Merck, Darmstadt)
- Natriumchlorid (NaCl) (Merck, Darmstadt)
- Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) (Merck, Darmstadt)
- Rotiphorese® Gel 40 (19:1) Rotiload-DNA (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- Salzsäure (HCl) 32 % (Merck, Darmstadt)
- Schwefelsäure (H_2SO_4) (Merck, Darmstadt)

- SDS (Sodium dodecyl sulfate, $C_{12}H_{25}NaO_4S$) (FLUKA BioChemika, Buchs, Schweiz)
- Temed (N,N,N,N-Tetramethylethyendiamide) (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg)
- TRIZMA® Base (Tris[hydroxymethyl]aminomethane) (SIGMA®-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- *Tri-Natriumcitrat-Dihydrat* ($C_6H_5Na_3O_7$) (Merck, Darmstadt)
- *Triton*® X-100 (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg)
- *Tween 20* (MERCK-Schuchard, Hohenbrunn)
- *Wasserstoffperoxid* (H_2O_2) 30 % (Merck, Darmstadt)

2.3 Antikörper und Antigen

- Peroxidase-conjugated Affini Oure Goaf anti-human Ig G Fc5 μ fragmented specific (Jackson Immuno Research Laboratories, INC., Westgrove, PA, USA)
- Peroxidase-conjugated Affini Oure Goaf anti-human Ig M Fc5 μ fragmented specific (Jackson Immuno Research Laboratories, INC., Westgrove, PA, USA)
- Polyclonal Rabbit Anti-Human IgG/HRP (DakoCytomation, Glostrup, Denmark)
- Polyclonal Rabbit Anti-Human IgM/HRP (DakoCytomation, Glostrup, Denmark)
- Dako Polyclonal Rabbit anti-human Ig A, Ig G, Ig M, Kappa, Lambda, FITC (Fluorescein-Isothiocyanat-Isomer-1), in Phosphatpuffer mit 15 mmol/l NaH_2PO_4 , pH 7.2 (DakoCytomation, Glostrup, Denmark)
- Monoclonal anti- α -Tubulin Clone B-5-1-2 (SIGMA®-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- Monoclonal anti- β -Tubulin Clone TUB 2.1 (SIGMA®-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

- Monoclonal anti-MAP2-Tubulin (2a + 2b) Clone AP-20 (SIGMA®-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- Tubulin, Purified (55 kDa) Catalog-No.: 77112 (MP Biochemicals, Aurora, Ohio, USA)

2.4 Pufferansätze und andere selbsthergestellte Lösungen

0.2 M Bicarbonatpuffer ph 9.6

5 L Aqua dest.

33.90 g Na_2CO_3

57.12 g NaOCO_3

60 mmol PBS-Puffer

5 L Aqua dest.

6.81 g KH_2PO_4

43.83 g NaCl

44.49 g Na_2HPO_4

Serumverdünnungspuffer

1.5 L PBS-Puffer

1-2 Spatel BSA (Bovines Serum Albumin)

1.2 ml Triton

Elisa-Waschpuffer I

5 L PBS-Puffer

25 g BSA

Elisa-Waschpuffer II

5 L PBS-Puffer

25 g BSA

10 ml Triton

Elektrodenpuffer pH 8.3 nach Laemmli (74)

5 L Aqua dest.
5 g SDS
30.25 g Tris
112.5 g Glycin

Transferpuffer pH 8.3 [5]

2.4 L Aqua dest.
1.6 L Methanol
2 g SDS
12.12 g Tris
57.64 g Glycin

0.1 M Citratpuffer pH 5.0

4 L Aqua dest.
82.36 g Na₃-Citrat
25.2 g Zitronensäure

Substratlösung

200 ml Citratpuffer
100 mg o-Phenylendiamin (lichtgeschützt)
66 µl 30 % H₂O₂

Westernblot-Waschpuffer (60 mmol PBS, 0.25 % BSA, 0.25 % Tween 20)

5 L PBS-Puffer
2.5 g BSA
2.5 ml Tween 20

Mercaptoäthanolpuffer nach Laemmli (74)

- 80 mM Tris/HCL, pH 6.7
- 10 % Mercaptoäthanol
- 4 % SDS
- 20 % Glycerol
- 0.004 % Bromphenolblau

Substratlösung (pH 5.0)

- 4 Tabletten Substrathomogen AEC
- 10 ml Dimethylformamid
- 190 ml Aqua dest.
- 100 µl H₂O₂

Volatile Buffer (zur Elution von Proteinen und deren Konzentrierung)

- 50 mM Amminoumbicarbonat (NH₄HCO₃)
- 0.1 % SDS

Chang-Zell-Nährmedium (bei 4 °C lagern)

- 500 ml RPMI, dutch modification
- 50 ml FCS
- 1 Ampulle Gentamycin 80 mg

TAE-Puffer

- 121 g Tris
- 28.5 ml Eisessig
- 50 ml 0.5 M EDTA ph 8.0 auf 500 ml mit Aqua dest. auffüllen

LB-Medium

- 10 g/L Tryptone
- 5 g/L Yeast Extrakt
- 10 g/L NaCl

LB_A-Medium (Antibiotika haltig)

10 g/L Tryptone
5 g/L Yeast Extrakt
10 g/L NaCl
100 µg/ml Ampicillin
25 µg/ml Canamycin

LB-Agarplatten (Antibiotika haltig)

LB-Medium 15 g/L Agar enthaltend
100 µg/ml Ampicillin
25 µg/ml Canamycin

Psi broth

LB-Medium
4 mM MgSO₄
10 mM KCl

Puffer A (pH 8.0 durch NaOH)

100 mM NaH₂PO₄
10 mM Tris·Cl
6 M GuHCl
1 L Aqua dest.

Puffer B (pH 8.0 durch NaOH)

100 mM NaH₂PO₄
10 mM Tris·Cl
8 M Harnstoff
1 L Aqua dest.

Puffer C (pH 6.3 durch HCl)

100 mM NaH₂PO₄
10 mM Tris·Cl
8 M Harnstoff
1 L Aqua dest.

Puffer D (pH 5.9 durch HCl)

100 mM NaH₂PO₄
10 mM Tris·Cl
8 M Harnstoff
1 L Aqua dest.

Puffer E (pH 4.5 durch HCl)

100 mM NaH₂PO₄
10 mM Tris·Cl
8 M Harnstoff
1 L Aqua dest.

Taq-PCR-Mix

5 µl 10 x PCR Puffer [200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl]
1.5 µl 50 mM MgCl₂
1 µl dNTP Mix
0.4 µl Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)

2.5 Restriktionsenzyme

Eco RV Restriktionsendonuklease (New England Biolabs, Frankfurt a. M.)

Pst I Restriktionsendonuklease (New England Biolabs, Frankfurt a. M.)

Hind III Restriktionsendonuklease (Fermantas GmbH, St. Leon-Rot)

BamHI Restriktionsendonuklease (New England Biolabs, Frankfurt a. M.)

2.6 Anhang

Plasmid pQE-30 UA

Das Plasmid pQE-30 UA (siehe Abbildung 1) ist ein low-copy Plasmid und gehört zur Familie der pDS-Plasmide (11). Es eignet sich gut zum direkten Klonieren von PCR-Produkten. Dies basiert auf der Tatsache, dass Taq-DNA-Polymerasen und andere nicht korrekturlesende DNA-Polymerasen am 3'-Ende einen Adenosin-Überhang den PCR-Produkten hinzufügen. Dadurch, dass das Plasmid am 3'-Ende einen Uracil-Überhang besitzt, kann es in der prälinearisierten Form direkt PCR-Produkte aufnehmen.

Weitere Eigenschaften des Plasmids pQE-UA:

- synthetische ribosomale Bindungsstelle, RBSII, für höhere Translationsraten
- 6-fache His-tag kodierende Sequenz in der klonierenden Region
- β -Laktamase Gen (bla) mit erhöhter Widerstandsfähigkeit gegenüber Ampicillin
- Chloramphenicol-Acetyl-Transferase-Gen (CAT)

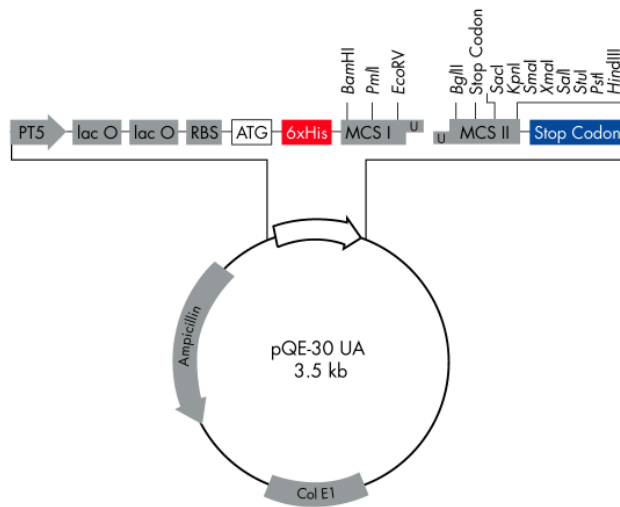


Abb. 1: Aufbau des Plasmids pQE-30 UA und die Positionen der Bestandteile in Basen.

Vector Größe 3504 bp:

Start der Nummerierung bei *Xho*I (CTCGAG) 1-6

T5 promoter/lac operator Bestandteil 7-87

T5 Transkriptionsbeginn 61

6xHis tag kodierende Sequenz 127-144

mehrfach Klonierungsort I (Multiple cloning site I = MCS I) 145-173

Klonierungsort für PCR Produkt 174-175

mehrfach Klonierungsort II (Multiple cloning site II = MCS II) 176-235

Lambda *t0* transkriptions beendende Region 251-345

rnaB T1 transkriptions beendende Region 1107-1205

ColE1 Ausgangspunkt der Replikation 1681

β -lactamase kodierende Sequenz 3299-2439

Weitere Eigenschaften, wie auch die Basensequenz sind der Qiagen-Datenbank www.qiagen.com/literature/vectors.asp und dem Protokoll The QIAexpressionist (5. Edition) zu entnehmen.

Primer alpha tubulin forward:

-Gesamtzahl der Basen	22
-Molekulargewicht	6650.4 g/mol
-Molarer Extinktionskoeffizient	220275.0 l/mol-cm
-Schmelzpunkt	70 °C

Primer alpha tubulin backward:

-Gesamtzahl der Basen	24
-Molekulargewicht	7093.8 g/mol
-Molarer Extinktionskoeffizient	208692.0 l/mol-cm
-Schmelzpunkt	70 °C

Alpha tubulin

Abbildung 2 zeigt die kodierenden 1356 Basenpaare der linearen mRNA-Basensequenz von Alpha-Tubulin (Homo sapiens tubulin, alpha 1b, mRNA) (2, 17, 35, 60, 61, 68, 94, 106, 116).

Anfang

```
1 atgcgtagt gcatctccat ccacgttggc caggctggtg tccagattgg caatgcctgc
61 tgggagctct actgcctgga acacggcatc cagcccgatg gccagatgcc aagtgacaag
21 accattgggg gaggagatga ctccttcaac accttcttca gtgagacggg cgctggcaag
181 cacgtgcccc gggctgtggt tgtagacttg gaaccacag tcattgatga agttcgact
241 ggcacctacc gccagctctt ccaccctgag cagctcatca caggcaagga agatgctgcc
301 aataactatg cccgagggca ctacaccatt ggcaaggaga tcattgacct tgtgttgac
361 cgaattcgca agctggctga ccagtgcacc ggtcttcagg gcttcttggg tttccacagc
421 tttggtgggg gaactggttc tgggttcacc tccctgctca tggaaactct ctcagttgat
481 tatggcaaga agtccaagct ggagttctcc atttaccag caccacaggt tttccacagt
541 gtagttgagc cctacaactc catcctcacc acccacacca ccctggagca ctctgattgt
601 gccttcatgg tagacaatga ggccatctat gacatctgtc gtagaaacct cgatatcgag
661 cgcccaacct aactaacct taaccgctt attagccaga ttgtgtcctc catcactgct
721 tccctgagat ttgatggagc cctgaatggt gacctgacag aattccagac caacctggtg
781 ccctaccccc gcatccactt ccctctggcc acatatgccc ctgtcatctc tgctgagaaa
841 gcctaccatg aacagctttc tgtagcagag atcaccaatg cttgctttga gccagccaac
901 cagatggtga aatgtgacct tcgccatggt aaatacatgg cttgctgcct gttgtaccgt
961 ggtgacgtgg ttcccaaaga tgtcaatgct gccattgcca ccatcaaac caagcgtagc
1021 atccagtttg tggattggtg cccactggc ttcaagggtg gcatcaacta ccagcctccc
1081 actgtggtgc ctggtggaga cctggccaag gtacagagag ctgtgtgcat gctgagcaac
1141 accacagcca ttgctgaggc ctgggctcgc ctggaccaca agtttgacct gatgtatgcc
1201 aagcgtgcct ttgttactg gtacgtgggt gaggggatgg aggaaggcga gttttcagag
1261 gcccgtgaag atatggctgc ccttgagaag gattatgagg aggttggtgt ggattctggt
1321 gaaggagaggtgaggaaga aggagaggaa tactaa
```

Abb. 2: Lineare mRNA-Basensequenz von Alpha-Tubulin

1356 bp der kodierenden mRNA-Basensequenz von Alpha-Tubulin.

Abkürzungen: a=Adenosin, c=Cytosin, g=Guanin, t=Thymin

(entspricht auf mRNA-Ebene Uracil)

Der markierte Abschnitt von bp 4-25 entspricht der Basensequenz des Primers (Alpha-Tubulin-forward, siehe 3.9.4 Primer zur Amplifikation der gewünschten cDNA-Sequenz)

Der markierte Abschnitt von bp 1330-1353 entspricht der komplementären Basensequenz des Primers (Alpha-Tubulin-backward, siehe 3.9.4 Primer zur Amplifikation der gewünschten cDNA-Sequenz)

Bei Alpha-Tubulin handelt es sich um eine Untereinheit von Mikrotubuli, welche zusammen mit der Beta-Tubulin-Untereinheit die Grundbausteine des heterodimers Mikrotubulin bilden. Diese sind in eine Vielzahl von biologischen Prozessen involviert. Dabei übernehmen sie unter anderem wichtige Funktionen bei der Chromosomensegregation, dienen der Aufrechterhaltung der zellulären Architektur und sind an Zellbewegung und intrazellulären Transportprozessen von Proteinen und Organellen beteiligt.

3. Methoden

3.1 Präparation des ZNS-Antigens aus Rinderhirn

Ein 100 000 g Überstand (SN) wurde aus Rinderhirn nach Lai und Clark (75) präpariert. Aus frischem Rinderhirn (Alter der Rinder < 2 Jahre) wurden nach einer Standardmethode (5) Mitochondrien, Mikrosomen und ein Überstand, der nach einer viermaligen Beschallung der Mitochondrien für je 30 Sekunden mit einem Branson-Sonifier B-12 und anschließender Zentrifugation bei 100 000 g dekantiert werden konnte, isoliert.

3.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Antigenfraktion wurde mit der Methode nach Bradford (9) durchgeführt. Dabei wurde BIOQUANT-Reagenz als Reagenzlösung verwendet und die Proben bei 595 nm in Plexiglasküvetten im Spectrophotometer Ultraspect III gemessen. Der Nullabgleich des Photometers wurde gegen destilliertes Wasser vorgenommen. Eine Eichgerade wurde mit Hilfe von Verdünnungsreihen mit BSA hergestellt. Die Messproben wurden aus je 50 µl Probelösung und

2,5 ml BIOQUANT-Reagenz, die Standardleerwertlösung aus je 50 µl bidestilliertem Wasser und 2,5 ml BIOQUANT-Reagenz hergestellt.

3.3 Methoden zum Nachweis von Autoantikörpern

3.3.1 ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

Microtiterplatten (Maxi-Sorb, Nunc) wurden mit 100 µl Antigen/Loch beschichtet und für 16-24 Stunden bei 4 °C inkubiert. Der 100 000 g SN aus Rinderhirn wurde mit Bicarbonatpuffer (s. 2.4) (im Verhältnis 1:770) auf eine Konzentration von 9.40-9.86 µg/ml verdünnt. Bei Verwendung des aufgereinigten Tubulins der Firma MP-Biochemicals (Proteinkonzentration 10 mg/ml) als Antigen wurde dieses mit Bicarbonatpuffer (im Verhältnis 1:200) auf eine Konzentration von 49.75 µg/ml verdünnt.

Daraufhin folgten drei 15-minütige Waschgänge mit Waschpuffer I (s. 2.4), um freie Antigenreste zu entfernen und freie Bindungsstellen zu blockieren. Die Patientenserum wurden 1:1000 mit Serumverdünnungspuffer (s. 2.4) verdünnt. Nach Entfernung des Puffers von den Microtiterplatten wurden diese mit 100 µl/Loch verdünnten Patientenserum beschichtet und für 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgten zwei weitere Waschgänge mit Waschpuffer II (s. 2.4) für die Dauer von 15 Minuten. Es folgte die Beschichtung der Microtiterplatten mit 100 µl/Loch der verdünnten Peroxidase-konjugierten Antihuman IgG- und IgM- Zweitantikörpern (s. 2.4) (Verdünnung von 3.3 µl/10ml WP II IgG spezifisch und 5.0 µl/10 ml WP II IgM) für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Drei weitere Waschgänge à 15 Minuten mit Waschpuffer II folgten. Daraufhin wurden 150 µl/Loch Substratlösung (s. 2.4) aufgetragen und mit 50 µl/Loch 25% H₂SO₄ bei Erreichen der Kontrollwerte abgestoppt. Die Auswertung erfolgte in einem ELISA Autoreader (SLT Rainbow) bei einer Wellenlänge von 492 nm.

3.3.2 Gelelektrophorese und Westernblot

Die Gel-Elektrophorese und der anschließende Immunblot wurden nach der Methode von Laemmli (74) und Towbin et al (110) durchgeführt. Dabei wurden SDS-Polyacrylamid-Gele (SDS-PAGE), 4.5%ig für die Sammelgele und 10%ig für die Trenngele, verwendet.

3.3.2.1 Westernblot unter Verwendung des 100 000 g SN aus Rinderhirn

Die Sammelgele enthielten jeweils 10 Taschen (engl.: Wells), die bis zu 66 µl Pipettiervolumen aufnehmen konnten. Vor der Applikation auf das Gel wurde das Antigen im Verhältnis 1:1 mit Mercaptoäthanolpuffer verdünnt und anschließend 4 Minuten in einem verschlossenen 1.5 ml Reaktionsgefäß (dessen Deckel zuvor zum Druckausgleich perforiert wurde) bei 100 °C in Wasser gekocht. Die Konzentrationen der aufgetragenen ZNS-Antigene lagen zwischen 7.25 - 7.6 mg/ml. Die bei der Gelelektrophorese verwendeten Gelkammern wurden jeweils mit 25 µl Antigen und 25 µl Mercaptoethanolpuffer befüllt.

