

Aus dem Institut für Klinische Neuroimmunologie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. R. Hohlfeld

LAMBERT-EATON MYASTHENIE SYNDROM

**KLINISCHE ÜBERSICHT ÜBER 25 PATIENTEN IN DEUTSCHLAND UND
REAKTIVITÄT VON 46 PATIENTENSEREN GEGEN UNTERGRUPPEN DES
SPANNUNGSABHÄNGIGEN KALZIUMKANALS**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von

LENA ARMBRUSTER

aus Heidelberg

2010

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Raimund Voltz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Florian Heinen

Priv. Doz. Dr. med. Johanna Anneser

Mitbetreuung durch die

promovierte Mitarbeiterin: Dr. med. Hannah Pellkofer

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 25.02.2010

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	1
1 EINLEITUNG	3
1.1 LEMS	3
1.1.1 Definition und Pathogenese	3
1.1.2 Epidemiologie	5
1.1.3 Klinik	5
1.1.4 Differenzierung zwischen T- und NT-LEMS	5
1.1.5 Diagnostik	6
1.1.6 Therapie	7
1.1.7 Prognose	9
1.2 Ziel der Arbeit	10
2 PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN	11
2.1 Patienten	11
2.1.1 Patientendaten zur klinischen Evaluation	11
2.1.2 Gewinnung der Patientenseren	12
2.2 Material für Westernblotting	13
2.2.1 Puffer	13
2.2.2 sonstige Materialien	14
2.3 Angewandte Methoden	17
2.3.1 Herstellung der rekombinanten Proteine	18
2.3.2 Western Blot	19
2.4 Chemikalienliste	21
2.5 Statistische Analyse	22
3 ERGEBNISSE	23
3.1 Antikörperreaktivitäten	23
3.1.1. Klinische Charakteristika der getesteten Patienten	23
3.1.2. Nachweis der unterschiedlichen Antikörperreaktivität bei T- und NT-LEMS	24
3.2 klinisch-epidemiologische Daten der NT-LEMS-Patienten	28
3.2.1 Patientenalter, Latenz bis zur Diagnosestellung	28
3.2.2 Auslöser und Verstärker	28

3.2.3 klinische Symptome	29
3.2.3.1 Paresen	29
3.2.3.2 Autonome Dysfunktion	30
3.2.3.3 Weitere Symptome	31
3.2.4 Autoimmunerkrankungen	32
3.2.5 FDG-PET-CT	32
4 DISKUSSION	34
4.1 Diskussion der Ergebnisse der Antikörperreaktivität	34
4.2 Diskussion der klinischen Daten	38
4.3. Schlussfolgerungen und Ausblick	40
5 TABELLENVERZEICHNIS	41
6 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	41
7 LITERATURVERZEICHNIS	42
8 ANHANG	49
8.1 Abkürzungen	49
8.2 Publikation	51
8.3 Lebenslauf	52
8.5 Danksagung	55

ZUSAMMENFASSUNG

Das Lambert-Eaton Myasthenie Syndrom (LEMS) ist eine Autoimmunerkrankung, die durch Autoantikörper verursacht wird, die gegen spannungsabhängige Kalzium-Kanäle vom P/Q-Typ (voltage gated calcium channels, VGCC) der präsynaptischen Membran an der neuromuskulären Synapse gerichtet sind. Bei etwa 60% der Patienten ist die Erkrankung im Sinne eines paraneoplastischen Syndroms mit einem Tumor vergesellschaftet, meist einem kleinzelligen Bronchialkarzinom. Die Ätiologie der idiopathischen Erkrankungsform hingegen ist bislang ungeklärt. Bei 95% aller Patienten mit LEMS sind Antikörper gegen den P/Q-Typ der VGCC nachweisbar, unabhängig davon, ob der Erkrankung ein Tumor zugrunde liegt. Diese Antikörper eignen sich daher nicht, Tumor- von Nicht-Tumor-Patienten zu unterscheiden. Auch sonst gibt es bislang keinen serologischen Marker, der die idiopathische Form (NT(non-tumor)-LEMS) von der paraneoplastischen Form (T(tumor)-LEMS) mit hinreichender Spezifität und Sensitivität differenziert. Dies ist insbesondere daher von Bedeutung, da in den meisten Fällen die neurologischen Symptome vor der Tumordiagnose auftreten.

Ein vorrangiges Ziel der Arbeit bestand darin, zu klären, ob T- und NT-LEMS-Patienten anhand ihrer Seroreaktivität unterschieden werden können.

Wir untersuchten daher die Seren von 21 T-LEMS und 25 NT-LEMS Patienten auf Antikörper gegen unterschiedliche Epitope der α -1A-Untereinheit des VGCC vom P/Q-Typ. Mittels Western Blot Verfahren analysierten wir die Reaktivität gegen rekombinante Proteine, die jeweils der extrazellulären S5-S6-Verbindungsregion von drei der vier Domänen der α -1A-Untereinheit des VGCC vom P/Q-Typ entsprachen. Die Domäne IV zeigte bei 9 von 24 (37,5 %) NT-LEMS Patienten eine Reaktivität, aber nur bei einem von 22 (4,6 %) T-LEMS Patienten ($p=0,011$). Die Reaktivitäten der Seren von NT-LEMS und T-LEMS Patienten gegenüber der Domänen I und III waren ähnlich (Domäne I: 8 % / 14 %; Domäne III: 46 % / 41 %). Die unterschiedliche Reaktivität der beiden Gruppen gegen die Domäne IV könnte möglicherweise zukünftig Konsequenzen für das diagnostische Vorgehen bei LEMS Patienten haben, bei denen noch kein Tumor gefunden werden konnte. Weiterhin ergeben sich damit Hinweise auf eine mögliche unterschiedliche Autoimmunpathogenese des T-LEMS und NT-LEMS.

Ein weiteres Ziel der Arbeit bestand darin, die klinischen Charakteristika bei Patienten mit idiopatischem LEMS zu analysieren, da bislang aufgrund der Seltenheit der Erkrankung größere Kollektive kaum untersucht wurden.

Hierfür wurden klinische Daten von 25 deutschen NT-LEMS Patienten hinsichtlich epidemiologisch relevanter Faktoren wie Alter bei Erkrankungsbeginn und Latenz bis zur Diagnosestellung sowie klinische Symptome, mögliche Auslöser und Komorbidität standardisiert erfragt. Bei 18 dieser Patienten konnten wir zusätzlich ein FDG-PET /CT durchführen und im Hinblick auf eine mögliche Tumorerkrankung auswerten.

1 EINLEITUNG

1.1 LEMS

1.1.1 Definition und Pathogenese

Das Lambert-Eaton Myasthenie Syndrom (LEMS) ist eine Autoimmunerkrankung, die auf einer Störung der Signalübertragung an der neuromuskulären Endplatte sowie an autonomen Neuronen beruht. Die Erstbeschreibung erfolgte durch Anderson et al. im Jahre 1953 in Form eines case reports eines Patienten mit Bronchialkarzinom, der unter einer zunehmenden proximalen Muskelschwäche, abgeschwächten Reflexen sowie verzögertem Wiedereinsetzen der suffizienten Spontanatmung nach Gabe von Succinylcholin litt. Lambert, Eaton und Rooke stellten im Jahre 1956 sechs Fälle von Patienten mit einer Fehlfunktion der neuromuskulären Übertragung vor, die mit einer Neoplasie vergesellschaftet war. Die Namensgebung bezieht sich auf Eaton und Lambert, die 1957 die klinischen und elektrophysiologischen Charakteristika dieser Erkrankung veröffentlichten.

Lang et al. zeigten 1981 erstmals, dass die Injektion der IgG-Plasmabestandteile von LEMS-Patienten bei Mäusen die mit der Erkrankung assoziierten elektrophysiologischen Veränderungen hervorrufen konnte, wodurch IgG-Autoantikörper als wahrscheinliche Ursache in Betracht kamen.

Diese konnten inzwischen identifiziert und genauer klassifiziert werden: In den meisten Fällen ist die Störung der Signalübermittlung durch Autoantikörper gegen präsynaptische spannungsgesteuerte Kalziumkanäle (voltage-gated calcium channels VGCC) vom P/Q-Typ bedingt (Lennon et al., 1995; Leys et al., 1991; Sher et al., 1989; Vincent et al., 1989). Potentielle antigene Strukturen wurden bereits im Bereich der alpha1-Untereinheit lokalisiert (Iwasa et al., 2000; Parsons und Kwok, 2002; Takamori et al., 1997), die für die Funktion des spannungsgesteuerten Kalziumkanals (VGCC, voltage-gated calcium channel) essentiell ist und aus den Domänen I-IV mit jeweils 6 transmembranären α -helikalen Segmenten (S1-S6) besteht (Varadi et al., 1995).

LEMS tritt sowohl bei Patienten mit Tumorerkrankungen, meist bei kleinzelligem Bronchialkarzinom im Sinne eines paraneoplastischen Syndroms, aber auch idiopathisch bei Patienten ohne Tumor auf.

Bei Patienten mit paraneoplastischer Genese des LEMS wird die Antikörperbildung durch ektop auf den Tumorzellen präsentierte Kalziumkanäle verursacht.