Unter Berücksichtigung der Verdünnung konnten somit bis zu 33 µl/Tasche des 100 000 g SN aus Rinderhirn als Antigen appliziert werden. Nach anschließender Elektrophorese wurden die SDS-Gele entweder direkt in Coomassieblue G-250 gefärbt oder für den Transfer auf Nitrocellulosefolie (PVDF Transfer Membranen) weiterverwendet.

3.3.2.2 Westernblot unter Verwendung der eluierten Antigenbande

Bei der Gelelektrophorese unter Verwendung der eluierten Antigenbande des 100 000 g SN aus Rinderhirn als Antigen wurde dieses entsprechend SN in 3.3.2.1.1 verdünnt und weiterverarbeitet. Das maximal mögliche

Pipettiervolumen entsprach 33 µl der eluierten Antigenfraktion des 100 000 g SN aus Rinderhirn (+33 µl Mercaptoäthanolpuffer) pro Geltasche.

3.3.2.3 Westernblot unter Verwendung des rekombinant hergestellten Proteins

Bei der Gelelektrophorese unter Verwendung des rekombinant hergestellten Proteins als Antigen wurde dieses entsprechend dem 100 000 g SN aus Rinderhirn in 3.3.2.1.1 verdünnt und weiterverarbeitet. Das Pipettiervolumen lag bei 20 - 30 µl des rekombinant hergestellten Proteins als Antigen (+ 20 - 30 µl Mercaptoäthanolpuffer) pro Geltasche.

3.3.2.4 Transferbedingungen

Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine wurden diese auf Transfermembranen übertragen. Dazu wurden die SDS-Gele dicht gepackt und luftblasenfrei zwischen in Transferpuffer getränkte Schwämme, Filterpapier und Transfermembranen geschichtet. Der Transfer erfolgte in mit Transferpuffern gefüllten Transferkammern unter Kühlung bei einer Spannung von 100 V. Die Dauer betrug 60 Minuten. Nach dem Transfer wurden die Transfermembranen für mindestens 2 Stunden in 3%igem BSA-Puffer inkubiert.

3.3.2.5 Inkubation und Anfärbung der PVDF Transfer Membranen

Die 1:50 verdünnten Patientenserum wurden 45 Minuten bei Raumtemperatur mit den antigenbeschichteten PVDF Transfer Membranen auf einem Rüttler inkubiert. Bei Verwendung von monoklonalen Antikörpern als Erstantikörper wurden diese statt des 1: 50 verdünnten Patientenserums in einer

Verdünnung von 1:200 verwendet und über 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden nach 3-maligem Waschen à 10 Minuten in Westernblot Waschpuffer (s. 2.4) die Transfermembranen mit 1:200 verdünnten Peroxidase konjugierten monospezifischen antihumanen IgG und IgM Antikörpern (DAKOPATTS, Hamburg) für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Rüttler inkubiert. Es folgten 5 Waschgänge à 7 Minuten in Waschpuffer. Daraufhin folgte zum Nachweis der Peroxidase das Substrat mit AEC-Tabletten (s. 2.4) bis bei ausreichender Färbung 7%ige Essigsäure zum Abstoppen der Reaktion appliziert wurde. Anschließend wurden die Transfermembranen luftgetrocknet.

3.4 Coomassie-Blue-Färbung

Die Coomassie-Blue-Färbung ist eine Methode, Proteine in SDS-Gelen sichtbar zu machen. Dazu wurde das SDS-Gel nach der Elektrophorese für die Dauer von 24 h in einer Färbelösung, bestehend aus 10 % Essigsäure, 40 % Methanol und 0.1 % Coomassie R-250, gefärbt. Die anschließende Entfärbung erfolgte mit einer Entfärbelösung, bestehend aus 10 % Essigsäure und 40 % Methanol, für ca. 2 – 3 Stunden bis sich der Hintergrund des SDS-Gels deutlich von den blaugefärbten Proteinbanden unterscheiden liess.

3.5 Elektroelution

Die Elektroelution ist eine Methode, um Proteine und Aminosäuren aus SDS-Gelen zu extrahieren. Dabei wurde das Model 422 Electro-Eluter (BIORAD catalog numbers 165-2976 und 165-2977) verwendet und nach der Anleitung des Herstellers gearbeitet (50, 63, 87, 115, 117, 119).

Vor der Benützung der Dialysemembranen, wurden diese für 1 Stunde bei 60 °C in Volatilepuffer inkubiert. Der Aufbau des Eluters entspricht den

Beschreibungen des Instruktions Manuals (Model 422 Electro-Eluter Assembly Section 4.2-4.8). Die Elution erfolgte bei 8 – 10 mA/Glasröhrchen 3 – 5 Stunden bis die SDS-Gelstücke total entfärbt waren. Nach der Elution ließen sich ca. 400 – 600 µl Eluat pro Glasröhrchen aus dem Silicon Adapter und der Membrankappe abpipettieren. Durch diesen Vorgang ließen sich ca. 80 – 100 % der im Gel enthaltenen Proteine eluieren.

3.6 Lyophilisation

Die Lyophilisation (Gefriertrocknung) ist ein Verfahren, bei dem wasserhaltigem Material durch schnelles Einfrieren und anschließende Sublimation das gefrorene Wasser entzogen wird. Die Gefriertrocknung beinhaltet zwei zeitlich aufeinanderfolgende Schritte. Das Einfrieren der Lösung bei -70°C über mindestens 24 Stunden und das Entfernen des Wassers aus der gefrorenen Lösung unter Vakuum durch Sublimation für 6 – 8 Stunden. Das Ergebnis ist hochkonzentriertes wasserfreies Pulver.

3.7 Molekulargewichtsmarker

Für die Molekulargewichtsbestimmung von elektrophoretisch aufgetrennten Antigen determinanten wurde die Lage der Banden des Antigens im Verhältnis zu den Banden des vorgefärbten Standards (Kaleidoscope Prestained Standards, Bio-Rad) verglichen.

Als Referenzproteine dienten folgende Marker:

Myosin 200 000 D, β -Galaktosidase 116 250 D, Phosphorylase b 97 400 D, Serumalbumin 66 200 D, Ovalbumin 45 000 D, Karboanhydrase 31 000 D, Trypsininhibitor 21 500 D, Lysozym 14 400 D, Aprotinin 6 500 D.

3.8 Sequenzierung von Antigen determinanten

Zur Sequenzierung der Antigen determinanten wurden diese in SDS-Gel fixiert, mit Coomassieblue angefärbt und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Proteinidentifizierung wurde mit freundlicher Unterstützung durch Dr. rer. nat. J. Dengjel und Prof. Dr. S. Stevanovic (Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Abteilung für Immunologie Tübingen) mittels „peptide mass fingerprints“ durch Massenspektrometrie“ (MALDI-TOF) durchgeführt. Bei dieser Methode wurden die angefärbten Proteinbanden aus SDS-Gel ausgeschnitten, entfärbt und 3 Stunden mit Schweinetrypsin verdaut. Die Peptidmischung wurde elektrophoretisch aufgetrennt und mittels 1%iger Ameisensäure aus dem Gel extrahiert. So wurden mehrere „Fingerabdrücke“ eines Proteins angefertigt und mehrere Fragmente des Verdauens in der Massenspektrometrie sequenziert. In Kenntnis mehrerer Peptide konnte über Protein-Datenbanken ein Molekül mit hoher Sicherheit identifiziert werden (89).

3.9 Herstellung des rekombinanten Antigens

Um das gewünschte Protein rekombinant herzustellen bedurfte es mehrerer Schritte (siehe Kurzübersicht 1). Zunächst musste RNA aus Zellen isoliert werden und in cDNA umgeschrieben werden. Daraufhin folgte die Vermehrung der gewünschten Basensequenz mittels spezieller Primer in der PCR. Die amplifizierte cDNA wurde anschließend in ein Plasmid eingeschleusst, mit dem später E.coli transformiert wurden, die daraufhin das Protein synthetisierten.

Kultivierung von Chang Zellen



Isolierung von mRNA aus Chang Zellen (s. 3.9.1)

*Photometrische Bestimmung des mRNA-Gehalts



Herstellung von komplementärer cDNA aus mRNA (s. 3.9.2)

*Photometrische Bestimmung des cDNA-Gehalts



Amplifikation der Protein-cDNA-Sequenz durch PCR (s. 3.9.5)

*Größenabschätzung des PCR-Produkts



Aufreinigung der Protein-cDNA (s. 3.9.6)

*Photometrische Bestimmung der aufgereinigten Alpha-Tubulin-cDNA



Insertion/Ligation der Protein-cDNA mit Plasmiden (s. 3.9.7)



Herstellung kompetenter E. coli (s. 3.9.8)



Transformation von kompetenten E. coli (s. 3.9.9)

*Wachstumkontrolle der transformierten E. coli auf antibiotikahaltigen Selektivnährmedien

*Aufreinigung der Plasmide und Größenbestimmung des Insertionsprodukts mittels
Restriktionsendonukleasen



Expression und Aufreinigung des Proteins (s. 3.9.12)

Kurzübersicht 1: Das Schema zeigt die einzelnen Schritte zur rekombinanten Herstellung eines Proteins (die Angaben in Klammern beziehen sich auf die Stelle des Methodenteils, in dem die einzelnen Schritte näher erläutert sind); die durchgeführten Kontrollen sind mit einem „*“ gekennzeichnet.

3.9.1 Isolierung von mRNA aus Chang-Zellen

Zur Gewinnung von mRNA wurden Chang-Zellen verwendet. Um diese zu züchten, wurden 1,5 ml der tiefgefrorenen Zellsuspensionen zu einer mit 25 ml Nährmedium (s. 2.4) befüllten Zellkulturflasche hinzugefügt. Zur Vermeidung einer Kontamination wurde unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilwerkbank gearbeitet. Diese Zellkulturflaschen wurden in einem Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die gewonnenen Zellen wurden anschließend mit dem RNeasy[®] Midi Kits (Cat. No. 75142) von Qiagen lysiert und ihre RNA isoliert. Der Gehalt der isolierten RNA nach photometrischer Messung lag bei 326.4 µg/ml.

3.9.2 Herstellung von komplementärer cDNA aus mRNA

Zur Herstellung von First-Strand cDNA wurde das SuperScript II Reverse-Transcriptase-Kit von Invitrogen (Cat.Nos. 18064-022,-014,-071) verwendet. Dies enthält eine veränderte Version der Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT), die auch bei höheren Temperaturen benützt werden kann. Es wurde mit Nuklease freien Microtubes gearbeitet. Der Reaktionsansatz enthielt:

- 1 µl Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (500 µg/ml)
- 5 µl mRNA = 1.66 µg mRNA
- 1 µl dNTP Mix (je 10 mM)

Dieser wurde für 5 Minuten auf 65 °C erhitzt und danach sofort in Eis abgekühlt. Daraufhin wurde durch kurze Zentrifugation bei 1000 rpm mit einer Zentrifuge Biofuge 15 der Inhalt gesammelt und

- 4 µl 5 x First-Strand-Puffer
- 2 µl 0.1 M DTT

1 µl RNaseOUT (40 Einheiten/µl)

hinzugefügt. Nach gründlicher Durchmischung wurde der Mix für 2 Minuten bei 42 °C inkubiert und

1 µl Superscript II RT (=200 Einheiten)

hinzugefügt. Es folgte die Inkubation bei 42 °C für 50 Minuten und die Inaktivierung der Reaktion bei 70 °C für 15 Minuten. RNA-Verunreinigungen wurden anschließend durch 1 µl (2 Einheiten) E.coli RNase H und eine Inkubation von 20 Minuten bei 37 °C entfernt.

Die Konzentration der durch reverse Transkription hergestellten cDNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm auf 310 µg/ml bestimmt (Messwert des Photometers bei 260 nm x Verdünnungsfaktor x 50 (Faktor für Doppelstrang DNA [µg/ml]) siehe Qiagen Taq PCR Handbook 03/2002 Table 10 Spectrometric conversions for nucleic acid templates).

Für die Größenbestimmung von DNA-Fragmenten im Verlauf der Herstellung des rekombinanten Antigens wurde die 1 kb DNA Leiter verwendet.

Abbildung 3 zeigt die Größe der Referenzbanden der 1 kb DNA Leiter.

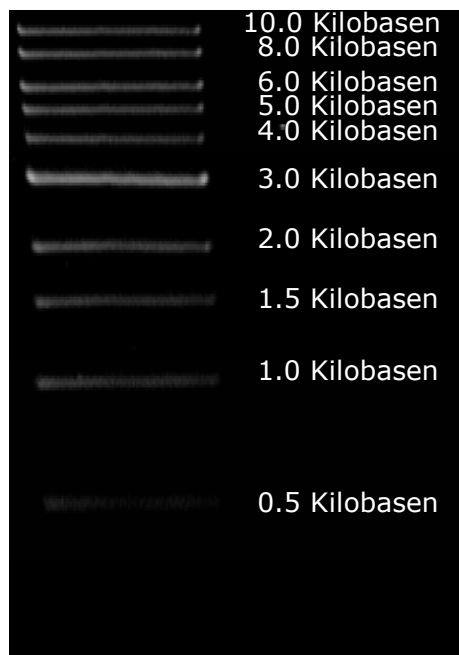


Abb. 3: Größe der Banden der 1 kb DNA Leiter

Gelelektrophoretisch aufgetrennte 1 kb DNA Leiter und anschließende Aufnahme unter Floureszenzbedingungen

3.9.3 Basensequenz des Proteins

Die Basensequenz des Proteins wurde der PubMed Datenbank entnommen. Dabei handelt es sich um das Homo sapiens tubulin NM 006082, ein 1356 Basenpaare langes Protein (Basensequenz siehe 2.6 Anhang, Alpha-Tubulin).

3.9.4 Primer zur Amplifikation der gewünschten cDNA-Sequenz

Beim Design der Primer wurde darauf geachtet, dass die Primerlänge in einer Bandbreite von 17-26 Basenpaaren lag und längere Wiederholungen (Repeats) vermieden wurden. Desweiteren wurde darauf Wert gelegt, dass

am 3'-Ende der Primer 2-4 mal die Basen Guanin und/oder Cytosin standen, um eine feste Bindung des Primers in Syntheserichtung zu gewährleisten. Der Gehalt der Basen Guanin und/oder Cytosin sollte bei 50-60% liegen. Bei der Berechnung der Schmelzpunkte wurde bei der Basenpaarung Adenosin-Thymin von je 2 °C und Cytosin-Guanin von je 4 °C ausgegangen (nach Wallace, 1986).

Dabei wurde darauf geachtet, dass die Schmelzpunkte der Primer sich um nicht mehr als 5 °C unterschieden. Die Primer wurden von der Carl Roth GmbH Karlsruhe hergestellt.

Unter Berücksichtigung dieser Gesichtspunkte wurden 2 Primer designed, die die Synthese des Alpha-Tubulins initiieren sollten.

-Alpha tubulin forward (vorwärts) mit einem Schmelzpunkt von ca. 70 °C

5'> CGT-GAG-TGC-ATC-TCC-ATC-CAC-G <3'

-Alpha tubulin backward (rückwärts) mit einem Schmelzpunkt von ca. 72 °C

5'> GTA-TTC-CTC-TCC-TTC-TTC-CTC-ACC <3'

Weitere Informationen zu den Primern siehe Anhang

3.9.5 Amplifikation der gewünschten cDNA-Sequenz

Der PCR-Ansatz zur Amplifikation der Proteinbasensequenz setzte sich wie folgt zusammen:

- 50 μ l Taq PCR-Mix (s. Reagenzien)
- 1 μ l Primer (10 μ M) vorwärts (forward)
- 1 μ l Primer (10 μ M) rückwärts (reverse)
- 8 μ l Tween 20
- 3.2 μ l cDNA = 1 μ g
- 36.8 μ l destilliertes H₂O

Da die PCR-Gefäße keinen Deckel besaßen, wurde der PCR-Ansatz in den PCR-Gefäßen mit 50 μ l Silikonöl bedeckt, um eine Verdunstung während der PCR-Zyklen zu verhindern. Darauf folgten PCR-Zyklen nach folgendem Temperatur-Zeit-Schema:

- 3 min. 93 °C
- 30 sec. 93 °C
- 30 sec. 55 °C 40 mal
- 60 sec. 72 °C
- 7 min. 72 °C

anschließende Zwischenlagerung bei einer Haltetemperatur von 15 °C. Zur Kontrolle der erfolgreichen Amplifikation der cDNA wurde das PCR-Produkt elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurden Gele gegossen, bestehend aus 30 ml TAE-Puffer und 0.3 g Agarose (erwärmt und 50 Minuten in einer Elektrophoresekammer abgekühlt). Die Trennung des PCR-Produkts vom Silikonöl erfolgte nach der Parafilmmethode. Bei dieser Methode wurde der Inhalt des PCR-Gefäßes (100 μ l Flüssigkeitsmix und 50 μ l Silikonöl) auf

einen schräg gehaltenen Streifen Parafilm pipettiert. Auf Grund des Viskositätsunterschieds lief das Silikonöl deutlich langsamer als das PCR-Produkt und trennte sich so davon. Daraufhin erfolgte die Beladung der Gelkammern nach folgendem Schema:

Lane 1: 20 μ l PCR-Ansatz
 4 μ l Rotiload-DNA

Lane 2: 1 μ l 1 kb DNA Leiter
 4 μ l Rotiload-DNA
 19 μ l Aqua dest.

und die elektrophoretische Auftrennung bei 125 V. Unter lichtgeschützten Bedingungen wurde das Gel auf einem Rüttler 15 Minuten in Ethidiumbromidlösung gefärbt und anschließend unter UV-Licht (Biometra FLX 20) betrachtet. Die Größenabschätzung (Abb. 4) des PCR-Produkts erfolgte im Vergleich zur 1kb DNA Leiter und lag bei ca. 1400 Basen.



Abb. 4: Größenabschätzung des PCR-Produkts (TAE-Gel, Etidiumbromidfärbung):

Lane 1: PCR-Produkt; Lane 2: 1 kb DNA Leiter

3.9.6 Aufreinigung des PCR-Produkts

Da nach erfolgter PCR noch Reste der Reaktionskomponenten, wie Primer, nicht aufgenommene Nukleotide, Enzyme, Salze etc. im Reaktionsansatz vorhanden waren, wurde dieser entsprechend des Qiagen QIAquick PCR Purification-Kits (Catalog No.: 28104) aufgereinigt. Die anschließende Konzentration des PCR-Produkts lag bei 25.5 ng/µl.

3.9.7 Ligation der Protein-cDNA mit Plasmid

Zur Herstellung des Plasmids, das die genetische Information enthält, die für das gewünschte Protein kodiert, wurde das QIAexpress Kit (Catalog No. 32149) der Firma Qiagen verwendet. Dieses enthielt u.a. das Plasmid pQE-30 UA (Basensequenz und weitere Eigenschaften des Plasmids siehe 2.6 Anhang, Plasmid pQE-30 UA).