1.1.1.1 Signalübertragung an der Neuromuskulären Endplatte

Die neuromuskuläre Endplatte besteht aus einer dem Neuron und einer dem Muskel zugewandten Seite. Ein ankommendes elektrisches Signal führt zur Öffnung der präsynaptisch lokalisierten Spannungsgesteuerten Kalziumkanäle (VGCC), der Zielstruktur der Antikörper des LEMS. Der Kalziumeinstrom bewirkt die Freisetzung von Acetylcholin-Quanten in den neuromuskulären Spalt, die teils an die postsynaptischen Acetylcholinrezeptoren binden, teils von der ebenfalls postsynaptisch lokalisierten Acetylcholinesterase gespalten werden. Die Bindung zweier Acetylcholinmoleküle an einen Acetylcholinrezeptor bewirkt durch Öffnung des assoziierten Kanals einen Kationeneinstrom und somit eine Depolarisation. Das Erreichen des Schwellenpotentials öffnet die spannungsgesteuerten postsynaptischen Natriumkanäle, die eine Fortleitung des elektrischen Signals und damit eine Muskelkontraktion bewirken.

Beim LEMS verursachen die Anti-VGCC-Antikörper eine partielle Blockade der präsynaptischen Kalziumkanäle, zusätzlich wird die Anzahl der Kalziumkanäle vermindert. Durch die Antikörperbindung vermindert sich effektiv die Menge von Acetylcholin-Quanten, die pro ankommendem elektrischem Signal in den synaptischen Spalt freigesetzt wird (Fukunaga et al., 1983; Lambert et al., 1988). Klinisch äußert sich dies in einer Muskelschwäche und autonomen Funktionsstörungen.

1.1.2 Epidemiologie

Bei etwa 60% der Patienten mit LEMS liegt ein Tumor zugrunde (O'Neill et al., 1988; Wirtz et al., 2002).

In einer prospektiven Studie an 150 Patienten mit SCLC zeigten 3% der Patienten Symptome eines LEMS (Elrington et al., 1991) im Sinne einer Immunreaktion auf die als fremd erkannten Tumorzellen (Darnell et al., 2003).

LEMS ist eine seltene Erkrankung, allerdings fehlen systematische epidemiologische Daten bezüglich der Häufigkeit.

1.1.3 Klinik

Die klinische Symptomatik der Patienten besteht hauptsächlich in einer proximal- und beinbetonten Muskelschwäche (O'Neill et al., 1988). Weitere Symptome sind Ptose, Doppelbilder, Kauschwäche, Dysarthrie und Dysphagie, allerdings insgesamt seltener und weniger ausgeprägt als bei Patienten mit Myasthenia gravis.

Zusätzlich klagen etwa 50% der Patienten über eine autonome Dysfunktion im Sinne von Mundtrockenheit, Obstipation, vermindertem Schwitzen, eingeschränkter Blasenkontrolle und Impotenz (Wirtz et al., 2002).

Etwas seltenere Symptome sind Parästhesien und Muskelschmerzen (Wirtz PW et al., 2002) sowie eine Beeinträchtigung der Atemmuskulatur.

1.1.4 Differenzierung zwischen T- und NT-LEMS

Vergleiche zwischen den Patientenkollektiven mit paraneoplastische und idiopathischer Form ergaben Unterschiede der Raucheranamnese, der HLA-Typisierung, insbesondere HLA-DR3-B8 (Parsons et al., 2000, Wirtz et al., 2005a) und der Häufigkeit des Vorkommens von anti-glialen nukleären Antikörpern (AGNA/anti-SOX-Ak) (Graus et al., 2005). Insbesondere der HLA 8.1-Haplotyp ist mit der NT-LEMS-Form assoziiert (Wirtz et al., 2005a) und bezeichnet die Kombination aus HLA-B8,

HLA-DR3 und HLA-A1. Ein ausreichend sensitives und spezifisches Unterscheidungsmerkmal wurde bislang nicht gefunden.

Eine positive Raucheranamnese, männliches Geschlecht und höheres Alter sind per se Risikofaktoren für das Auftreten eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms und dadurch im T-LEMS-Patientenkollektiv häufiger. AGNA sind ebenfalls mit dem Auftreten eines SCLC assoziiert, jedoch bei Patienten mit LEMS und SCLC häufiger anzutreffen als bei Patienten mit SCLC ohne LEMS, sodass möglicherweise eine Verbindung zwischen der Bildung von Anti-VGCC- und anti-SOX (AGNA) bei Vorliegen eines SCLC besteht (Graus et al., 2005). Eine klinische Relevanz bezüglich eines den bildgebenden Methoden überlegenen Screening-Verfahrens ergibt sich jedoch aus dem AGNA-Nachweis momentan noch nicht.

Bei Patienten mit NT-LEMS sowie ihren Familienangehörigen sind häufiger als in der Normalbevölkerung weitere Autoimmunerkrankungen nachweisbar (O'Neill et al., 1988, Tim et al., 2000; Wirtz PW et al., 2004).

1.1.5 Diagnostik

Die Diagnose eines Lambert-Eaton Myasthenie Syndroms kann anhand spezifischer klinischer, elektrophysiologischer und serologischer Kriterien gestellt werden (O'Neill et al., 1988):

Bei der elektrophysiologischen Untersuchung zeigt sich in Ruhe ein reduziertes Muskelsummenaktionspotential. Nach maximaler Willkürinnervation oder hochfrequenter (20Hz) Stimulation nimmt die Amplitude deutlich zu (Inkrement). Der bisherige Goldstandard lag bei einem Inkrement von 100% oder mehr (AAEM Quality Assurance Committee, 2001; O'Neill et al., 1988), eine Zunahme von 60% scheint aber eine ausreichende Differenzierung gegenüber der Myasthenia gravis zu erlauben (Oh et al., 2005).

Im Serum der Patienten vorhandene Antikörper gegen Kalziumkanäle vom P/Q-Typ sind durch ein Radioimmunassay unter Verwendung von ¹²⁵I- ω -Conotoxin MVIIC nachweisbar.

In Anbetracht der möglichen paraneoplastischen Genese muss bei Diagnosestellung auf ursächliche Tumoren gescreent werden. Aufgrund der häufigen Assoziation mit SCLC wird folgendes Schema von Titulaer et al. empfohlen:

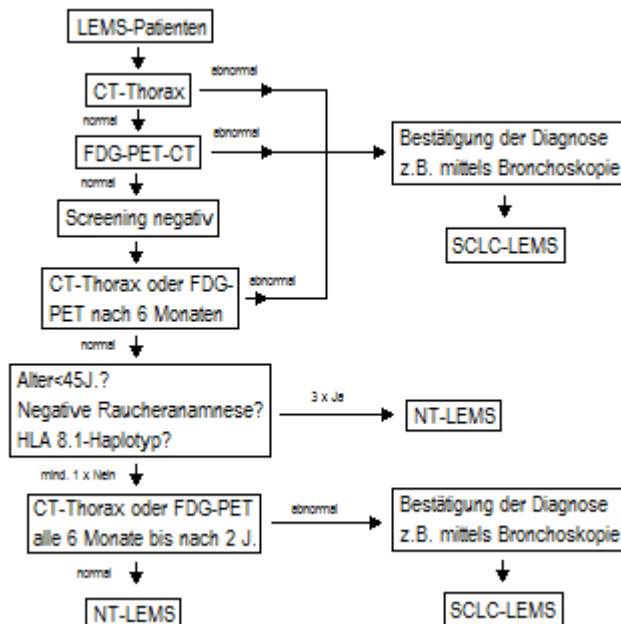


Abbildung 1

Algorithmus zum diagnostischen Vorgehen bei LEMS-Erstdiagnose modifiziert nach Titulaer et al., 2008a

1.1.6 Therapie

Die therapeutischen Optionen bei der Behandlung des LEMS bestehen im Wesentlichen aus einer onkologischen Therapie des zugrunde liegenden Tumors bei der paraneoplastischen Form bzw. immunsuppressiver Therapie bei der idiopathischen Form. Unabhängig von der Ätiologie sollte eine symptomatische Therapie erfolgen. Eine mögliche Vorgehensweise ist im folgenden Therapiealgorithmus (s. Abb. 2) dargestellt.