Der Ligationsansatz wurde in PCR-Gefäßen unter gekühlten Bedingungen nach folgendem Schema zusammengestellt:

- 1 µl pQE-30 UA Vektor (50 ng/µl)
- 2 µl PCR-Produkt
- 2 µl Aqua dest.
- 5 µl 2 x Ligation Master Mix

Und daraufhin für 2 Stunden bei 16 °C auf einem Thermocycler inkubiert.

3.9.8 Herstellung kompetenter Escherichia coli

Die Herstellung von kompetenten E. coli erfolgte nach dem Protokoll The QIAexpressionist™ (Protocol – Preparation of competent E. coli) der Firma Qiagen.

3.9.9 Transformation von kompetenten Escherichia coli

Die Transformation (Übertragung von DNA auf Bakterien) der kompetenten E. coli wurde entsprechend des Protocols 3 (Transforming of competent M 15 cells) des QIAexpress Kit (Catalog No. 32149) durchgeführt.

10 µl Aliquot des Ligationsansatzes (aus 3.9.7) wurden in ein eisgekühltes 1.5 ml Mikrozentrifugenröhrchen vorgelegt. Daraufhin wurden 100 µl resuspendierter kompetenter E. coli nachgelegt, vorsichtig gemischt und 20 Minuten auf Eis gekühlt. Es folgte eine Inkubation für 90 Sekunden bei 42 °C. Es wurden 500 µl Psi broth den Zellen zugefügt und unter leichtem Rütteln (Intervalle von 10 Sekunden mit 300 rpm und 50 Sekunden Pause im Wechsel) für weitere 75 Minuten inkubiert. Es folgte das Ausplattieren von 50 µl, 100 µl und 200 µl Aliquots auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten. Diese wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert (siehe Protokoll).

3.9.10 Kontrollen der erfolgten Transformation

Positivkontrolle

Um zu kontrollieren, ob eine erfolgreiche Transformation stattgefunden hat, musste nachgewiesen werden, dass kompetente E. coli das Plasmid aufgenommen haben. Dazu wurden 50 µl, 100 µl und 200 µl des Vektor enthaltenden E. coli-Aliquots (aus 3.9.9) auf antibiotikahaltige Agarplatten (s. Reagenzien) ausplattiert und bei 37 °C über mindestens 24 h inkubiert. Bei

erfolgreicher Transformation fand ein Wachstum der Bakterien trotz wachstumshemmender Antibiose statt, da das aufgenommene Plasmid Antibiotikaresistenzen in Form eines β -Laktamasegens (bla) und eines Chloramphenicol-Acetyl-Transferase-Gens (CAT) enthielt.

Die auf den antibiotikahaltigen Agarplatten angewachsenen Bakterien enthielten das Plasmid pQE-30 UA. Dabei war jedoch noch nicht klar, ob diese Plasmide in der nativen Form oder mit inseriertem PCR-Produkt vorlagen.

Negativkontrolle

Als Negativkontrollen wurden zur Überprüfung der Antibiotikaaktivität der Agarplatten nicht transformierte E. coli ausplattiert. Bei diesen fand nach Inkubation (37 °C über mindestens 24 h) kein Wachstum statt, was eine intakte Antibiotikaaktivität belegte.

Nachweis der Aufnahme des Insertionsprodukts in das Plasmid

Mit dem Ziel zu überprüfen, ob die von den angewachsenen Bakterien aufgenommenen Plasmide die genetischen Information enthielten, die für Alpha-Tubulin kodiert, wurde eine erneute PCR durchgeführt. Diese erfolgte nach dem gleichen Schema wie in 3.9.5, wobei mit einem sterilen Träger Anteile der gewachsenen Bakterienkolonie statt 1 μ g cDNA zu dem Reaktionsansatz hinzugegeben wurden. Die darauffolgende Elektrophorese des PCR-Produkts zeigte erneut eine Bande bei ca. 1400 Basen, was dafür sprach, dass die aufgenommenen Plasmide die gewünschte Protein-cDNA-Sequenz enthielt.

Zur weiteren Kontrolle wurden die Plasmide der angewachsenen Bakterienkulturen entsprechend des Qiagen Plasmid Purification Kits (Plasmid Midi Kit Catalog no. 12143) aufgereinigt.

Es folgte ein Restriktionsverdau der Plasmide mit dem Ziel, das aufgenommene PCR-Produkt auszuschneiden. Die dafür benötigten Restriktionsenzyme wurden der NEB-cutter-Liste der Firma BioLabs[®] entnommen. Die Restriktionsenzyme BamHI und EcoRV schneiden das Plamid pQE-30UA je einmal auf der Seite des Startcodons. Die Restriktionsenzyme PstI und HindIII schneiden das Plasmid je einmal auf der Seite des Stopcodons. Die Reaktionsansätze wurden nach folgendem Schema in sterilen PCR-Gefäßen angesetzt:

1 µl	EcoRV = 20 units
2 µl	PstI = 20 units
2 µl	Puffer der entsprechend mitgelieferten Puffer
1.3 µl	DNA = 1 µg DNA
13.7 µl	dest. H ₂ O

und für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Die anschließende Beladung der Gelkammern für eine erneute elektrophoretische Auftrennung in Gelen aus TAE-Puffer (entsprechend 3.9.5) bei 125 V erfolgte nach folgendem Schema:

Lane 1:	1 µl 1 kb DNA Leiter
	4 µl Rotiload-DNA
	19 µl Aqua dest.

Lane 2-7: 20 µl Ansatz des Restriktionsverdau der Plasmide der
unterschiedlichen Bakterienkolonien
4 µl Rotiload-DNA

Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel unter lichtgeschützten Bedingungen auf einem Rüttler 15 Minuten in Ethidiumbromidlösung gefärbt und anschließend unter UV-Licht betrachtet.

3.9.11 Herstellung von Glycerin Stocks

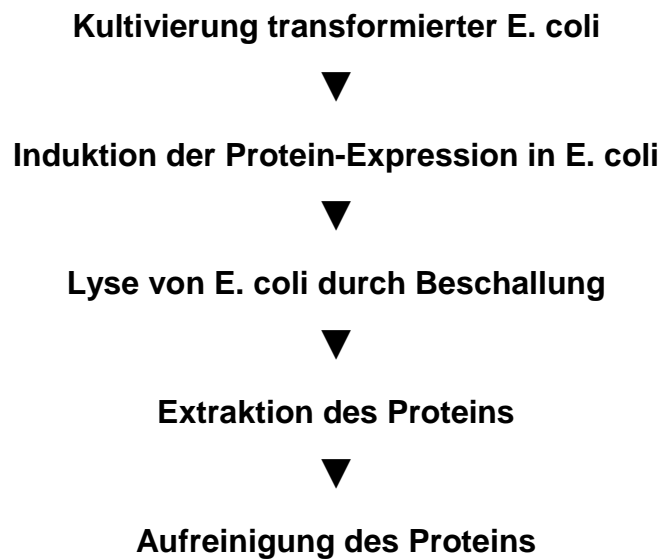
Zur weiteren Verarbeitung und Aufbewahrung der in 3.9.9 auf Agarplatten angewachsenen transformierten Bakterienkolonien wurden Glycerin-Stocks angelegt.

Dazu wurde aus einzelnen angewachsenen Kolonie und 5 ml LB_A-Medium eine Starterkultur erstellt und diese für 8 Stunden bei 37 °C unter Rütteln (Thermorüttler HG) inkubiert. Nach 1:500 Verdünnung mit LB_A-Medium wurde die Inkubation für 8 - 16 Stunden fortgesetzt. Anschließend wurden 900 µl des Bakterienmediums und 900 µl Glycerin in Kryoröhrchen pipettiert und bei -70 °C gelagert.

3.9.12 Expression und Aufreinigung von Proteinen

Die Expression und Aufreinigung eines Proteins wird in mehrere kleinere Schritte unterteilt (siehe Kurzübersicht 2).

Für die Expression und Aufreinigung von Alpha-Tubulin aus transformierten E. coli wurde das QIAexpression Kit IV (Catalog No. 32149) unter modifizierten Bedingungen verwendet (siehe Methoden 3.9.12 Expression und Aufreinigung des Proteins).



Kurzübersicht 2: Das Schema zeigt die einzelnen Schritte der Expression und Aufreinigung eines Proteins. Dabei werden erfolgreich transformierte E. coli verwendet, die das Plasmid mit der genetischen Information für das Protein enthalten.

Zur Expression des rekombinanten Proteins wurde das QIAexpression Kit IV (Catalog No. 32149) unter modifizierten Bedingungen verwendet. Mit sterilen Impfösen wurden transformierte Bakterien aus dem Glycerin-Stock auf antibiotikahaltige LB-Agarplatten aufgetragen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur weiteren Verarbeitung wurden einzelne angewachsene Bakterienkolonien in 1.5 ml LB_A-Medium gegeben und über Nacht unter Rütteln (300 rpm) bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 500 µl dieser Lösung zu 10 ml vorgewärmtem LB_A-Medium in sterile Glaskolben gegeben und bei 37 °C für 3 Stunden unter Rütteln inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0.5 - 0.7 vorlag. Anschließend wurden den Glaskolben 10 µl IPTG (1 M) (IPTG induziert die Produktion des zu exprimierenden Proteins) hinzugefügt und sie für weitere 4 - 5 Stunden unter Rütteln bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurde die Lösung in Mikrozentrifugenröhrchen transferiert und für 20 Minuten

bei 6000 g (= 8000 rpm Sorvall SS 34) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2 ml Puffer B resuspendiert und im Anschluss daran mit einem Branson Sonifier 250 (schwächste Stärke) unter gekühlten Bedingungen beschallt. Dadurch wurden die Zellen lysiert (die aufgetragenen lysierten Zellen entsprechen ZL in Abbildung 5). Es folgte eine Zentrifugation bei 15000 g für 25 Minuten. Der Überstand (siehe Ü in Abbildung 5) wurde auf Ni-NTA-Säulen aufgetragen und für 2 Minuten bei 700 g (= 2800 rpm) zentrifugiert (der Durchfluss entspricht DF in Abbildung 5). Dabei war es wichtig, dass vor Verwendung der Ni-NTA-Säulen diese mit 600 µl Puffer B durch Zentrifugation für 2 Minuten bei 700 g (= 2800 rpm) equilibriert wurden. Anschließend wurden die Ni-NTA-Säulen durch zweimalige Zentrifugation mit 600 µl Puffer C für 2 Minuten bei 700 g (= 2800 rpm) (Aliquot des 1. Waschgangs entspricht W_1 und das Aliquot des 2. Waschgangs entspricht W_2 in Abbildung 5) gewaschen. Die Elution erfolgte durch Zentrifugation mit 600 µl Puffer E für 2 Minuten bei 700 g (= 2800 rpm) (das 1. Eluat entspricht E_1 , das 2. Eluat entspricht E_2 und das 3. Eluat entspricht E_3 der Abbildung 5).

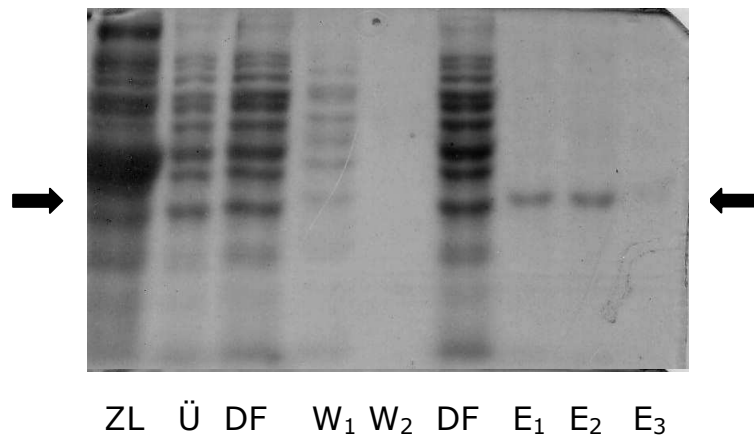


Abb. 5: Aufreinigung von Alpha-Tubulin unter denaturierenden Bedingungen.

Alpha-Tubulin wurde durch *E. coli* exprimiert und unter Verwendung von Ni-NTA-Säulen und den entsprechenden Wasch- und Elutionsschritten aufgereinigt. Die Proteine wurden in 10 %-Acrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie-Blue-Färbung visualisiert.

ZL: Zell Lysat nach Beschallung

Ü: Überstand nach 1x Zentrifugation

DF: Durchfluss

W1: Aliquot des 1. Waschgangs

W2: Aliquot des 2. Waschgangs

E1: 1. Eluat nach Zentrifugation mit 600 µl Puffer E für 2 min. bei 700 g

E2: 2. Eluat nach Zentrifugation mit 600 µl Puffer E für 2 min. bei 700 g

E3: 3. Eluat nach Zentrifugation mit 600 µl Puffer E für 2 min. bei 700 g

Die Pfeile markieren die Höhe der Bande des exprimierten Alpha-Tubulins und zeigen von links nach rechts (ZL-E3) deren Verlauf seiner Aufreinigung

Abbildung 5 zeigt die Zwischenprodukte bei der Expression und Aufreinigung von Alpha-Tubulin im Verlauf des Protokolls. Das Gel wurde wie oben beschrieben beschichtet. Im Verlauf der Aufreinigung (von ZL bis E₃) bleibt nur noch das mit Histidin-Resten markierte Alpha-Tubulin übrig (markiert mit einem Pfeil).

3.9.13 Einschub zum Verständnis der Funktionsweise von Plasmid und His-tagged Proteinen (engl.: tag = Anhänger)

Um das rekombinante Protein aufzureinigen bedient man sich spezifischer Affinitäts-Marker (tags). Bei der Synthese wurde das Protein mit Histidin-Resten als Affinitäts-Marker markiert und die chromatographische Auftrennung anhand unterschiedlicher Affinität zu Adsorptionssäulen ermöglicht. Im Qiagen-Kit wurden dafür patentierte nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) Metall affine Chromatographiematrizen verwendet, an die die mit Histidin-Resten behängten Biomoleküle mit besonderer Selektivität binden. Die Markierung des rekombinanten Proteins erfolgte dabei schon bei der Expression durch das Plasmid 6-fach mit Histidin.

C. Ergebnisse

1. Screening nach Antigen-Determinanten

Es wurden Seren von 62 Patienten mit Kollagenosen im Westernblot unter Verwendung des aus Rinderhirn gewonnenen 100 000 g Überstands als Antigen untersucht. Davon enthielten 53 Seren (85.5 %) Antikörper gegen unterschiedlichste Determinanten (Vgl. Abb. 6) des gesamten Antigens. Als positive Reaktion wurde eine gut gefärbte, klar geschnittene Bande gewertet.

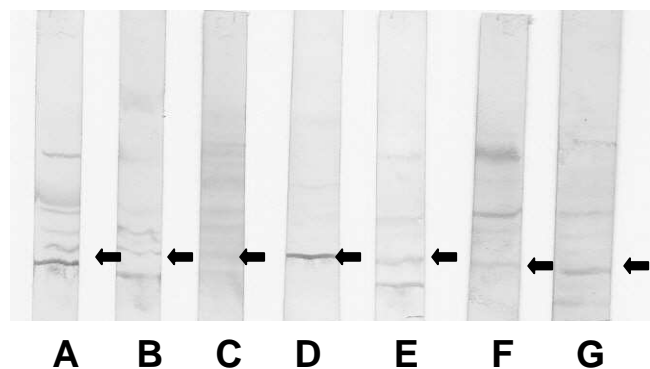


Abb. 6: Westernblot von Seren von ANA pos. Patienten mit Kollagenosen A-G unter Verwendung eines 100 000 g SN aus Rinderhirn

Zu sehen sind Reaktionen mit unterschiedlichen Determinanten. Die mit einem Pfeil markierte Determinante trat gehäuft auf.

Abbildung 6 zeigt die Ergebnisse eines typischen Westernblots, in dem die unterschiedlichen Patientenserum (A-G) mit verschiedenen Determinanten des Antigens reagiert haben. Die mit einem Pfeil markierte Determinante kam bei verschiedenen Patienten gehäuft vor. Ihre Größe wurde durch den

Vergleich mit einem Molekulargewichtsmarker auf ca. 31 kD (± 5 kD) bestimmt.

2. Isolation und Identifikation der Antigen determinante

Zur genaueren Charakterisierung der auffälligen 31 kD Determinante wurden bei den darauffolgenden Untersuchungen die Herstellung der Sheets für den Westernblot modifiziert (s. B 3.3.2.1.1). Nach erfolgter Elektrophorese wurde ein Teil des Gels für den Transfer verwendet. Der andere Teil des Gels wurde in Coomassieblue gefärbt (s. B 3.4 und Abb. 7).

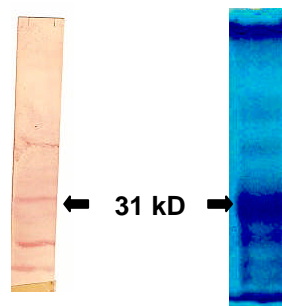


Abb. 7: Gegenüberstellung von Ag-Determinanten in Westernblot (li.) und in angefärbtem Acrylamidgel (re.: 10 %-Acrylamidgel, Coomassie-Blue-Färbung):

links: Das Sheet eines Westernblots mit dem Serum eines an SLE erkrankten Patienten zeigte Reaktionen mit unterschiedlichen Ag-Determinanten. Neben anderen zeigte sich eine Reaktion bei 31 kD (Pfeil)

rechts: Durch Coomassie-Blue-Färbung des Acrylamidgels nach erfolgter Elektrophorese ließen sich unterschiedliche Ag-Determinanten darstellen, eine Bande konnte der 31 kD Determinante zugeordnet werden (Pfeil)

Dadurch war es möglich, die Antigen determinanten, mit denen Patientenserum reagiert hatten, mit den im Gel dargestellten Determinanten zu korrelieren. Die Antigen determinante bei 31 kD wurde daraufhin mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, aus dem Gel eluiert (s. B 3.5) und lyophilisiert (s. B 3.6). Das durch die Lyophilisation hochkonzentrierte Antigen-Pulver wurde mit möglichst geringen Volumina bidest. H₂O in Lösung gebracht, nochmals in einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und erneut in Coomassieblau angefärbt.

Die in SDS-Gel fixierte 31 kD Bande wurde zur Sequenzierung mittels „peptide mass fingerprints“ durch Massenspektrometrie“ (MALDI-TOF) in das Interfakultäre Institut für Zellbiologie, Abteilung für Immunologie in Tübingen (s. B 3.7), übersandt. Das Ergebnis der Sequenzierung ergab, dass die untersuchte Bande

-Alpha Tubulin

-Beta Tubulin

-F1 ATPase, Alpha (gi1943080)

enthielt.

3. Verifizierung der Anwesenheit von Alpha-Tubulin in der 31 kD-Determinante und Etablierung von Referenzbanden im Westernblot

In weiteren Westernblots wurden durch monoklonale Antikörper gegen Alpha- und Beta-Tubulin Referenzbanden dargestellt. Durch diese Referenzbanden war es möglich, die Höhe der Tubulinbande im gesamten 100 000 g SN genau zu lokalisieren. In einem Screening wurden Patientenserum, die eine Reaktion mit der 31 kD-Bande hervorriefen, herausgefiltert.

In einem weiteren Schritt wurden Serum von 29 Patienten, bei denen durch die Voruntersuchung eine Bande in Höhe der 31 kD-Determinante vermutet wurde, erneut im Westernblot getestet. Bei 25 dieser 29 Serum (86.2 %)

erzeugten Antikörperreaktionen eine Bande, die der Alpha-Tubulin-Bande entsprach.

Diese Ergebnisse ließen sich auch an Patienten mit gesicherter neuropsychiatrischer Manifestation einer Kollagenose bestätigen. In Westernblots wurden Seren von 17 Patienten getestet. Dabei zeigten 16 Patienten eine positive Reaktion mit dem gesamten 100 000 g SN aus Rinderhirn. Diese Reaktion stimmte bei 5 Patienten (29.4 %) mit den Referenzbanden bei 31 kD überein.

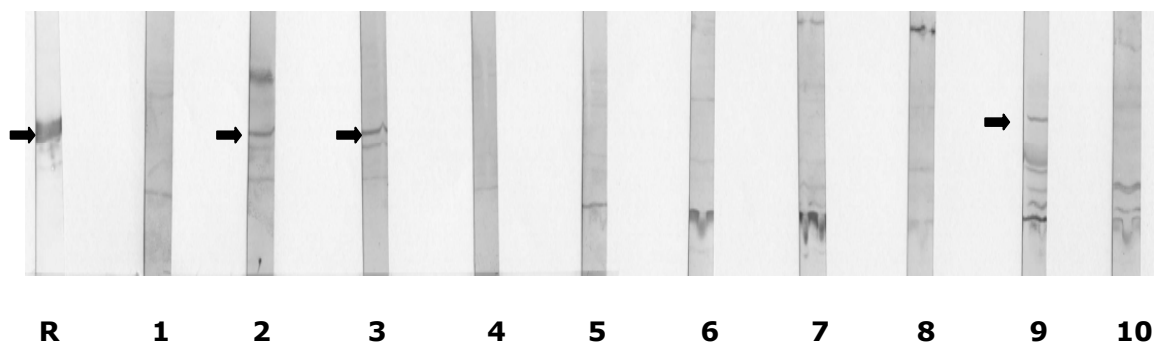


Abb. 8: Westernblot mit dem 100 000 g SN als Antigen zur Gegenüberstellung der durch monoklonale Anti-Alpha-Tubulin-Ak erzeugten Referenzbande (R) und Seren von 10 Patienten (1-10), die an Kollagenosen erkrankt sind. Die in den Seren 2, 3 und 9 enthaltenen Antikörper riefen eine Reaktion mit der Antigen determinante hervor, die mit der Lage der Referenzbande bei 31 kD korreliert.

Abbildung 8 zeigt einen Westernblot bei dem die Lokalisation der Bande einiger Patientenserum mit der Lokalisation der Referenzbande, die durch monoklonale Anti-Alpha-Tubulin-Antikörper erzeugt wurde, übereinstimmt.

4. Westernblot der isolierten 31 kD-Antigendeterminante

Um zu überprüfen, ob die 31kD-Determinante tatsächlich Alpha- oder Beta-Tubulin enthält, wurden im Westernblot anstelle von Patientenseren zunächst monoklonale Anti-Alpha, Anti-Beta-Tubulin-Antikörper und Anti-Map2-Antikörper gegen die eluierte Bande getestet.

Abbildung 9 zeigt die Ergebnisse des entsprechenden Westernblots unter Verwendung der eluierten 31 kD-Determinante als Antigen. Es ist zu erkennen, dass die monoklonalen Antikörper gegen Alpha-Tubulin, Beta-Tubulin, wie auch Map2 (in absteigender Intensität) mit der isolierten 31 kD-Antigendeterminante reagieren.

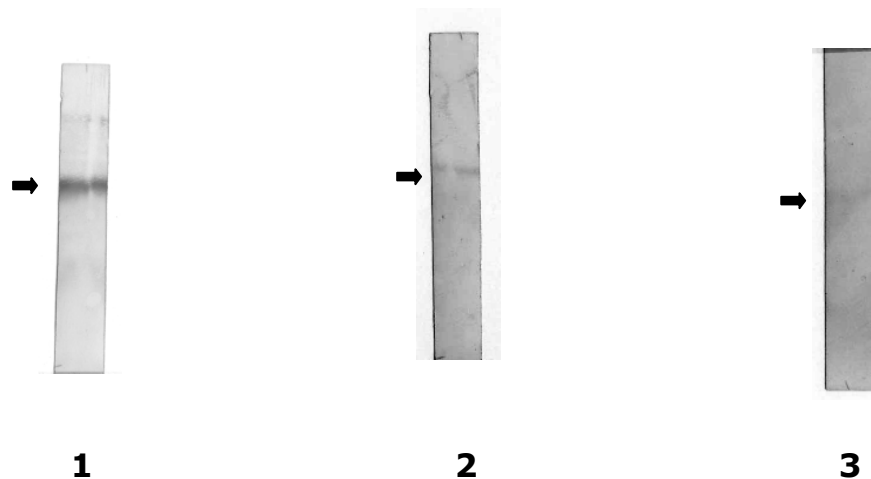


Abb. 9: Westernblot der eluierten 31-kD-Ag-Determinante des 100 000 g SN aus Rinderhirn unter Verwendung monoklonaler Antikörper

- 1 – monoklonale Anti-Alpha-Tubulin-Ak zeigen eine gut sichtbare Reaktion mit dem eluierten Ag
- 2 – monoklonale Anti-Beta-Tubulin-Ak zeigen eine sichtbare Reaktion mit dem eluierten Ag
- 3 – monoklonale Anti-Map2-Ak zeigen eine schwach sichtbare Reaktion mit dem eluierten Ag

Sowohl die monoklonalen Anti-Alpha-Tubulin-Antikörper, als auch die monoklonale Anti-Beta-Tubulin-Antikörper und Anti-Map2-Antikörper zeigten eine Reaktion mit der eluierten 31 kD-Determinante des

100 000 g SN aus Rinderhirn (markiert mit einem Pfeil). Die Stärke der Reaktion lässt sich an der Intensität der Bande erkennen.

Bei weiteren Untersuchungen wurde die isolierte 31 kD-Determinante als Antigen verwendet.

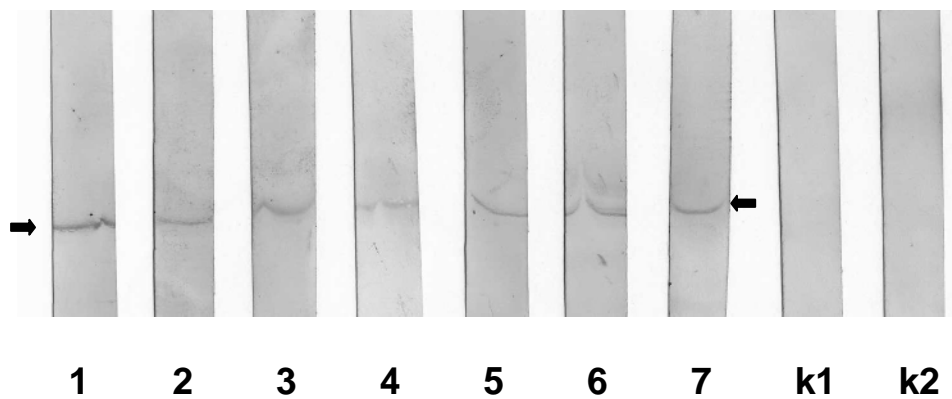


Abb. 10: Westernblot unter Verwendung der eluierten 31-kD-Determinante als Antigen.

Die Seren von 7 Patienten (1-7), die an Kollagenosen erkrankt sind zeigten eine gut sichtbare Reaktion mit der Antigen-determinante (Höhe mit Pfeilen markiert), die Kontrollseren k1 und k2 zeigten keine Reaktion.

Es wurden Seren von 11 Patienten mit Kollagenosen, bei denen in Voruntersuchungen im Westernblot mit dem gesamten 100 000 g SN eine Reaktion in Höhe der 31 kD-Determinante nachgewiesen werden konnten, unter Verwendung der eluierten 31 kD-Determinante als Antigen getestet. Davon zeigten 10 Patienten (90.9 %) Antikörper gegen die eluierte Determinante (Vgl. Abb. 10). Kontrollseren zeigten keine Reaktion.

5.1 Rekombinante Herstellung von Alpha-Tubulin

Die rekombinante Herstellung von Alpha-Tubulin ist ein sehr komplexes Verfahren, das über mehrere Zwischenschritte abläuft (siehe Methoden unter 3.9 „Herstellung des rekombinanten Antigens“ und Diskussion Kurzübersicht 1 und 2).

Im Verlauf der Herstellung wurden immer wieder zahlreiche Kontrollen durchgeführt, um aufgetretene Fehler frühzeitig erkennen und beheben zu können.

Bei einer Kontrolle wurde die erfolgte Insertion der genetischen Information für Alpha-Tubulin in das Plasmid durch einem Restriktionsverdau nachgewiesen.

Abbildung 11 zeigt das Ergebnis der Elektrophorese nach Restriktionsverdau der unterschiedlichen Plasmide 2-7.

Die Ansätze 2 und 7 zeigen 3 Banden: Die Bande A bei ca. 1400 Basen entspricht von der Größe der ausgeschnittenen cDNA des Alpha-Tubulins.

Die Bande B bei ca. 3500 Basen entspricht von der Größe dem Plasmid ohne die aufgenommene cDNA-Proteinsequenz.

Die Bande C bei ca. 5000 Basen entspricht von der Größe dem gesamten Plasmid mit dem aufgenommenen PCR-Produkt.

Die Ansätze 3, 4, 5 und 6 zeigen nur eine Bande, was darauf schließen lässt, dass bei diesen Plasmiden keine Insertion von DNA stattgefunden hat.

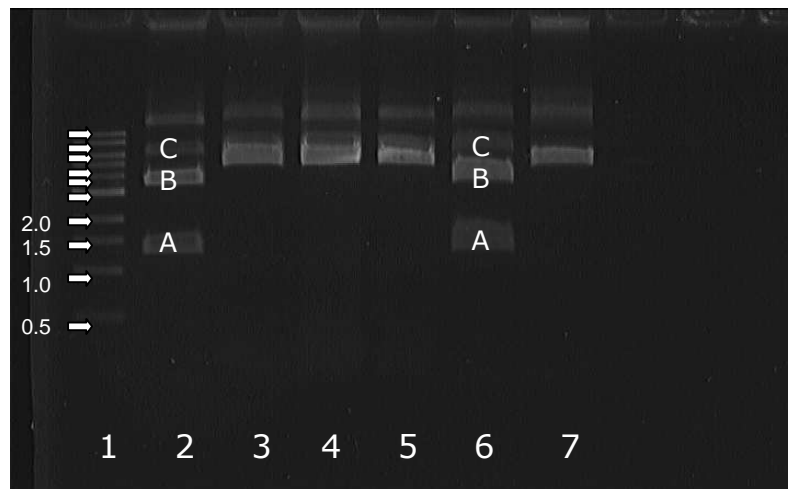


Abb. 11: Nachweis unterschiedlicher Plasmidfragmente nach

Restriktionsverdau (TAE-Gel, Ethidiumbromidfärbung):

Lane 1: 1 kb DNA Leiter

Lane 2-7: Plasmide nach Restriktionsverdau

- A :** Bande bei ca. 1400 Basen, deren Größe der ausgeschnittenen cDNA-Proteinsequenz des Alpha-Tubulins entspricht.
- B :** Bande bei ca. 3500 Basen, die dem Plasmid ohne die aufgenommene cDNA-Proteinsequenz entspricht.
- C :** Bande bei ca. 5000 Basen, die dem gesamten Plasmid mit dem aufgenommenen PCR-Produkt entspricht.

5.2 Analyse des Alpha-Tubulin synthetisierenden Bakterienklons

Nach erfolgter Proteinexpression der Bakterienklone (siehe Methoden 3.9.12 Expression und Aufreinigung des Proteins) wurde das doppelsträngige Plasmid, das die genetische Information für die Expression von Alpha-Tubulin enthält, zur Kontrolle eingeschickt. Dabei wurde die Basensequenz, die für Alpha-Tubulin codiert, in beide Richtungen untersucht. Im Anschluss wurde die analysierte Basensequenz mit der bekannten Alpha-Tubulin Basensequenz verglichen. Die Basensequenz von alpha-Tubulin wurde der PubMed Datenbank entnommen (homo sapiens Tubulin, alpha NM 006082).

Der Vergleich der Basensequenz des Plasmids mit der original Alpha-Tubulin-Basensequenz hat ergeben, dass die vom Plasmid aufgenommene cDNA auf beiden Strängen zu 99% mit der DNA-Sequenz von Alpha-Tubulin übereinstimmt.

Auf dem rückwärts synthetisierenden DNA-Strang der Basensequenz des Plasmids wurde jedoch an Position 808 statt der Base Cytosin in das Plasmid die Base Thymin eingebaut, so dass auf cDNA-Ebene aus dem Basentriplett ctg => ttg wird und auf mRNA-Ebene aus dem Basentriplett „gac“ das Basentriplett „aac“. Das bedeutet, dass statt der Aminosäure Aspartat die Aminosäure Asparaginsäure in das Protein eingebaut wurde.

Auf dem vorwärts synthetisierenden DNA-Strang der Plasmidbasensequenz wurden 3 Basen ausgetauscht.

An Position 148 wurde statt der Base Cytosin in das Plasmid die Base Thymin eingebaut, so dass auf cDNA-Ebene aus dem Basentriplett „tac“ das Triplett „cac“ beziehungsweise auf mRNA-Ebene aus dem Basentriplett „gug“ das Basentriplett „aug“ wurde. Dies hat zur Folge, dass statt der Aminosäure Valin die Aminosäure Methionin in das Protein eingebaut wurde.

Des Weiteren wurde an Position 618 statt der Base Guanin in das Plasmid die Base Adenin eingebaut. Dies hat zur Folge, dass aus cDNA-Ebene das Basentriplett „aaa“ statt „aag“ heisst. Dies bedeutet auf mRNA-Ebene, dass aus dem Basentriplett „uuc“ das Basentriplett „uuu“ wurde, was schlussendlich keine Veränderung der Aminosäuresequenz des Proteins nach sich zieht, da beide Basentriplets für die Aminosäure Phenylalanin kodieren.

Des Weiteren wurde an Position 645 statt der Base Adenin in das Plasmid die Base Guanin eingebaut. Dies hat zur Folge, dass auf cDNA-Ebene das Basentriplett ccg statt cca heisst. Dies bedeutet auf mRNA-Ebene, dass aus dem Basentriplett „ggu“ das Basentriplett „ggc“ wurde, was schlussendlich keine Veränderung der Aminosäuresequenz des Proteins nach sich zieht, da beide Basentriplets für die Aminosäure Glycin kodieren.

6. Überprüfung der Antigenität des rekombinant hergestellten Alpha-Tubulins und Gegenüberstellung mit 100 000 g SN aus Rinderhirn

In ersten Untersuchungen musste die Antigenität des rekombinant hergestellten Alpha-Tubulins als Antigen nachgewiesen werden. Dazu wurden Sammelgele für den Westernblot mit 20 µl/well des rekombinanten Alpha-Tubulins beschichtet und der Blot unter Verwendung von monoklonalen Anti-Alpha-Tubulin-, Anti-Beta-Tubulin- und Anti-Map2-Antikörpern durchgeführt. Abbildung 12 zeigt, dass sowohl die monoklonalen Anti-Alpha-Tubulin-Antikörper als auch die monoklonalen Anti-Beta-Tubulin-Antikörper mit dem hergestellten Alpha-Tubulin reagierten. Die Anti-Map2-Antikörper zeigten keine Reaktion.

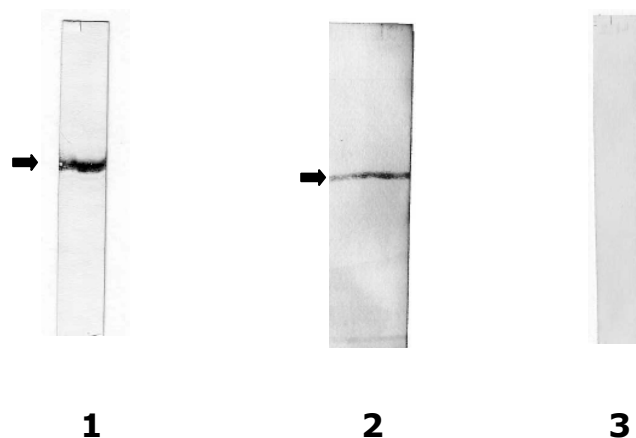


Abb. 12: Westernblot des rekombinant hergestellten Alpha-Tubulins als Antigen unter Verwendung monoklonaler Antikörper

1 – monoklonale Alpha-Tubulin-Ak zeigen eine gut sichtbare Reaktion mit Alpha-Tubulin (siehe Pfeil)

2 – monoklonale Anti-Beta-Tubulin-Ak zeigen eine diskrete Reaktion mit Alpha-Tubulin (siehe Pfeil)

3 – monoklonale Anti-Map2-Ak zeigen keine erkennbare Reaktion mit Alpha-Tubulin

Um die Korrelation der Bande bei 31 kD des 100 000 g SN aus Rinderhirn mit dem rekombinant hergestellten Alpha-Tubulin nochmals zu bestätigen, wurden Sammelgele mit je 20 µl rekombinant hergestelltem Alpha-Tubulin und 20 µl des gesamten 100 000 g SN im Wechsel (s. 3.3.2.1 und 3.3.2.3) beschichtet. Der Westernblot mit monoklonalen Antikörpern wurde entsprechend 3.3.2.5 durchgeführt.