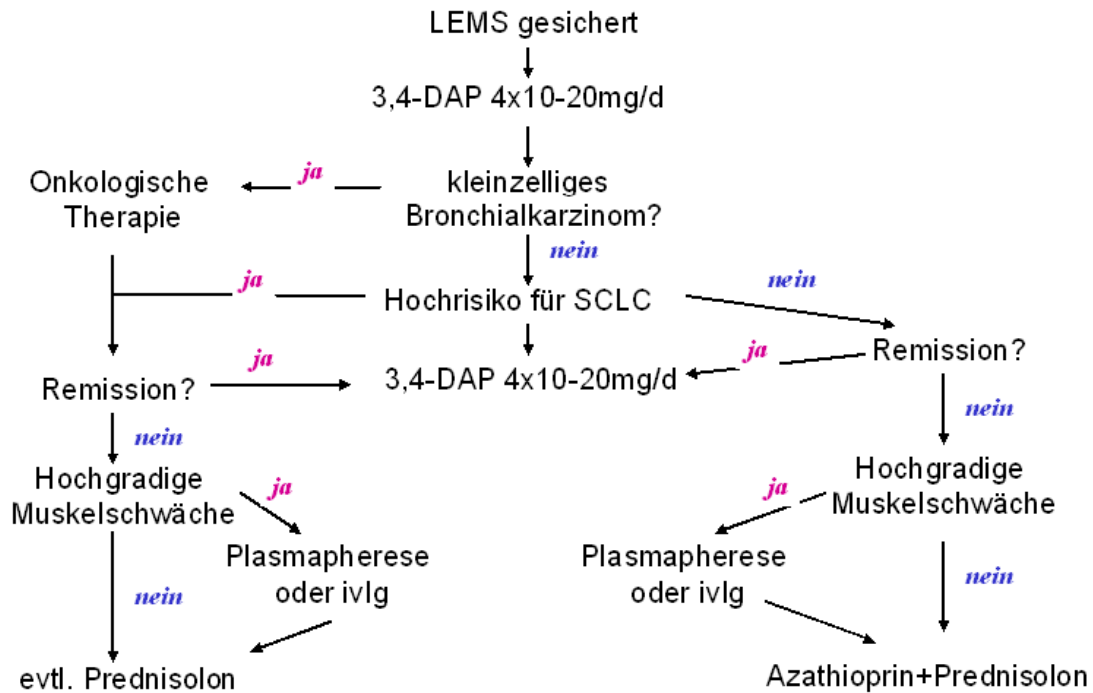


Abbildung 2

Therapiealgorithmus zu Behandlung des LEMS modifiziert nach Newsom-Davis, 2004

Der wichtigste therapeutische Ansatz beim Auftreten von LEMS besteht in einer möglichst raschen und effektiven Tumorsuche, insbesondere da die Muskelschwäche der Tumordiagnose um Jahre vorausgehen kann (O'Neill et al., 1988). Bei der paraneoplastischen Form ist die rasche und suffiziente Behandlung des Tumors wichtigste Grundsäule der Therapie, nicht selten bessern sich darunter die neurologischen Symptome sehr deutlich, manche Patienten bedürfen sogar keiner weiteren Therapie (Berglund et al., 1982; Chalk et al., 1990; Jenkyn et al., 1980).

Bei ausgeprägter klinischer Beeinträchtigung wird in der Regel eine Plasmapherese oder eine Therapie mit intravenösen Immunglobulinen durchgeführt, jedoch sind hier die Therapieerfolge nicht dauerhaft (Bain et al., 1996; Bird, 1992; Motomura et al., 2000; Rich et al., 1997). Die längerfristige immunsuppressive Behandlung erfolgt meist mit Prednisolon und Azathioprin (Newsom-Davis und Murray, 1984).

Die symptomatische Therapie mit 3,4-Diaminopyridin kann die Muskelschwäche durch erhöhte Verfügbarkeit von Acetylcholin an der neuromuskulären Endplatte verbessern (Mc Evoy et al., 1989; Sanders et al., 2000).

1.1.7 Prognose

Im Falle einer paraneoplastischen Genese korreliert die Prognose der Patienten weitestgehend mit derjenigen der Tumorerkrankung, das Fortschreiten der Symptomatik des LEMS ist gegenüber dem bei der idiopathischen Form jedoch akzeleriert (Titulaer et al., 2008b; Wirtz et al., 2005c). Allerdings konnte in einer prospektiv ausgerichteten Studie gezeigt werden, dass bei SCLC-Patienten, bei denen sowohl Anti-VGCC-Antikörper als auch eine klinische Manifestation des LEMS festgestellt wurde, eine signifikant höhere Lebenserwartung als bei Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom ohne LEMS besteht (Maddison und Lang 2008; Wirtz et al., 2005b).

Die idiopathische Form des LEMS zeigt einen sehr variablen Verlauf, der von einer langfristigen klinischen Remission bis zu einer dauerhaften schweren körperlichen Beeinträchtigung mit erheblicher Einschränkung der Lebensqualität reichen kann. Der einzige prädiktive Faktor für eine dauerhafte klinische Remission mit oder im Idealfall auch ohne immunsuppressive Medikation scheint ein guter klinischer Zustand des Patienten bei Diagnosestellung vor Beginn der Behandlung zu sein (Maddison et al., 2001).

1.2 Ziel der Arbeit

Da das Lambert-Eaton Myasthenie Syndrom bei mehr als der Hälfte der Patienten durch eine Tumorerkrankung ausgelöst wird, hat die Zuordnung hinsichtlich paraneoplastischer bzw. idiopathischer Genese gravierende prognostische und therapeutische Konsequenzen. Somit muss der Erstdiagnose des LEMS eine zeitnahe und eingehende Tumorsuche folgen. Insbesondere bei Patienten, bei denen Hinweise auf die paraneoplastische Form des LEMS bestehen, ist die Indikation zur intensiven apparativen Tumorsuche, beispielsweise mithilfe eines FDG-PET gegeben.