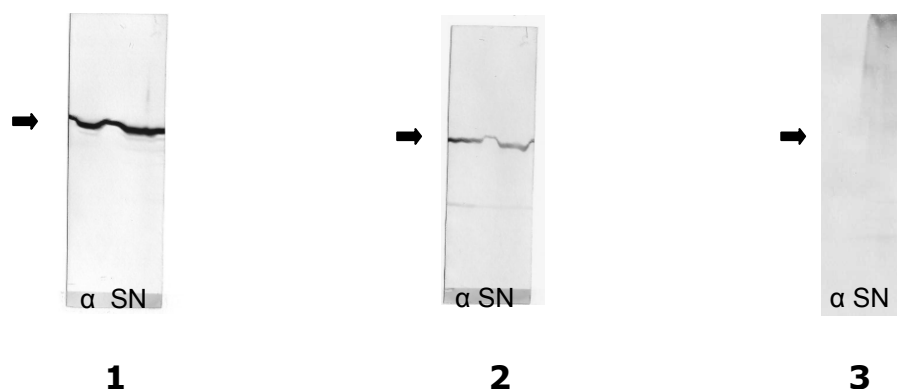


Abb. 13: Westernblot zur Gegenüberstellung des rekombinant hergestellten Alpha-Tubulins (α) mit dem 100 000 g SN aus Rinderhirn (SN) unter Verwendung monoklonaler Antikörper

- 1 – monoklonalen Anti-Alpha-Tubulin-Ak
- 2 – monoklonalen Anti-Beta-Tubulin-Ak
- 3 – monoklonale Anti-Map2-Ak

Abbildung 13 zeigt das Ergebnis der Gegenüberstellung des gesamten 100 000 g SN mit dem hergestellten Alpha-Tubulin. Sowohl der monoklonale Anti-Alpha-Tubulin-Antikörper als auch der monoklonale Anti-Beta-Tubulin-Antikörper zeigte eine Reaktion auf gleicher Höhe mit beiden Antigenen. Der monoklonale Anti-Map2-Antikörper zeigte nur eine schwach angedeutete

Reaktion mit dem gesamten 100 000 g SN, bei ca. 31 kD, jedoch keine Reaktion mit dem rekombinanten Alpha-Tubulin.

Desweiteren wurde die Gegenüberstellung auch durch die Anfärbung von SDS-Gelen in Coomassieblue (s. B 3.4) nach erfolgter Elektrophorese durchgeführt.

Dabei konnte gezeigt werden, dass die Bande des rekombinant hergestellten Alpha-Tubulins mit der 31 kD Determinante des 100 000 g SN übereinstimmt.

7. Westernblotuntersuchungen mit rekombinant hergestelltem Alpha-Tubulin

Bei den abschließenden Westernblotuntersuchungen wurden die Sammelgele mit 20 µl/well des rekombinanten Alpha-Tubulins beladen. Es konnte eine Reaktion unterschiedlicher Patientenseren mit dem Alpha-Tubulin-Antigen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 14).

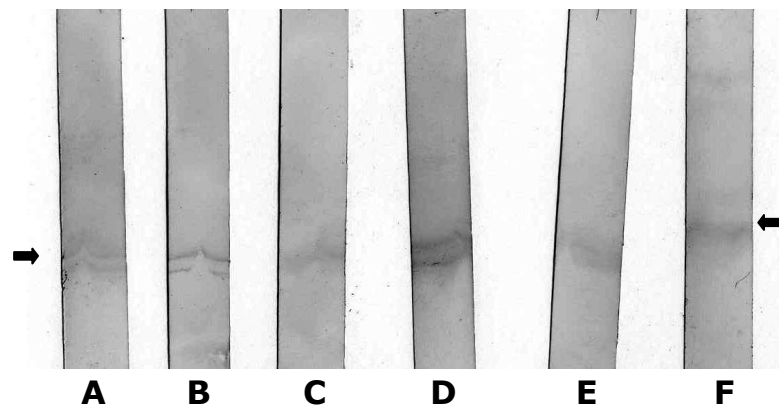


Abb. 14: Westernblot des rekombinant hergestellten Alpha-Tubulin-Ag mit den Seren von 6 Patienten (A-F), die an Kollagenosen erkrankt sind.

Es zeigt sich eine Reaktion unterschiedlicher Patientenseren mit dem Alpha-Tubulin-Ag (Höhe mit Pfeilen markiert)

8. Ausschluss unspezifischer Reaktionen im Westernblot mit rekombinant hergestelltem Alpha-Tubulin

Für die Interpretation der Ergebnisse musste ausgeschlossen werden, dass die Zweitantikörper des Westernblots (IgG und IgM HRP, siehe 3.3.2.5) direkt an das rekombinant hergestellte Alpha-Tubulin banden und somit eine unspezifische Reaktionsbande entsteht. Dazu wurden die 45-minütige Inkubation mit Patientenserum und die drei anschließenden 10-minütigen Waschgänge (s. 3.3.2.5) übersprungen. Die entsprechend 3.3.2.3 beladenen Transfermembranen wurden direkt mit 1:200 monospezifischen antihumanen IgG und IgM Zweitantikörpern (DAKOPATTS, Hamburg) für 35 Minuten inkubiert und der Westernblot entsprechend 3.3.2.5 fortgeführt.



Abb. 15: Westernblot des rekombinant hergestellten Alpha-Tubulin-Ag mit monospezifischen antihuman IgG und IgM Zweitantikörpern.

Es zeigt, dass keine direkte Reaktion der Zweitantikörper mit Alpha-Tubulin stattgefunden hat.

Abbildung 15 zeigt das Ergebnis des o.g. Westernblots. Es hat keine Reaktion der Transfermembranen stattgefunden, was eine direkte

unspezifische Reaktion der Zweitantikörper mit dem rekombinant hergestellten Alpha-Tubulin ausschliesst.

9. Gegenüberstellung Westernblot und Elisa

Die Seren von 9 Patienten wurden mit der eluierten 31 kD-Determinante des 100 000 g SN aus Rinderhirn als Antigen sowohl im Westernblot als auch im Elisa zur Gegenüberstellung miteinander reagieren gelassen. Die Ergebnisse von Westernblot und Elisa stimmten in weiten Teilen überein. Jeweils ein Patient reagierte ausschliesslich nur in einem der beiden Tests positiv (siehe Tabelle 7)

Tab. 7: Gegenüberstellung der Untersuchungsergebnisse von Elisa und Westernblot von 12 Patienten mit Kollagenose mit bekannten Anti-ZNS-Ak unter Verwendung der eluierte 31 kD-Determinante des 100 000 g SN

	Zahl n der Patienten	%
Elisa pos + WB pos	7	77.8
Elisa pos. / WB neg.	1	11.1
WB pos. / Elisa neg.	1	11.1

10. Ergebnisse ELISA

Die eluierte 31 kD-Determinante des 100 000 g SN aus Rinderhirn sowie das käufliche Tubulin (Firma MP Biochemicals) wurden auch im Elisa als Antigen verwendet. 20 Seren, die im Elisa mit dem gesamten 100 000 g SN positiv getestet wurden, wurden auf eine Reaktion mit der eluierten 31 kD-Determinante untersucht. Davon zeigten 14 Seren (70 %) eine positive Reaktion. Ebenfalls wurden diese 20 Seren gegen das käufliche

Tubulin der Firma MP Biochemicals im Elisa getestet. 4 Seren (20 %) zeigten auch eine positive Reaktion gegen das aufgereinigten käuflichen Tubulin (siehe Tab 8).

Tab. 8: Ergebnisse des Elisa von 20 Patienten mit Kollagenose mit bekannten Anti-ZNS-Ak unter Verwendung der eluierte 31 kD-Determinante des 100 000 g SN und des aufgereinigten Tubulin der Firma MP Biochemicals

Antigen	Zahl n der pos. Patienten (20 Pat. getestet)	% der pos. Patienten
Eluierte 31 kD-Determinante des 100 000 g SN	14	70
käufliches Tubulin	4	20

11. Ergebnisse des Elisa und des Westernblots der Kontrollgruppe von MS-Patienten

Um die Antigenität des 100 000 g SN aus Rinderhirn bei anderen zerebralen Erkrankung zu testen, wurden 107 Seren von Patienten, die an Multipler Sklerose erkrankt sind, im Elisa auf eine Reaktion mit dem 100 000 g SN untersucht. Davon zeigten 11 Seren (10.2 %) eine positive Reaktion. Im Westernblot wurden 25 Seren an Multipler Sklerose erkrankter Patienten untersucht, wovon 4 Seren (16 %) eine Reaktion mit dem Antigen aus Rinderhirn zeigten. Dabei zeigte sich keine Reaktion der Seren mit der Bande 31 kD-Determinante des 100 000 g SN aus Rinderhirn.

12. Ergebnisse des Elisa der Kontrollgruppe von Epilepsie-Patienten

Die Antigenität des 100 000 g SN aus Rinderhirn wurde ebenfalls an Seren von 8 an Epilepsie erkrankten Patienten überprüft. Bei der Untersuchung im Elisa zeigte keiner dieser Patienten eine positive Reaktion.

13. Zusammenfassung der Ergebnisse

1990 haben Klein et al. den Zusammenhang von Anti-ZNS-Antikörpern und dem Auftreten von neuropsychiatrischen Symptomen bei Patienten mit Kollagenosen nachgewiesen. Diese Antikörper können in Westernblot und Elisa durch die Verwendung eines 100 000 g Überstands aus Rinderhirn als Antigen detektiert werden. In der vorliegenden Doktorarbeit wurde einer dieser Anti-ZNS-Antikörper, der im Zusammenhang mit dem Auftreten von neuropsychiatrischen Symptomen bei Patienten mit Kollagenosen steht, näher charakterisiert. Im Westernblot reagierte dieser Antikörper mit der 31 kD Determinante des 100 000 g Überstands des Rinderhirns.

In verschiedenen Untersuchungen wurden die Seren von 62 Patienten, die an einer Kollagenose erkrankt sind, getestet.

In Westernblotuntersuchungen von Anti-ZNS-Antikörper positiven Patienten zeigten 25 von 29 Seren (86.2 %) eine Antikörperreaktionen mit dieser 31 kD Bande.

Diese Reaktion liess sich auch an Patienten mit gesicherter neuropsychiatrischer Manifestation einer Kollagenose bestätigen. 5 von 17 Patienten (29.4 %) zeigten eine positive Reaktion mit der 31 kD Bande.

Die Sequenzierung dieser Antigendeterminante bei 31 kD offenbarte, dass sie unter anderem das Protein Alpha-Tubulin enthielt.

Alpha-Tubulin wurde daraufhin rekombinant in Bakterien hergestellt, anschließend aufgereinigt und für weitere Untersuchungen als Antigen

verwendet. Es konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass die Antikörper von einem Teil der Patienten mit neuropsychiatrischer Manifestation einer Kollagenose mit dem rekombinant hergestellten Alpha-Tubulin im Westernblot reagierten.

In weiteren Untersuchungen haben wir darüberhinaus den 100 000 g Überstand aus Rinderhirn, die daraus eluierte 31 kD-Determinante und das aufgereinigte Tubulin der Firma MP Biochemicals auch im Elisa als Antigen verwendet.

Im Elisa von Patienten, die mit dem gesamten 100 000 g Überstand aus Rinderhirn positiv getestet waren, reagierten 14 von 20 Seren Seren (70 %) mit der eluierte 31 kD-Determinante, wovon 4 Seren (20 %) auch eine positive Reaktion gegen das aufgereinigte Tubulin zeigten.

D. Diskussion

1. Fragestellung der Dissertation

In der Literatur sind zahlreiche Auto-Antikörper beschrieben, die im Zusammenhang mit neuropsychiatrischen Manifestationen bei Patienten mit Kollagenosen stehen. Die Weite des Spektrums der induzierten neuropsychiatrischen Symptome und die Vielzahl der möglichen Antikörper wirft die Frage nach den biochemischen Strukturen und den Vorgängen auf, die letztendlich zur Entstehung dieser verschiedenen Symptome führen. In den letzten Jahrzehnten wurde intensiv an dieser Thematik geforscht, mit dem Ziel, neue Erkenntnisse über die Rolle der Antikörper zu gewinnen und die Pathomechanismen, die den Symptomen zugrunde liegen, aufzudecken.

In der vorliegenden Dissertation wird ein ZNS-Auto-Antikörper bei Patienten mit Kollagenosen und neuropsychiatrischer Beteiligung näher charakterisiert. Durch die Verwendung eines 100 000 g Überstands aus Rinderhirn als Antigen konnten bisher in Liquor und Seren von Patienten unterschiedliche ZNS-Auto-Antikörper, die für eine neuropsychiatrische Beteiligung bei Kollagenosen hochspezifisch sind, nachgewiesen werden. Das Auftreten dieser Antikörper, die mittels Westernblot und Elisa detektiert werden können, korreliert eng mit dem Auftreten von neuropsychiatrischen Symptomen bei Patienten mit Kollagenosen.

Die detektierten ZNS-Auto-Antikörper reagierten dabei im Westernblot mit 10 unterschiedlichen Determinanten des 100 000 g Überstands aus Rinderhirn. 4 Hauptdeterminanten der Molekulargewichte 29, 48, 56 und 68 kD, sowie 6 Nebendeterminanten der Molekulargewichte 130, 110, 84, 60, 38 und 34 kD konnten unterschieden werden. Es konnte jedoch bisher keine genaue Charakterisierung der Antigen-Determinanten, gegen die die Antikörper ge-

richtet sind vorgenommen werden, da es auf Grund des hohen Lipidgehalts des Gehirns nur schwer gelang, reine subzelluläre Fraktionen zu gewinnen. Es wurde davon ausgegangen, dass der als „ZNS-spezifische Fraktion“ verwendete 100 000 g Überstand aus Rinderhirn keine organunspezifischen mitochondrialen oder nukleären Antigene mehr enthält. Dies wurde 1990 durch die serologische Untersuchung von definierten Markerseren belegt (71).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Auto-Antikörper gegen ZNS-Gewebe näher charakterisiert, das entsprechende mit ihm reagierende Antigen rekombinant in Bakterien hergestellt, anschließend aufgereinigt und an Patientenseren ausgetestet.

Die durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, dass ein Teil der Anti-ZNS-Antikörper bei Patienten mit neuropsychiatrischer Manifestation einer Kollagenose gegen das Antigen Alpha-Tubulin gerichtet ist. Die Reaktion dieser Antikörper mit Alpha-Tubulin liess sich sowohl im Westernblot als auch im Elisa nachweisen.

2. Nachweis von Antikörpern in Westernblot und Elisa

Für den Nachweis von Antikörpern gegen neuronale Strukturen können zahlreiche unterschiedliche Methoden, wie IFL (Immunfloreszenz), Zytotoxic Assay, Elisa und Westernblot verwendet werden (6, 22, 36, 51, 96, 108, 124). Bei den Untersuchungen wurde bewusst auf die Methodik des Westernblots und des Elisas zur Identifizierung unbekannter Antikörper/Antigen-Systeme zurückgegriffen, da sich diese beiden Verfahren auch in zahlreichen anderen Arbeiten mit ähnlicher Fragestellung bewährt haben (16, 53, 86, 95, 118, 123, 125) (43, 103, 123).

Darüberhinaus ist der Elisa unter Verwendung des 100 000 g Überstands aus Rinderhirn als Antigen im Immunpathologischen Labor (Leiterin: Prof. Dr. R. Klein) der Medizinischen Klinik Tübingen ein seit Jahren etabliertes Verfahren in der Routinediagnostik des NPSLE. Mit diesem Test

werden Anti-neuronale-Antikörper im Serum oder Liquor von Patienten mit Kollagenosen nachgewiesen, die eine hohe Sensitivität für die Diagnose einer zerebralen Beteiligung haben. In der Dissertation von C. Richter wurde festgestellt, dass die Detektion dieser Antikörper im Westernblot für die zerebrale Manifestation bei Kollagenerkrankungen hochspezifisch ist (71).

Die beiden Methoden unterscheiden sich jedoch unter anderem darin, dass es sich beim Elisa um ein eher quantitatives Nachweisverfahren für Antikörper handelt, wohingegen der Westernblot mehr qualitativen Nachweischarakter besitzt. Er erlaubt darüberhinaus die Zuordnung zu Proteinen mit unterschiedlichen Molekulargewichten.

In den durchgeführten Westernblots wurde das Antigen aus Rinderhirn elektrophoretisch aufgetrennt. Somit bestand anschließend die Möglichkeit unterschiedliche Antigen determinanten zu differenzieren. Über Molekulargewichtsmarker wurde die Größe der verschiedenen Antigen determinanten bestimmt und in der darauf folgenden Sequenzierung ihre Komponenten analysiert. Die Ergebnisse der Sequenzierung haben gezeigt, dass eine der Antigen determinanten unter anderem das Protein Alpha-Tubulin enthält.

3. Wahl des Untersuchungsmaterials

Bei den durchgeführten Untersuchungen wurden Seren von Patienten mit neuropsychiatrischer Manifestation einer Kollagenose auf vorhandene Auto-Antikörper getestet. Es war bereits bekannt, dass bei einem Teil dieser Patienten Anti-neuronale-Antikörper im Serum nachzuweisen sind (37). In der vorliegenden Arbeit wurde ein in entsprechenden Patientenserum vorkommender Anti-neuronaler-Antikörper näher charakterisiert.

Untersuchungen im Zusammenhang von Autoantikörpern bei neuropsychiatrischer Manifestation einer Kollagenose haben gezeigt, dass der Nachweis im Liquor Vorzüge im Vergleich zum Nachweis im Serum hat (125).

Bluestein et al (7) haben in einer Arbeit beschrieben, dass die Antineuronalen-Auto-Ak im Liquor in 8fach höherer Konzentration nachgewiesen werden konnten als im Serum. In der Arbeit von Isshi und Hirohata (53) konnte sogar die Korrelation, der im Zellelisa detektierten IgG Anti-neuronalen-Antikörpern mit neuropsychiatrischen Symptomen ausschliesslich im Liquor nachgewiesen werden, jedoch nicht im Serum.

Trotz dieser Vorkenntnisse wurden die Untersuchungen in dieser Arbeit an Seren durchgeführt. Dies liegt vor allem daran, dass bei einer Vielzahl der Patienten Serumproben vorliegen, jedoch wegen der umständlicheren Gewinnung keine Liquorproben. Desweiteren werden vor allem beim Antikörpernachweis im Westernblot erhebliche Mengen an Liquor benötigt, da dieser unverdünnt eingesetzt werden muss. Diese standen in diesem Umfang nicht zu Verfügung. Dies ist jedoch ein bei der Forschung zu dieser Thematik ein allgemein bekanntes Problem.

4. Schwierigkeit der Vergleichbarkeit der Untersuchungsergebnisse von Westernblot und Elisa

Die Vergleichbarkeit der Untersuchungsergebnisse von Westernblot und Elisa gestaltete sich schwierig. Beim Westernblot ist die Unterscheidung eines positiven Testergebnisses von einem negativen Testergebnis eindeutig. Als positive Reaktion wurde eine gut gefärbte, klar geschnittene Bande gewertet. Beim Elisa hingegen gibt es für die unterschiedlichen verwendeten Antigenkonzentrationen der verschiedenen Untersuchungen keine Referenzwerte. Bei geringen Mengen beziehungsweise niedrigen Konzentrationen des applizierten Antigens, wie sie beim rekombinant hergestellten Alpha-Tubulin vorlagen, unterschieden sich die Extinktionswerte der vermeintlich positiven Ergebnisse kaum von den negativen Ergebnissen. Verdünnungsreihen zur Bestimmung der optimalen Antigenkonzentration und Serumverdünnung konnten aufgrund der geringen Konzentration des rekombinanten Alpha-

Tubulins nicht durchgeführt werden. Im Hinblick darauf, dass es sich bei der Fragestellung der Dissertation um einen qualitativen Nachweis der zu charakterisierenden Antikörper handelte, wurde der Schwerpunkt auf die Ergebnisse der Westernblotuntersuchungen gelegt. Ein Vergleich der Untersuchungsergebnisse von Elisa und Westernblot wurde lediglich dann vorgenommen, wenn aufgrund ausreichender Antigenkonzentrationen eine klare Unterscheidung der Extinktionswerte des Elisa und somit die Definition von positiven Testergebnissen möglich war.