Die häufig mehrfach bis zur Diagnosesicherung erforderlichen teils invasiven Untersuchungen stellen für den Patienten eine Belastung dar und sind teilweise auch mit nicht unerheblichen Kosten verbunden. Darüber hinaus sind die Patienten durch die Möglichkeit einer zugrunde liegenden Tumorerkrankung psychisch belastet, insbesondere da die Unsicherheit, ob ein Tumor vorliegt oder nicht häufig über mehrere Jahre besteht. Eine raschere, verlässlichere Zuordnung hinsichtlich T- oder NT-LEMS wäre daher von erheblicher Konsequenz für die Patienten.

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit bestand darin, zu prüfen, ob Tumor- und Nicht-Tumor Patienten sich in der Reaktivität ihrer Antikörper gegen die extrazellulären Domänen des präsynaptischen Kalziumkanals unterscheiden. Mithilfe des Western-Blot Verfahrens untersuchten wir die Antikörperreaktivitäten von Patientenserum gegen drei der vier extrazellulären Domänen.

Ein weiteres Ziel war in Anbetracht der Seltenheit der Erkrankung die Evaluation klinischer Daten von Patienten mit idiopathischem LEMS, insbesondere bezüglich epidemiologisch relevanter Faktoren, klinischer Merkmale, Autoimmunerkrankungen und Autoantikörper. Diese Daten wurden mit bisherigen Studiendaten verglichen. Bei 18 dieser 25 Patienten konnten wir zusätzlich ein FDG-PET /CT durchführen und im Hinblick auf eine mögliche Tumorerkrankung auswerten.

2 PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN

2.1 Patienten

2.1.1 Patientendaten zur klinischen Evaluation

Mit Hilfe der Deutschen Myasthenie Gesellschaft erhielten wir klinische Daten von 38 LEMS-Patienten anhand eines standardisierten Fragebogens. In 27 dieser Fälle konnte die Diagnose durch standardisierte elektrophysiologische und serologische Diagnostik (O'Neill JH et al., 1988) in unserer Klinik oder auswärts gesichert werden. Nur Patienten mit einem eindeutig diagnostizierten LEMS wurden in die Studie eingeschlossen. 4 der 27 Patienten hatten einen histologisch gesicherten Tumor, je zwei davon ein kleinzelliges Bronchialkarzinom sowie je ein Patient ein Ösophaguskarzinom und ein Zervixkarzinom, wobei es sich bei den beiden letztgenannten Patienten aus dem zeitlichen Verlauf und dem histologischen Befund am ehesten um eine Koinzidenz ohne ursächlichen Zusammenhang handelt. Bei dem Patienten mit Ösophaguskarzinom traten erste Symptome in Form einer Muskelschwäche zehn Jahre vor Diagnose des Ösophaguskarzinoms auf. Insbesondere waren die von Graus et al. 2004 geforderten Kriterien nicht erfüllt: Tumoraufreten nicht innerhalb von 5 Jahren vor oder nach Auftreten der neurologischen Symptome, keine Verbesserung der Symptome nach Tumortherapie. Bei dem Zervixkarzinom handelte es sich laut histopathologischem Befund um ein Borderline-Kystom mit nur wenigen Zeichen der Malignität, sodass obwohl dieser Tumor etwa ein Jahr nach Beginn der LEMS-Symptomatik diagnostiziert wurde ein ursächlicher Zusammenhang sehr unwahrscheinlich erscheint. Auch in diesem Fall besserten sich die LEMS-Symptome nach Entfernung des Tumors nicht.

Bei 23 Patienten wurde innerhalb eines Zeitraums von 2 bis zu 17 Jahren nach der Diagnose kein Tumor festgestellt. Somit wurde bei 25 Patienten die Diagnose NT-LEMS gestellt und deren klinische und epidemiologische Daten evaluiert.

2.1.2 Gewinnung der Patientenserum

Über die Deutsche Myasthenie Gesellschaft kontaktierten wir LEMS-Patienten und erhielten 18 Serumproben, wobei 16 der Patienten keinen oder keinen relevanten Tumor hatten und zwei ein kleinzelliges Bronchiakarzinom.

Zusätzlich wurden uns 32 Serumproben von 28 LEMS-Patienten von Prof. Verschuurens Labor in Leiden freundlicherweise zur Verfügung gestellt, davon 19 Patienten mit und 9 ohne Tumor. Von einem Patienten mit sowie von 3 Patienten ohne Tumor erhielten wir zusätzliche Serumproben, die zu einem späteren Zeitpunkt entnommen wurden.