5. Analyse der Sequenzierung der 31 kD Determinante

Die durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, dass ein Teil der Patienten mit neuropsychiatrischer Manifestation einer Kollagenose Antikörper gegen die 31 kD Determinante des 100 000 g SN aus Rinderhirn aufweist. Dies hat dazu geführt, dass diese Determinante eluiert, konzentriert und durch Massenspektrometrie analysiert wurde. Die Analyse hat ergeben, dass die 31 kD Determinante Alpha-Tubulin, Beta-Tubulin und die F1 ATPase-Alpha enthält (siehe Ergebnisse 2. Isolation und Identifikation der Antigen determinante).

Nach persönlicher Mitteilung von B. Preuss et al. haben Ihre Untersuchungen gezeigt, dass Patienten mit Kollagenerkrankungen keine Auto-Antikörper gegen F1 ATPase produzieren. Deshalb beschränkten sich die weiteren Untersuchungen auf die Antigene Alpha- und Beta-Tubulin.

Es wurden Westernblots mit der eluierten 31 kD Determinante unter Verwendung monoklonaler Anti-Alpha-Tubulin- und Anti-Beta-Tubulin-Antikörper durchgeführt (siehe Ergebnisse 4. Westernblot der isolierten 31 kD-Antigen determinante). Diese haben gezeigt, dass die monoklonalen Anti-Alpha-Tubulin-Antikörper im Vergleich zu den monoklonalen Anti-Beta-Tubulin-Antikörpern eine deutlich stärkere Reaktion mit der 31 kD Determinante hervorrufen (siehe Ergebnisse Abbildung 9).

Daraufhin wurde für die weiteren Untersuchungen das Protein Alpha-Tubulin rekombinant in *E. coli* hergestellt und anschließend aufgereinigt.

6. Wahl des Expressionssystems für die rekombinante Herstellung von Alpha-Tubulin

Um das Protein Alpha-Tubulin für weitere Untersuchungen in aufgereinigter Form als Antigen verwenden zu können, wurde es rekombinant hergestellt. Zu diesem Zweck stehen neben Bakterien andere Expressionssysteme für Proteine wie Viren, Insekten, Pilze oder Säugerzellen zu Verfügung (4, 13, 54, 72, 82).

Generell gibt es bei der rekombinanten Herstellung von Proteinen eine Vielzahl von möglichen Komplikationen (4, 12, 13, 54, 72, 82). Bekannte Probleme sind unter anderem die Toxizität des zu synthetisierenden Proteins, seine Instabilität, unsauberes Prozessieren, ineffiziente Translation oder mangelnde post-translationale Modifikationen.

Über die bakterielle Toxizität des zu synthetisierenden Alpha-Tubulins ist in der Literatur nichts bekannt, zumal es sich um ein in Eukaryonten weitverbreitetes Protein handelt (67). Bei den anderen oben angeführten möglichen Schwierigkeiten handelt es sich um methodische Probleme.

Die Wahl des Mediums für die rekombinante Herstellung von Alpha-Tubulin fiel auf *Escherichia coli* Bakterien. Dabei spielte unter anderem eine Rolle, dass das Protein Alpha-Tubulin ausschliesslich für Antigenzwecke synthetisiert werden sollte, so dass seine funktionelle Aktivität von untergeordneter Bedeutung war.

Der Vorteil bei der rekombinanten Herstellung von Proteinen in Bakterien ist, dass maximale Expressionsraten erzielt werden können. Den anderen Methoden zur Proteinexpression wurde kein Vorzug geben, da die Proteinaktivität oder post-translationale Modifikationen (wie Glykosilierung, Phosphorylierung oder funktionelle Disulfid-Brücken) für die weiteren Untersuchungen von untergeordneter Bedeutung waren. Des Weiteren haben Kollegen unserer

Forschungsgruppe schon erfolgreich Proteine in Escherichia coli Bakterien exprimiert.

7. Grundvoraussetzungen und Probleme bei der rekombinanten Herstellung von Alpha-Tubulin

Die rekombinante Herstellung von Alpha-Tubulin in E. coli erfolgte über mehrere Zwischenschritte (siehe Kurzübersicht 1 und Methoden 3.9).

Dabei wurde stets unter äusserst sterilen Bedingungen gearbeitet, da bereits kleinste Verunreinigungen die Ergebnisse beeinflussen. Um während des mehrstufigen Prozesses auftretende Fehler möglichst frühzeitig erkennen und korrigieren zu können, wurden während des gesamten Herstellungsverlaufs zahlreiche Kontrollen durchgeführt.

Grundvoraussetzung für einen der ersten Schritte war, dass Changzellen die mRNA-Sequenz für das Protein Alpha-Tubulin besitzen. Nur so konnten die Primer (in 3.9.5) an die cDNA, die zuvor durch reverse Transkription der Changzell-mRNA hergestellt wurde, binden und die Amplifikation der Alpha-Tubulin-cDNA initiieren.

Vor der Ligation der amplifizierten cDNA mit dem Plasmid produzierte die Taq-DNA-Polymerase während der PCR am 3'-Ende einen Überhang der Base Adenosin. Dies ermöglichte die anschließende direkte Insertion des PCR-Produkts mit dem prälinearisierten Plasmidvektor pQE-30 UA, der am 3'-Ende einen Überhang der komplementären Base Uracil hat.

Die erfolgreiche Transformation der kompetenten E. coli (s. 3.9.9) stellt einen der zentralen Schritte bei der rekombinanten Herstellung von Alpha-Tubulin dar. Deshalb wurde die Aufnahme der funktionstüchtigen Plasmide durch die E. coli Bakterien mehrfach kontrolliert (siehe Methoden 3.9.10 Kontrolle der erfolgten Transformation).

Als positive Kontrolle wurde auf Selektivnährböden die Transformationseffizienz überprüft. Bei der entsprechenden negativen Kontrolle wurde die Anti-

biotikareaktivität der Nährböden nachgewiesen. Schlussendlich wurde die Ligation der amplifizierten cDNA mit dem Plasmid einerseits durch eine PCR, andererseits durch Restriktionsendonukleasen bestätigt.

Die anschließende Expression und Aufreinigung des Alpha-Tubulins kann wiederum in mehrere kleinere Schritte unterteilt werden (siehe Kurzübersicht 2 und Methoden 3.9.12).

Für die Expression und Aufreinigung von Alpha-Tubulin aus transformierten *E. coli* wurde das QIAexpression Kit IV (Catalog No. 32149) unter modifizierten Bedingungen verwendet (siehe Methoden 3.9.12 Expression und Aufreinigung des Proteins).

Dabei ist zu bemerken, dass generell eine Aufreinigung von Alpha-Tubulin unter nativen Bedingungen angestrebt wurde. Bei der Expression von rekombinanten Proteinen in hohen Leveln kann es jedoch zur Formation von unlöslichen Aggregaten kommen, die in *E. coli* als Inclusion-Bodies bezeichnet werden. Starke denaturierende Reagenzien wie 6 M GuHCl oder 8 M Harnstoff sind in der Lage, diese Inclusion-Bodies wieder zu lösen. Da es, wie schon oben erwähnt, für die weiteren Untersuchungen ausschliesslich um die Antigenzwecke von Alpha-Tubulin ging, spielte es eine untergeordnete Rolle, ob Alpha-Tubulin in seiner nativen oder denaturierten Form vorlag. So wurde die Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen mit 8 M Harnstoff vorgenommen. Aus dem selben Grund wurde auf eine anschließende Renaturierung des Alpha-Tubulins verzichtet.

8. Proteinexpression und ausgetauschte Aminosäuren

Nach erfolgreicher Proteinexpression wurde das Plasmid des Bakterienklons, welches die genetische Information für das Protein Alpha-Tubulin enthielt, nachträglich sequenziert. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die DNA-Sequenz des Plasmids zu 99% mit der in Datenbanken vorhandenen Alpha-Tubulin-DNA-Sequenz übereinstimmt (siehe Ergebnisse 5.2-Analyse des

Alpha-Tubulin synthetisierenden Bakterienklons). Auf den beiden DNA-Strängen des Plasmids wurden jedoch im Verlauf insgesamt 4 Basen durch andere Basen ausgetauscht (siehe Ergebnisse 5.2 Analyse des Alpha-Tubulin synthetisierenden Bakterienklons).

Bei 2 der 4 ausgetauschten Basen hatte die Veränderung der Basensequenz auf Grund der Tatsache, dass mehrere Basentriplets für die gleiche Aminosäure kodieren, keinen Einfluss auf die Aminosäuresequenz des synthetisierte Alpha-Tubulins.

Bei den 2 weiteren ausgetauschten Basen kam es jedoch auf Grund des veränderten Basentriplets zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz des Alpha-Tubulins.

Dieser Austausch kann möglicherweise Folgen auf die Sekundär- oder Tertiärstruktur des Proteins beziehungsweise seine Funktion haben.

Bei den weiteren Untersuchungen wurde das synthetisierte Alpha-Tubulin ausschliesslich für Antigenzwecke verwendet. Dabei ist hauptsächlich dessen Primärstruktur für die Bindung von Antikörpern von Bedeutung. Mögliche Veränderungen der Sekundär- oder Tertiärstruktur bzw. der Proteinfunktion könnten allerdings einen Einfluss auf die Bindung von Antikörpern an Konformationsepitopen haben.

9. Untersuchungen mit rekombinant hergestelltem Alpha-Tubulin

Mit Tubulin als Antigen konnten sowohl im Westernblot als auch im Elisa Antikörper in Seren von Patienten, die an einer neuropsychiatrischen Manifestation einer Kollagenose leiden, nachgewiesen werden (siehe Ergebnisse 7. Westernblots mit rekombinant hergestelltem Alpha-Tubulin und 10. Ergebnisse des ELISA). Diese Antikörper waren in Seren von Kontrollpatienten nicht detektierbar.

Der prozentuale Anteil der Patienten, die in Westernblot oder Elisa positiv mit Alpha-Tubulin reagierten war bei beiden Untersuchungsmethoden

miteinander vergleichbar (siehe Ergebnis 13. Zusammenfassung der Ergebnisse).

Jedoch konnten sich im Einzelfall die Ergebnisse von Westernblot und Elisa bei der Nachweisbarkeit von Anti-Alpha-Tubulin-Antikörpern voneinander unterscheiden. Das bedeutet, dass die Anti-Alpha-Tubulin-Antikörper in Patientenproben nur mit einem der beiden Nachweisverfahren zu detektieren waren (teilweise nur im Elisa, teilweise nur im Westernblot), während sie sich in dem anderen Verfahren nicht nachweisen ließen. Ein im Elisa positiver Nachweis von Anti-Alpha-Tubulin-Antikörpern in Patientenseren, bei denen im Westernblot keine Antikörper nachweisbar waren (Elisa +/ Westernblot -), ist auf die höhere Sensitivität des Elisas zurückzuführen. Bei der umgekehrten Konstellation (Elisa -/ Westernblot +) ist die allgemein akzeptierte Vorstellung, dass der Westernblot besser Antikörper gegen denaturierte Antigen-determinanten erfasst als der Elisa (123). Eine weitere Ursache für unterschiedliche Ergebnisse beider Untersuchungen besteht darin, dass beim Westernblot durch die Vorbehandlung möglicherweise SDS-sensitive Epitope zerstört werden.

Insgesamt haben die Ergebnisse gezeigt, wie auch in der Zwischenzeit in einer Publikation dargestellt (81), dass Alpha-Tubulin ein neu identifiziertes Antigen bei Patienten mit neuropsychiatrischer Manifestation einer Kollagenose ist. Bei der Charakterisierung der Anti-neuronalen-Antikörper dieser Patienten hat sich herausgestellt, dass es sich bei einem Teil dieser Antikörper um Anti-Alpha-Tubulin-Antikörper handelt.

10. Alpha-Tubulin und seine Funktion

Alpha-Tubulin ist eine Untereinheit des Proteindimers Tubulin. Dieses setzt sich aus den beiden Untereinheiten Alpha- und Beta-Tubulin zusammen, die jeweils Molekulargewichte von um die 50 kD besitzen.

Dabei ist die Aminosäurestruktur von Alpha- und Beta-Tubulin zu 40% identisch und auch die 3-dimensionale Struktur ähnelt sich sehr (80). Das intrazelluläre, zylindrische, filamentöse Protein kommt in fast allen Eukaryonten vor. Es ist Hauptbestandteil der Mikrotubuli und ein intrazellulär benötigtes Protein, das an freien Ribosomen produziert wird.

Die Funktion von Mikrotubuli ist vielfältig und reicht von Bewegung der Chromosomen während der Mitose und Meiose, über Transport von Vesikeln in den Zellen (axonaler Transport in Nervenzellen) bis hin zu Form und Spezialisierung der Zellen (67, 69, 88).

11. Zugang der Anti-neuronalen-Antikörper in das ZNS

Bisher ungeklärt ist, ob Anti-neuronale-Antikörper eine pathogenetische Bedeutung haben bzw. wie sie in das ZNS gelangen. Als mögliche Zugangswege ins Nervensystem kommen entweder Störungen der Blut-Hirn-Schranke oder die de novo Synthese im Gehirn in Frage. Im Zusammenhang mit Störungen der Blut-Hirn-Schranke hat sich herausgestellt, dass Vaskulopathien kleiner Gefäßen zusammen mit Mikroinfarkten die am häufigsten gefundenen neuropathologischen Befunde beim SLE darstellen (48). Darüberhinaus scheinen Matrix Metalloproteinasen (Mmp9) eine entscheidende Rolle beim Zusammenbrechen der extrazellulären Matrixmoleküle der Blut-Hirn-Schranke zu spielen (33, 111). Bei diesen Matrix Metalloproteinasen handelt es sich um Endopeptidasen, die von einer Vielzahl von Entzündungszellen produziert werden.

Die Beobachtung, dass Anti-ZNS-Antikörper bei Patienten mit anderen neuropsychiatrischen Störungen nicht nachgewiesen werden konnten schliesst mit großer Wahrscheinlichkeit aus, daß die Produktion dieser Antikörper durch Zellschädigung induziert wird.

12. Pathomechanismen bei der Entstehung neuropsychiatrischer Symptome

Grundsätzlich haben Moore et al drei Pathomechanismen unterschieden, die zu neurologischen Dysfunktionen führen (79).

1. Neuronale Dysfunktion durch den primären Effekt des Immunsystems auf Gehirnzellen (Auto-Antikörper-Bindung an der Zelloberfläche, Immunkomplex Ablagerung mit sekundärer Entzündung und den Effekt von Zytokinen).
2. Den sekundären (indirekten) Effekt des Immunsystems durch immunvermittelte Schädigung von Strukturen, die mit neuronalen Strukturen in Verbindung stehen (Gefäße).
3. Schädigung der Neuraxis durch immun- und nichtimmune Effekte wie Infektionen, Gifte und metabolische Störungen.

Die pathogenetische Bedeutung von Antikörpern gegen neuronale Strukturen bei der Entstehung von neuropsychiatrischen Störungen konnte in Tierstudien eindeutig belegt werden. Diese haben gezeigt, dass sich durch die Injektion von Anti-ZNS-Antikörpern in das Gehirn Verhaltensstörungen und neurologische Veränderungen induzieren lassen (32, 44, 49, 91, 100).

Neben den Anti-neuronalen-Antikörpern gibt es noch eine Reihe weiterer Auto-Antikörper und anderer Mechanismen, die mit neuropsychiatrischen Manifestationen einer Kollagenosen in Verbindung gebracht werden. Dabei sind die genauen pathogenetischen Mechanismen teilweise weiterhin nicht vollständig aufgeklärt.

Der häufigste Grund für die Entstehung des NPSLE ist beispielsweise eine Ischämie, die meist durch Gefäßstenosen oder Verschlüsse kleiner Gefäße bedingt ist.

Daneben spielen auch intrakranielle und intraspinale Hämorrhagien eine Rolle, sind jedoch weniger häufig (56). Darüberhinaus werden als weiterer Mechanismus auch durch lokale Zytokine ausgelöste Entzündungen diskutiert

(10). In der Spätphase der Erkrankung kommt auch noch die Rolle der vermehrten Atherosklerose als weiterer Faktor hinzu (120, 121).

Kasama et al. hingegen unterscheiden fokale und diffuse neuropsychiatrische Symptome. Sie gehen davon aus, dass fokale Symptome auf vaskuläre Läsionen zurückzuführen sind, hingegen diffuse Manifestationen durch Antikörper oder Zytokine hervorgerufen werden (65).

Dass Autoantikörper gegen Tubulin eine Rolle bei der Entstehung neuropsychiatrischer Symptome spielen können, zeigt sich auch an den Ergebnissen der Untersuchungen anderer Krankheitsbilder. So wurde bei Patienten mit Chorea Sydenham ein Zusammenhang von Anti-Tubulin-Antikörpern mit Bewegungsstörungen und neuropsychiatrischen Symptomen nachgewiesen (70). Dabei kam es zur Bindung kreuzreagierender beziehungsweise mehrfach-reagierender Antikörper gegen das intrazelluläre Antigen Beta-tubulin an Epitope der Zelloberfläche neuronaler Zellen, was zu neuropsychiatrischen Erkrankungen führte.

Leider konnten wir nicht überprüfen, ob Seren von Patienten mit Chorea Sydenham auch Antikörper gegen Alpha-Tubulin besitzen, da uns die entsprechenden Seren nicht zu Verfügung standen.

13. Antikörper gegen Mikrotubuli assoziierte Proteine

Neben den Autoantikörpern, die direkt gegen Tubulin gerichtet sind gibt es weitere Antikörper, die sich gegen Proteine richten die im funktionellen Zusammenhang mit Mikrotubuli stehen. Von Bedeutung sind in diesem Rahmen Autoantikörper gegen Mikrotubuli assoziierte Proteine (MAP). MAPs sind Proteine, die an Tubuline binden und deren Eigenschaften verändern. Insbesondere bei MAP-2 handelt es sich um ein Protein, das ausschliesslich in Neuronen vorkommt. Es kontrolliert die zytoskeletale Integrität und interagiert mit zahlreichen strukturellen Elementen der Zelle (123).