Insgesamt konnten wir Serum von 46 Patienten mit gesichertem LEMS untersuchen, davon 21 (45,7%) mit einer histologisch gesicherten Tumorerkrankung und 25 (54,3%) ohne relevanten Tumor, sowie weiterhin 9 gesunden Kontrollpersonen. Keiner der Patienten unterzog sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme einer Chemotherapie, jedoch erhielten einige eine immunsuppressive Therapie.

2.2 Material für Westernblotting

2.2.1 Puffer

Laufpuffer

3g/l Tris

14,4 /l Glycin

1g/l SDS

10x TBS

60,7g/l Tris

87g/l NaCl

pH 7,4

10x TBST

60,7g/l Tris

87g/l NaCl

pH 7,4

dazu 1ml/l Tween

10x Lämmli-Puffer

500ml/l Glycerin

75g/l Tris

150g/l SDS

100ml/l β -Mercaptoethanol

10g/l Bromphenolblau

Blot-Puffer

3,03g/l Tris

14,4g/l Glycin

200ml/l Methanol

1g/l SDS

Milchpulverpuffer

3% Milchpulver in TBS entspricht 30 mg Milchpulver pro 1 ml TBS

5% Milchpulver in TBS entspricht 50 mg Milchpulver pro 1 ml TBS

Milchpulverpuffer aufkochen und abkühlen lassen.

2.2.2 sonstige Materialien

Gele

Testung der Patientenserum

Ready-Gel precast for Polyacrylamide Electrophoresis

2D/Prepcomb 450µl von BIORAD

Konzentration 18%

Testung der gesunden Probanden

Ready-Gel precast for Polyacrylamide Electrophoresis

2D/Prepcomb 450µl von BIORAD

Konzentration Gradient 10-20%

Marker

See Blue Plus 2

INVITROGEN

Erstantikörper der Positivkontrolle

His-Probe rabbit polyclonal IgG 200µg/ml

Santa Cruz Biotechnology

Zweitantikörper der Positivkontrolle

goat-anti-rabbit IgG-HRP

mouse/human adsorbed 200µg/0,5ml

Santa Cruz Biotechnology

Zweitantikörper für Patientenserum

anti-human IgG, Peroxidase Conjugate developed in goat

SIGMA

Blot-Paper

Extra Thick Blot Paper Mini blot size

BIORAD

Blot-Membran

Hybond-C Extra

Nitrocellulose, supported; 0,45 Micron; 30cm x 3m roll

Amersham Bioscience

Entwickler

ECL Western Blotting Detection Reagents

Amersham Biosciences

Filme

Hyperfilm ECL

High performance chemiluminescence film

Amersham Biosciences

2.3 Angewandte Methoden

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit bestand darin, zu prüfen, ob Tumor- und Nicht-Tumor Patienten sich in der Reaktivität ihrer Antikörper gegen die extrazellulären Domänen des präsynaptischen Kalziumkanals unterscheiden.

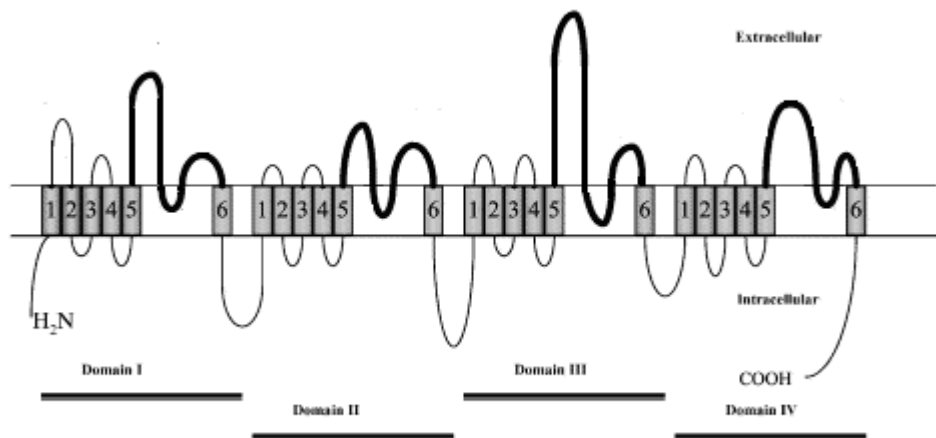


Abbildung 3

Aufbau der α_1 -Untereinheit des präsynaptischen spannungsgesteuerten Ca-Kanals modifiziert nach Takamori M et al. 1999

Dieser besteht aus vier strukturell ähnlichen Domänen (I-IV), wobei jede dieser Domänen in 6 transmembranäre Segmente (S1-6) gegliedert ist, mit extrazellulären Verbindungsregionen der Segmente 5 und 6 (S5-6 linker region, in Abb. 3 markiert).