In einer Arbeit von Williams et al. wurde ein Zusammenhang von Anti-Map2-Antikörpern und dem Auftreten von neuropsychiatrischen Symptomen beim

SLE nachgewiesen. Auf Grund dieses Zusammenhangs von Alpha-Tubulin und Map2 wurde die eluierte 31 kD Determinante auf mögliche Reaktionen mit Map2-Antikörpern untersucht. Die Ergebnisse des Westernblots haben gezeigt, dass neben monoklonalen Anti-Alpha- und Anti-Beta-Tubulin-Antikörpern auch monoklonale Anti-Map2-Antikörper mit der eluierten 31 kD Determinante reagieren (siehe Ergebnisse 4. Westernblot der isolierten 31 kD-Antigendeterminante). Daraus ergibt sich, dass Störungen des gesamten Mikrotubulin-Komplexes, also sowohl der Mikrotubulinuntereinheiten Alpha- und Beta-Tubulin, wie auch mit ihm assoziierte Proteine (Map2) im Zusammenhang mit neuropsychiatrischen Symptomen bei Kollagenosen zu stehen scheinen.

14. Auto-Antikörper und weitere Phänomene bei neuropsychiatrischen Manifestationen einer Kollagenose

Zusätzlich zu den Autoantikörpern gegen Tubulin und mit Tubulin assoziierten Proteinen gibt es zahlreiche weitere neuronale Auto-Antikörper. Insgesamt sind in der Literatur über 20 verschiedene Auto-Antikörper beschrieben, die bei der Entstehung neuropsychiatrischer Symptome bei Kollagenosen eine Rolle (126) spielen sollen.

Bereits in den 70er Jahren wurden in einer Reihe von Patientenseren Antikörper gegen Lymphozyten gefunden. Die Absorption dieser Seren mit homogenisiertem menschlichem Gehirn reduzierte die lymphozytotoxische Wirksamkeit um 90%. Eine Assoziation dieser kreuzreagierenden Antikörper mit NPSLE wurde von Bluestein und Zvaifler beschrieben (8).

Die ersten korrespondierenden Substrate Anti-neuronaler-Antikörper beim NPSLE waren menschliche Neuroblastomzelllinien. Mit ihnen wurden in einem Radioimmunoassay Antikörper detektiert (7). Im weiteren Verlauf wurden Neurofilamentproteine (92), Rattenhirnsynaptosomen (39, 41), endständige synaptische Membranproteine von Rindern (43), Rinder-,

Ratten- und menschliches Gehirn (40, 71) als weitere Antigenziele für anti-neuronale Antikörper identifiziert.

Zusätzlich zu den anti-neuronalen Antikörpern gibt es in diesem Zusammenhang noch eine Vielzahl weiterer Autoantikörper. Anti-Phospholipid-Antikörper gelten als Risikofaktor für die ZNS-Beteiligung vaskulärer Genese. Sie beeinflussen die rheologischen Eigenschaften großer und kleiner Blutgefäße und haben somit Einfluss auf die Generierung von Embolien und Thrombosen, die ischämische und hämorrhagische Gehirnfarkte verursachen (21, 52, 76). 20 – 55 % der Patienten mit SLE haben diese Anti-Phospholipid-Antikörper (56). Toubi et al (3, 78) haben festgestellt, dass 55 % der NPSLE-Patienten Anti-Phospholipid-Antikörper aufweisen, wohingegen in der Kontrollgruppe der SLE-Patienten es nur 20 % waren (109).

Darüberhinaus gibt es noch eine Vielzahl weiterer Auto-Antikörper. Es wurde eine Assoziation von anti-ribosomalen P Protein-Antikörpern und Psychosen dargestellt (27).

Desweiteren scheinen Antikörper gegen NMDA-Rezeptoren die Fähigkeit zu besitzen, einen exzitotoxischen (= toxisch auf Grund einer zu hohen Erregung) neuronalen Zelltod zu verursachen (18).

Auch ein Zusammenhang zwischen Anti-Endothelial-Zell-Antikörpern und psychiatrischen Erkrankungen ist beschrieben (16).

Neben Auto-Antikörpern gibt es weitere Pathomechnismen, die für das Auftreten von neuropsychiatrischen Symptomen verantwortlich gemacht werden. Pro-inflammatorische Zytokine (IL6, IL8, IFN-alpha)(1, 19, 57, 97, 104, 112) und erhöhte Komplementfaktoren C3 und C4 (42, 59) sind ebenfalls an der Pathogenese (111) neuropsychiatrischer Manifestationen bei Kollagenosen beteiligt, wie ein Anstieg des IP-10/MCP-1 Verhältnisses (Interferon-inducible protein 10/ monocytic chemotactic protein1; dies ist ein Liganden mit einer hohen Affinität für Chemokin-Rezeptoren)(84).

15. Neuropsychiatrische Manifestationen bei Kollagenosen - ein multifaktorielles Geschehen

Aus der Vielzahl der verschiedenen Autoantikörper und den zahlreichen anderen Faktoren, die mit der Entstehung neuropsychiatrischer Manifestationen bei Patienten mit Kollagenosen in Verbindung gebracht werden geht hervor, dass es sich um ein sehr komplexes und vielseitiges Krankheitsbild handelt. Es ist verständlich, dass nicht nur ein einziger Pathomechanismus für sämtliche neuropsychiatrischen Symptome ursächlich sein kann. Für manche kausalen Zusammenhänge wurden Hypothesen aufgestellt, für andere, insbesondere für psychiatrische und kognitive Bereiche wird es immer schwer sein, die genauen Pathomechanismen zu analysieren. Eine mögliche Kaskade ist, dass eine intrathekale Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen zur Synthese und Freisetzung von MMPs führt, was Störungen der Bluthirnschranke nach sich zieht. Dies wiederum ermöglicht es den zahlreichen Auto-Antikörpern ins ZNS zu gelangen und neuropsychiatrische Symptome zu verursachen (111). Greenwood et al. haben versucht, spezifischen Antikörpern bestimmte neurologische Defizite zuzuordnen (37). Dies ist jedoch im Fall der Anti-neuronalen-Antikörper nicht möglich.

Wegen der Vielschichtigkeit der neuropsychiatrischen Manifestationen bei Kollagenosen gibt es keinen Relevanzstandard für die Diagnose (10). Bei der Diagnose einer neuropsychiatrischen Manifestation einer Kollagenose bleibt es schwierig, die sich präsentierenden neuropsychiatrischen Symptome, die als Organmanifestation im Rahmen der Grunderkrankung auftreten können, von neuropsychiatrischen Krankheitsbildern anderer Genese (z.B. Therapie/ Steroid-bedingt, Urämie, reaktive Depression, Infektion etc.) abzugrenzen (1, 55, 101).

Eine sichere Diagnose der neuropsychiatrischen Manifestation einer Kollagenose kann deshalb erst gestellt werden, wenn sekundäre Ursachen ausgeschlossen wurden (47).

Die Zuordnung der neuropsychiatrischen Symptome als Organmanifestation der Grunderkrankung Kollagenose kann nicht durch eine einzelne Untersuchung vorgenommen werden. Vielmehr sollte die Zuordnung durch eine möglichst umfassende Zusammenschau der klinischen Präsentation, serologischer Untersuchungen, standardisierter neurologischer, rheumatologischer, psychiatrischer und neurophysiologischer Bewertungen sowie einer funktionellen und/oder strukturellen Neurobildung geschehen (1).

16. Grundprobleme in Therapie und Forschung

Die Therapie neuropsychiatrischer Manifestationen einer Kollagenose findet bisher empirisch statt, da es noch an Kontrollstudien und randomisierten Studien mangelt. Entzündliche Gehirnveränderungen werden mit Immunsuppressiva und Kortikosteroiden behandelt. Bei thrombotischen Ereignissen wird eine Antikoagulation eingeleitet. Darüberhinaus gibt es zytotoxische Behandlungsversuche.

Ein weiteres Problem bei der Forschung zu diesem Thema ist, dass neuropsychiatrische Symptome in jeder Phase des SLE auftauchen können. Das bedeutet auch in Perioden, in denen man keine Aktivität des SLE feststellen kann (47). In diesen Phasen können die Symptome als einfaches oder multiples neurologisches Geschehen im selben Individuum auftreten.

Durch diese Vielfältigkeit ist die Datenlage sehr kontrovers und hängt von vielen Faktoren ab, wie beispielsweise dem Zeitpunkt der Blutentnahme in Bezug auf den Krankheitsverlauf (26). Desweiteren hängt die Nachweisbarkeit der Antikörper bei Patienten mit Kollagenosen auch stark von den aktuellen beziehungsweise stattgefundenen Behandlungen mit Medikamenten wie Cyclophosphamid, Azathioprin oder Steroiden ab.

Es bleibt zu bemerken, dass die Prävalenz neuropsychiatrischer Manifestationen bei Patienten mit Kollagenosen variiert, was sicherlich mit auf die Schwierigkeit zurückzuführen ist, psychiatrische Abnormalitäten und kognitive

Dysfunktionen zu definieren (30, 122).

In wieweit der Nachweis der Alpha-Tubulin-Antikörper relevant sein könnte bezüglich klinischer Symptome, Prognose oder therapeutischer Optionen muss in weiteren Studien evaluiert werden.

E. Zusammenfassung

Der Nachweis von Anti-ZNS-Antikörpern in Seren und Liquores von Patienten mit Kollagenosen korreliert eng mit dem Auftreten von neuropsychiatrischen Symptomen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Anti-ZNS-Antikörper, der im Zusammenhang mit neuropsychiatrischen Symptomen bei Patienten mit Kollagenosen steht, näher charakterisiert.

Dieser Anti-ZNS-Antikörper wurde mittels Westernblot und Elisa unter Verwendung eines 100 000 g Überstands aus Rinderhirn als Antigen detektiert. Im Westernblot ausgewählter Patientenseren zeigten 25 von 29 (86.2 %) Antikörper, die mit der 31 kD Determinante des 100 000 g Überstands des Rinderhirns reagierten.

Diese Reaktion liess sich auch bei Patienten mit klinisch gesicherter neuropsychiatrischer Manifestation einer Kollagenose bestätigen. 5 von 17 Patienten (29.4 %) mit gesicherter neuropsychiatrischen Manifestation einer Kollagenose wiesen Antikörper gegen die Determinante bei 31 kD Bande auf.

Die anschließende Sequenzierung dieser 31 kD Antigendeterminante ergab, dass sie unter anderem das Protein Alpha-Tubulin als korrespondierendes Antigen für die Patienten-Antikörper enthielt.

Alpha-Tubulin wurde daraufhin über einen mehrstufigen Prozess in Escherichia Coli Bakterien rekombinant hergestellt, anschließend aufgereinigt und für weitere Untersuchungen als Antigen verwendet. Dabei konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass die Antikörper der Patientenseren mit dem rekombinant hergestellten Alpha-Tubulin im Westernblot reagierten.

Auch im Elisa konnten die Ergebnisse mit dem 100 000 g Überstand aus Rinderhirn, der daraus eluierten 31 kD-Determinante und dem aufgereinigten Alpha-Tubulin reproduziert werden.

14 von 20 Seren (70 %), die mit dem gesamten 100 000 g Überstand positiv reagiert haben, zeigten eine positive Reaktion mit der eluierten 31 kD Deter-

minante des 100 000 g Überstands, wovon 4 Seren (20 %) auch eine positive Reaktion gegen das aufgereinigte Tubulin zeigten.

Diese Untersuchungen belegen, dass bei einer Subgruppe von Patienten mit neuropsychiatrischer Manifestation einer Kollagenose Antikörper gegen Alpha-Tubulin vorkommen, die damit zumindest einen diagnostischen Stellenwert erhalten. In wie weit sie auch in die Pathogenese involviert sein könnten, muss in weiteren Studien überprüft werden.

F. Literaturverzeichnis

1. 1999. The American College of Rheumatology nomenclature and case definitions for neuropsychiatric lupus syndromes. *Arthritis Rheum* 42: 599-608
2. Alexandrova N, Niklinski J, Bliskovsky V, Otterson GA, Blake M, et al. 1995. The N-terminal domain of c-Myc associates with alpha-tubulin and microtubules in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol* 15: 5188-95
3. Asherson RA, Khamashta MA, Gil A, Vazquez JJ, Chan O, et al. 1989. Cerebrovascular disease and antiphospholipid antibodies in systemic lupus erythematosus, lupus-like disease, and the primary antiphospholipid syndrome. *Am J Med* 86: 391-9
4. Baneyx F. 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 10: 411-21
5. Berg PA, Doniach D, Roitt IM. 1967. Mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. I. Localization of the antigen to mitochondrial membranes. *J Exp Med* 126: 277-90
6. Bluestein HG. 1978. Neurocytotoxic antibodies in serum of patients with systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75: 3965-9
7. Bluestein HG, Williams GW, Steinberg AD. 1981. Cerebrospinal fluid antibodies to neuronal cells: association with neuropsychiatric manifestations of systemic lupus erythematosus. *Am J Med* 70: 240-6
8. Bluestein HG, Zvaifler NJ. 1976. Brain-reactive lymphocytotoxic antibodies in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 57: 509-16
9. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54
10. Bruns A, Meyer O. 2006. Neuropsychiatric manifestations of systemic lupus erythematosus. *Joint Bone Spine* 73: 639-45
11. Bujard H, Gentz R, Lanzer M, Stueber D, Mueller M, et al. 1987. A T5 promoter-based transcription-translation system for the analysis of proteins in vitro and in vivo. *Methods Enzymol* 155: 416-33
12. Cass B, Pham PL, Kamen A, Durocher Y. 2005. Purification of recombinant proteins from mammalian cell culture using a generic double-affinity chromatography scheme. *Protein Expr Purif* 40: 77-85

13. Chapple SD, Crofts AM, Shadbolt SP, McCafferty J, Dyson MR. 2006. Multiplexed expression and screening for recombinant protein production in mammalian cells. *BMC Biotechnol* 6: 49
14. Clark EC, Bailey AA. 1956. Neurological and psychiatric signs associated with systemic lupus erythematosus. *J Am Med Assoc* 160: 455-7
15. Cohen SB, Hurd ER. 1981. Neurological complications of connective tissue and other "collagen-vascular" diseases. *Semin Arthritis Rheum* 11: 190-212
16. Conti F, Alessandri C, Bompane D, Bombardieri M, Spinelli FR, et al. 2004. Autoantibody profile in systemic lupus erythematosus with psychiatric manifestations: a role for anti-endothelial-cell antibodies. *Arthritis Res Ther* 6: R366-72
17. Cowan NJ, Dobner PR, Fuchs EV, Cleveland DW. 1983. Expression of human alpha-tubulin genes: interspecies conservation of 3' untranslated regions. *Mol Cell Biol* 3: 1738-45
18. DeGiorgio LA, Konstantinov KN, Lee SC, Hardin JA, Volpe BT, Diamond B. 2001. A subset of lupus anti-DNA antibodies cross-reacts with the NR2 glutamate receptor in systemic lupus erythematosus. *Nat Med* 7: 1189-93
19. Dellalibera-Joviliano R, Dos Reis ML, Cunha Fde Q, Donadi EA. 2003. Kinins and cytokines in plasma and cerebrospinal fluid of patients with neuropsychiatric lupus. *J Rheumatol* 30: 485-92
20. Devinsky O, Petito CK, Alonso DR. 1988. Clinical and neuropathological findings in systemic lupus erythematosus: the role of vasculitis, heart emboli, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Ann Neurol* 23: 380-4
21. Diamond B, Volpe B. 2003. On the track of neuropsychiatric lupus. *Arthritis Rheum* 48: 2710-2
22. Diederichsen H, Pyndt IC. 1970. Antibodies against neurons in a patient with systemic lupus erythematosus, cerebral palsy, and epilepsy. *Brain* 93: 407-12
23. Dubois EL. 1966. The clinical picture of systemic lupus erythematosus, in Dubois E (ed): *Lupus Erythematosus*. New York, Mc Graw-Hill: 233
24. Dubois EL, Tuffanelli DL. 1964. Clinical Manifestations of Systemic Lupus Erythematosus. Computer Analysis of 520 Cases. *Jama* 190: 104-11
25. Dubois ELW, M. Cox, M. et al. 1973. Causes of death in 212 cases of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 16: 540-1

26. Eber T, Chapman J, Shoenfeld Y. 2005. Anti-ribosomal P-protein and its role in psychiatric manifestations of systemic lupus erythematosus: myth or reality? *Lupus* 14: 571-5
27. Elkon KB, Bonfa E, Brot N. 1992. Antiribosomal antibodies in systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am* 18: 377-90
28. Ellis SG, Verity MA. 1979. Central nervous system involvement in systemic lupus erythematosus: a review of neuropathologic findings in 57 cases, 1955--1977. *Semin Arthritis Rheum* 8: 212-21
29. Estes D, Christian CL. 1971. The natural history of systemic lupus erythematosus by prospective analysis. *Medicine (Baltimore)* 50: 85-95
30. Feinglass EJ, Arnett FC, Dorsch CA, Zizic TM, Stevens MB. 1976. Neuropsychiatric manifestations of systemic lupus erythematosus: diagnosis, clinical spectrum, and relationship to other features of the disease. *Medicine (Baltimore)* 55: 323-39
31. Feng PH, Cheah PS, Lee YK. 1973. Mortality in systemic lupus erythematosus: a 10-year review. *Br Med J* 4: 772-4
32. Fox RI, Howell FV, Bone RC, Michelson P. 1984. Primary Sjogren syndrome: clinical and immunopathologic features. *Semin Arthritis Rheum* 14: 77-105
33. Gijbels K, Masure S, Carton H, Opdenakker G. 1992. Gelatinase in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other inflammatory neurological disorders. *J Neuroimmunol* 41: 29-34
34. Ginzler EM, Diamond HS, Weiner M, Schlesinger M, Fries JF, et al. 1982. A multicenter study of outcome in systemic lupus erythematosus. I. Entry variables as predictors of prognosis. *Arthritis Rheum* 25: 601-11
35. Goers TA, Ramachandran S, Aloush A, Trulock E, Patterson GA, Mohanakumar T. 2008. De novo production of K-alpha1 tubulin-specific antibodies: role in chronic lung allograft rejection. *J Immunol* 180: 4487-94
36. Golombek SJ, Graus F, Elkon KB. 1986. Autoantibodies in the cerebrospinal fluid of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 29: 1090-7
37. Greenwood DL, Gitlits VM, Alderuccio F, Sentry JW, Toh BH. 2002. Autoantibodies in neuropsychiatric lupus. *Autoimmunity* 35: 79-86
38. Grigor R, Edmonds J, Lewkonja R, Bresnihan B, Hughes GR. 1978. Systemic lupus erythematosus. A prospective analysis. *Ann Rheum Dis* 37: 121-8

39. Hanly JG, Fisk JD, Eastwood B. 1994. Brain reactive autoantibodies and cognitive impairment in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 3: 193-9
40. Hanly JG, Hong C. 1993. Antibodies to brain integral membrane proteins in systemic lupus erythematosus. *J Immunol Methods* 161: 107-18
41. Hanly JG, Hong C, White TD. 1993. Brain synaptosomal antibodies in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2: 35-45
42. Hanly JG, Walsh NM, Sangalang V. 1992. Brain pathology in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 19: 732-41
43. Hanson VG, Horowitz M, Rosenbluth D, Spiera H, Puszkin S. 1992. Systemic lupus erythematosus patients with central nervous system involvement show autoantibodies to a 50-kD neuronal membrane protein. *J Exp Med* 176: 565-73
44. Hardin JA, Rahn DR, Shen C, Lerner MR, Wolin SL, et al. 1982. Antibodies from patients with connective tissue diseases bind specific subsets of cellular RNA-protein particles. *J Clin Invest* 70: 141-7
45. Harvey AM, Shulman LE, Tumulty PA, Conley CL, Schoenrich EH. 1954. Systemic lupus erythematosus: review of the literature and clinical analysis of 138 cases. *Medicine (Baltimore)* 33: 291-437
46. Hebra F KM. 1875. On diseases of the skin including the exanthemata. *The New Syndeham Society* IV: 14-47
47. Hermosillo-Romo D, Brey RL. 2002. Diagnosis and management of patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus (NPSLE). *Best Pract Res Clin Rheumatol* 16: 229-44
48. Hess DC. 1997. Cerebral lupus vasculopathy. Mechanisms and clinical relevance. *Ann N Y Acad Sci* 823: 154-68
49. Hoffman SA, Arbogast DN, Ford PM, Shucard DW, Harbeck RJ. 1987. Brain-reactive autoantibody levels in the sera of ageing autoimmune mice. *Clin Exp Immunol* 70: 74-83
50. Holloway PW. 1973. A simple procedure for removal of Triton X-100 from protein samples. *Anal Biochem* 53: 304-8
51. How A, Dent PB, Liao SK, Denburg JA. 1985. Antineuronal antibodies in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 28: 789-95
52. Hughes GR, Harris NN, Gharavi AE. 1986. The anticardiolipin syndrome. *J Rheumatol* 13: 486-9
53. Isshi K, Hirohata S. 1998. Differential roles of the anti-ribosomal P antibody and antineuronal antibody in the pathogenesis of central nervous system involvement in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 41: 1819-27

54. Jansen KU, Conroy WG, Claudio T, Fox TD, Fujita N, et al. 1989. Expression of the four subunits of the Torpedo californica nicotinic acetylcholine receptor in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 264: 15022-7
55. Jennekens FG, Kater L. 2002. The central nervous system in systemic lupus erythematosus. Part 1. Clinical syndromes: a literature investigation. *Rheumatology (Oxford)* 41: 605-18
56. Jennekens FG, Kater L. 2002. The central nervous system in systemic lupus erythematosus. Part 2. Pathogenetic mechanisms of clinical syndromes: a literature investigation. *Rheumatology (Oxford)* 41: 619-30
57. John GR, Lee SC, Brosnan CF. 2003. Cytokines: powerful regulators of glial cell activation. *Neuroscientist* 9: 10-22
58. Johnson RT, Richardson EP. 1968. The neurological manifestations of systemic lupus erythematosus. *Medicine (Baltimore)* 47: 337-69
59. Jongen PJ, Doesburg WH, Ibrahim-Stappers JL, Lemmens WA, Hommes OR, Lamers KJ. 2000. Cerebrospinal fluid C3 and C4 indexes in immunological disorders of the central nervous system. *Acta Neurol Scand* 101: 116-21
60. Jung M, Ohl F, Stephan C, Rabien A, Kristiansen G, et al. 2007. [Quantifying gene expression in prostate carcinoma. Which endogenous reference genes are suitable?]. *Urologe A* 46: 1083-4
61. Kapeller R, Toker A, Cantley LC, Carpenter CL. 1995. Phosphoinositide 3-kinase binds constitutively to alpha/beta-tubulin and binds to gamma-tubulin in response to insulin. *J Biol Chem* 270: 25985-91
62. Kaposi M. 1872. Neue Beiträge zur Kenntnis des Lupus erythematosus. *Arch Dermatol Syph* 4: 36-79
63. Kapp OH, Vinogradov SN. 1978. Removal of sodium dodecyl sulfate from proteins. *Anal Biochem* 91: 230-5
64. Karassa FB, Ioannidis JP, Touloumi G, Boki KA, Moutsopoulos HM. 2000. Risk factors for central nervous system involvement in systemic lupus erythematosus. *Qjm* 93: 169-74
65. Kasama T, Odai T, Wakabayashi K, Yajima N, Miwa Y. 2008. Chemokines in systemic lupus erythematosus involving the central nervous system. *Front Biosci* 13: 2527-36
66. Kassan SS, Lockshin MD. 1979. Central nervous system lupus erythematosus. The need for classification. *Arthritis Rheum* 22: 1382-5
67. Katz W, Weinstein B, Solomon F. 1990. Regulation of tubulin levels and microtubule assembly in *Saccharomyces*

- cerevisiae: consequences of altered tubulin gene copy number. *Mol Cell Biol* 10: 5286-94
68. Kawahara K, Hashimoto M, Bar-On P, Ho GJ, Crews L, et al. 2008. alpha-Synuclein aggregates interfere with Parkin solubility and distribution: role in the pathogenesis of Parkinson disease. *J Biol Chem* 283: 6979-87
 69. Kirk KE, Morris NR. 1993. Either alpha-tubulin isogene product is sufficient for microtubule function during all stages of growth and differentiation in *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol* 13: 4465-76
 70. Kirvan CA, Cox CJ, Swedo SE, Cunningham MW. 2007. Tubulin is a neuronal target of autoantibodies in Sydenham's chorea. *J Immunol* 178: 7412-21
 71. Klein R, Richter C, Berg PA. 1991. Antibodies against central nervous system tissue (anti-CNS) detected by ELISA and western blotting: marker antibodies for neuropsychiatric manifestations in connective tissue diseases. *Autoimmunity* 10: 133-44
 72. Konig P, Giesow K, Schuldt K, Buchholz UJ, Keil GM. 2004. A novel protein expression strategy using recombinant bovine respiratory syncytial virus (BRSV): modifications of the peptide sequence between the two furin cleavage sites of the BRSV fusion protein yield secreted proteins, but affect processing and function of the BRSV fusion protein. *J Gen Virol* 85: 1815-24
 73. Kremer JM, Rynes RI, Bartholomew LE, Rodichok LD, Pelton EW, et al. 1981. Non-organic non-psychotic psychopathology (NONPP) in patients with systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 11: 182-9
 74. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5
 75. Lai JC, Clark JB. 1979. Preparation of synaptic and nonsynaptic mitochondria from mammalian brain. *Methods Enzymol* 55: 51-60
 76. Leritz E, Brandt J, Minor M, Reis-Jensen F, Petri M. 2002. Neuropsychological functioning and its relationship to antiphospholipid antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Exp Neuropsychol* 24: 527-33
 77. Long AA, Denburg SD, Carbotte RM, Singal DP, Denburg JA. 1990. Serum lymphocytotoxic antibodies and neurocognitive function in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 49: 249-53
 78. Love PE, Santoro SA. 1990. Antiphospholipid antibodies: anticardiolipin and the lupus anticoagulant in systemic lupus

- erythematosus (SLE) and in non-SLE disorders. Prevalence and clinical significance. *Ann Intern Med* 112: 682-98
79. Moore PM, Lisak RP. 1995. Systemic lupus erythematosus: immunopathogenesis of neurologic dysfunction. *Springer Semin Immunopathol* 17: 43-60
 80. Nakazawa M, Moreira D, Laurent J, Le Guyader H, Fukami Y, Ito K. 1999. Biochemical analysis of the interaction between elongation factor 1alpha and alpha/beta-tubulins from a ciliate, *Tetrahymena pyriformis*. *FEBS Lett* 453: 29-34
 81. Ndhlovu M, Preuss BE, Dengjel J, Stevanovic S, Weiner SM, Klein R. Identification of alpha-tubulin as an autoantigen recognized by sera from patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Brain Behav Immun* 25: 279-85
 82. Noraz N, Benichou S, Madaule P, Tiollais P, Vernant JC, Desgranges C. 1993. Expression of HTLV-I Env and Tax recombinant peptides in yeast: identification of immunogenic domains. *Virology* 193: 80-8
 83. O'Connor JF. 1959. Psychoses associated with systemic lupus erythematosus. *Ann Intern Med* 51: 526-36
 84. Okamoto H, Iikuni N, Kamitsuji S, Yoshio T, Minota S, Kamatani N. 2006. IP-10/MCP-1 ratio in CSF is an useful diagnostic marker of neuropsychiatric lupus patients. *Rheumatology (Oxford)* 45: 232-4
 85. Oku K, Atsumi T, Furukawa S, Horita T, Sakai Y, et al. 2003. Cerebral imaging by magnetic resonance imaging and single photon emission computed tomography in systemic lupus erythematosus with central nervous system involvement. *Rheumatology (Oxford)* 42: 773-7
 86. Omdal R, Brokstad K, Waterloo K, Koldingsnes W, Jonsson R, Mellgren SI. 2005. Neuropsychiatric disturbances in SLE are associated with antibodies against NMDA receptors. *Eur J Neurol* 12: 392-8
 87. Ornstein L. 1964. Disc Electrophoresis. I. Background and Theory. *Ann N Y Acad Sci* 121: 321-49
 88. Pellegrini F, Budman DR. 2005. Review: tubulin function, action of antitubulin drugs, and new drug development. *Cancer Invest* 23: 264-73
 89. Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20: 3551-67
 90. Quismorio FP, Friou GJ. 1972. Antibodies reactive with neurons in SLE patients with neuropsychiatric manifestations. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 43: 740-8

91. Rapport MM, Karpiak SE, Mahadik SP. 1979. Biological activities of antibodies injected into the brain. *Fed Proc* 38: 2391-6
92. Robbins ML, Kornguth SE, Bell CL, Kalinke T, England D, et al. 1988. Antineurofilament antibody evaluation in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. Combination with anticardiolipin antibody assay and magnetic resonance imaging. *Arthritis Rheum* 31: 623-31
93. Rosner S, Ginzler EM, Diamond HS, Weiner M, Schlesinger M, et al. 1982. A multicenter study of outcome in systemic lupus erythematosus. II. Causes of death. *Arthritis Rheum* 25: 612-7
94. Rush J, Moritz A, Lee KA, Guo A, Goss VL, et al. 2005. Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells. *Nat Biotechnol* 23: 94-101
95. Sato E, Iikuni N, Yoshio T, Minota S, Kamatani N, Okamoto H. 2006. Soluble fractalkine in the cerebrospinal fluid of patients with neuropsychiatric lupus. *Ann Rheum Dis* 65: 1257-9
96. Schneebaum AB, Singleton JD, West SG, Blodgett JK, Allen LG, et al. 1991. Association of psychiatric manifestations with antibodies to ribosomal P proteins in systemic lupus erythematosus. *Am J Med* 90: 54-62
97. Shiozawa S, Kuroki Y, Kim M, Hirohata S, Ogino T. 1992. Interferon-alpha in lupus psychosis. *Arthritis Rheum* 35: 417-22
98. Shortall E, Isenberg D, Newman SP. 1995. Factors associated with mood and mood disorders in SLE. *Lupus* 4: 272-9
99. Sibley JT, Olszynski WP, Decoteau WE, Sundaram MB. 1992. The incidence and prognosis of central nervous system disease in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 19: 47-52
100. Simon J SO. 1975. Effects of passive transfer of antibrain antibodies to a normal recipient. *Exp Neurol* 74: 523-34
101. Singer J, Denburg JA. 1990. Diagnostic criteria for neuropsychiatric systemic lupus erythematosus: the results of a consensus meeting. The Ad Hoc Neuropsychiatric Lupus Workshop Group. *J Rheumatol* 17: 1397-402
102. Stern M, Robbins ES. 1960. Psychoses in systemic lupus erythematosus. *Arch Gen Psychiatry* 3: 205-12
103. Steup-Beekman G, Steens S, van Buchem M, Huizinga T. 2007. Anti-NMDA receptor autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus and their first-degree relatives. *Lupus* 16: 329-34
104. Svenungsson E, Andersson M, Brundin L, van Vollenhoven R, Khademi M, et al. 2001. Increased levels of proinflammatory

- cytokines and nitric oxide metabolites in neuropsychiatric lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 60: 372-9
105. Swaak AJ, Nossent JC, Bronsveld W, Van Rooyen A, Nieuwenhuys EJ, et al. 1989. Systemic lupus erythematosus. I. Outcome and survival: Dutch experience with 110 patients studied prospectively. *Ann Rheum Dis* 48: 447-54
 106. Szasz J, Yaffe MB, Sternlicht H. 1993. Site-directed mutagenesis of alpha-tubulin. Reductive methylation studies of the Lys 394 region. *Biophys J* 64: 792-802
 107. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, et al. 1982. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25: 1271-7
 108. Toh B, Mackay IR. 1981. Autoantibody to a novel neuronal antigen in systemic lupus erythematosus and in normal human sera. *Clin Exp Immunol* 44: 555-9
 109. Toubi E, Khamashta MA, Panarra A, Hughes GR. 1995. Association of antiphospholipid antibodies with central nervous system disease in systemic lupus erythematosus. *Am J Med* 99: 397-401
 110. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 4350-4
 111. Trysberg E, Blennow K, Zachrisson O, Tarkowski A. 2004. Intrathecal levels of matrix metalloproteinases in systemic lupus erythematosus with central nervous system engagement. *Arthritis Res Ther* 6: R551-6
 112. Trysberg E, Carlsten H, Tarkowski A. 2000. Intrathecal cytokines in systemic lupus erythematosus with central nervous system involvement. *Lupus* 9: 498-503
 113. Trysberg E, Høglund K, Svenungsson E, Blennow K, Tarkowski A. 2004. Decreased levels of soluble amyloid beta-protein precursor and beta-amyloid protein in cerebrospinal fluid of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 6: R129-36
 114. Trysberg E, Nylén K, Rosengren LE, Tarkowski A. 2003. Neuronal and astrocytic damage in systemic lupus erythematosus patients with central nervous system involvement. *Arthritis Rheum* 48: 2881-7
 115. Tuszynski GP, Warren L. 1975. Removal of sodium dodecyl sulfate from proteins. *Anal Biochem* 67: 55-65
 116. Venter JC. 1993. Identification of new human receptor and transporter genes by high throughput cDNA (EST) sequencing. *J Pharm Pharmacol* 45 Suppl 1: 355-60

117. Visser L, Blout ER. 1971. Elastase. II. Optical properties and the effects of sodium dodecyl sulfate. *Biochemistry* 10: 743-52
118. Watanabe H, Seino T, Sato Y. 2004. Antibodies to triosephosphate isomerase in patients with neuropsychiatric lupus. *Biochem Biophys Res Commun* 321: 949-53
119. Weber K, Kuter DJ. 1971. Reversible denaturation of enzymes by sodium dodecyl sulfate. *J Biol Chem* 246: 4504-9
120. Weiner SM, Otte A, Uhl M, Brink I, Schumacher M, Peter HH. 2003. [Neuropsychiatric involvement in systemic lupus erythematosus. Part 2: diagnostic and therapy]. *Med Klin (Munich)* 98: 79-90
121. Weiner SM, Peter HH. 2002. [Neuropsychiatric involvement in systemic lupus erythematosus. Part 1: clinical presentation and pathogenesis]. *Med Klin (Munich)* 97: 730-7
122. West SG. 1994. Neuropsychiatric lupus. *Rheum Dis Clin North Am* 20: 129-58
123. Williams RC, Jr., Sugiura K, Tan EM. 2004. Antibodies to microtubule-associated protein 2 in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 50: 1239-47
124. Wilson HA, Winfield JB, Lahita RG, Koffler D. 1979. Association of IgG anti-brain antibodies with central nervous system dysfunction in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 22: 458-62
125. Yoshio T, Hirata D, Onda K, Nara H, Minota S. 2005. Antiribosomal P protein antibodies in cerebrospinal fluid are associated with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 32: 34-9
126. Zandman-Goddard G, Chapman J, Shoenfeld Y. 2007. Autoantibodies involved in neuropsychiatric SLE and antiphospholipid syndrome. *Semin Arthritis Rheum* 36: 297-315

Danksagung

In der Zeit, in der ich mit diesem Thema beschäftigt war, habe ich von sehr vielen Seiten Unterstützung erfahren, dass es schwer möglich scheint, alle Helfer an dieser Stelle einzeln aufzuführen. Allen gemeinsam gehört mein tiefempfundener Dank.

Ausdrücklich möchte ich mich bei meiner Betreuerin, Frau Prof. Dr. Reinhild Klein, bedanken. Sie gab mir die Möglichkeit dieses interessante Thema zu bearbeiten. Des weiteren stand sie mir jederzeit, ungeachtet ihrer eigenen Arbeitslast, mit Rat und Tat zur Seite und gab mir auch in den schwierigen Phasen immer neue Impulse.

Dank schulde ich auch Frau Dr. Beate Preuss, die mich bei der Herstellung des rekombinanten Alpha-Tubulins sehr unterstützt hat und mir Inputs gab, ohne die ich mich sicherlich sehr viel schwerer getan hätte.

Auch allen anderen Mitarbeitern des Immunpathologischen Labors der Medizinischen Klinik möchte ich sehr herzlich danken, sei es für die konkrete Unterstützung meiner Arbeit oder auch für das angenehme Arbeitsklima im Labor, das sich sehr positiv auf meine Laborarbeit auswirkte.

Des weiteren danke ich dem Graduiertenkolleg „Zellbiologische Mechanismen immunassoziierter Prozesse“ der Eberhard-Karls-Universität Tübingen für das gewährte Stipendium, sowie die Anregungen und Diskussionen rund um meine Arbeit.

Abschließend möchte ich mich für die einzigartige Unterstützung meiner Familie bedanken, die mir stets Kraft gab, mich motivierte, mir den Rücken frei hielt und mir immer zur Seite stand. Vielen, vielen Dank.

Lebenslauf

- Geboren am 03. Oktober 1979 in Berlin
- Schulbesuch in Tübingen; Abitur 1999 Geschwister-Scholl-Schule Tübingen
- 1999 - 2000: Zivildienst, Immunpathologisches Labor Prof. Dr. R. Klein, Medizinische Klinik der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- 2000 - 2002: Vorklinisches Studium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Physikum 2002
- 2002 - 2006: Klinisches Studium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Famulaturen in Tübingen, München und Bristol (England), 1. Staatsexamen 2003, 2. Staatsexamen 2006
- Stipendiat des Graduiertenkollegs „Zelluläre Mechanismen Immunassoziierter Prozesse“ (Leitung Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee) der Eberhard-Karls-Universität Tübingen November 2003 bis April 2004, anschließend assoziierter Kollegiat Mai 2004 bis Dezember 2005
- 2006 - 2007: Praktisches Jahr an der Technischen Universität München, 3. Staatsexamen 20.04.2007
- 07/2007 bis 01/2009: Assistenzarzt für Chirurgie, Chirurgische Klinik am Kreisklinikum Reutlingen, Leitung Prof. Dr. T. Zimmermann
- seit 01/2009: Assistenzarzt für plastische Chirurgie, Klinik für Handchirurgie, Mikrochirurgie und Rekonstruktive Brustchirurgie am Marienhospital Stuttgart, Leitung Prof. Dr. T. Schoeller