Verschiedene Abschnitte der α_1 -Untereinheit des P/Q-Typ-Kalziumkanals (VGCC) können möglicherweise Epitope für die Antikörperbindung darstellen (Iwasa et al., 2000; Parsons und Kwok, 2002; Takamori et al., 1997). Die α_1 -Untereinheit des VGCC, die für die intakte Funktion des Kalziumkanals entscheidend ist, besteht aus vier Domänen (I-IV), die je sechs transmembranäre Segmente (S1-S6) in Form einer α -Helix enthalten (Varadi G et al., 1995). Um nach immunodominanten Abschnitten innerhalb der molekularen Struktur des VGCC suchen zu können exprimierten wir rekombinant die extrazellulären S5-S6 Verbindungssegmente von jeder der vier Domänen unter der Annahme, dass durch die extrazelluläre Lokalisation diese Regionen zirkulierenden Antikörpern zugänglich sein können (s. Abb. 3). Wir untersuchten mithilfe des Western-Blot Verfahrens die Antikörperreaktivitäten von

Patientenseren gegen drei der vier extrazellulären Domänen des präsynaptischen Kalziumkanals, im Hinblick auf Unterschiede zwischen paraneoplastischem und idiopathischem LEMS.

2.3.1 Herstellung der rekombinanten Proteine

Die rekombinanten Proteine wurden freundlicherweise von Frau Dr. H. Pellkofer (LMU) zur Verfügung gestellt und nach der folgenden Methode synthetisiert.

Die extrazellulären S5-S6 Verbindungssegmente jeder der vier Domänen der alpha1A-Untereinheit des VGCC (GeneBank access number NM_000068.2, gi: 13386499) wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auf humaner cerebellärer cDNA amplifiziert. Folgende Primer wurden dafür verwendet: sense I (5'-ATG GGA AAA TTT CAT ACC ACC TGC-3') und antisense I (5'-CCA AGT GTT CCC TGA GGC ATC G-3'), sense II (5'-GGC GGC CAG TTT AAT TTC GAT GAA GG-3') und antisense II (5'-CAC CAT GCC GCC CTG CAC GCC -3'), sense III (5'-CTC TTC AAG GGG AAA TTC TTC CAC -3') und antisense III (5'-ATG CAG GTG TTT GGT AAC ATT GG -3'), sense IV (5'-ATG CAG GTG TTT GGT AAC ATT GG -3') und antisense IV (5'-ACA CTC TCG AGT CAG GAT GCC -3'). Diese enthielten die passenden Restriktionssequenzen für den Klonierungsvektor pET 30a+ (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands). Die PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese analysiert, mit einem Extraktionskit (Quiagen) aufgereinigt und nach Verdau über die Restriktionsenzyme NdeI und XhoI für die Proteine I, II und III sowie NdeI und NotI für Protein IV in die multiple cloning site des pET 30a+ Vektors kloniert. Die Sequenz sowie der korrekte Leserahmen innerhalb des Vektors wurden durch Sequenzierung (Sequiseive, Vaterstetten, Germany) bestätigt. Die jeweiligen rekombinanten Proteine wurden im Escherichia coli-Stamm DH5 α Fiq exprimiert und über ihren C-terminalen Hexahistidin-Tag durch Metall-Chelat-Chromatographie (Brehm et al., 1999) isoliert. Das Protein wurde mit Hilfe eines Imidazolgradienten von der Säule eluiert und gegen PBS dialysiert. Die erfolgreiche Expression des Proteins wurde durch SDS-PAGE und Detektion im Western Blot unter Verwendung eines Antikörpers gegen Polyhistidin (Santa Cruz Biotechnology) bestätigt. Leider konnten trotz korrekter Klonierung keine ausreichenden Mengen des Proteins II exprimiert werden, somit wurden die Reaktivitäten gegen Proteine I, III und IV getestet.

2.3.2 Western Blot

Das Western Blot Verfahren ermöglicht es, Antikörper gegen bestimmte Proteine nachzuweisen. Die einzelnen Schritte werden im Folgenden detailliert erläutert. Die Western Blot Analyse wurde für jede Patienten-Protein-Kombination mindestens zweimal durchgeführt.

Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine im SDS-Gel werden diese mit Hilfe eines senkrecht angelegten elektrischen Feldes bei 25V für 30 min im semi-dry-Verfahren auf eine aus Nitrocellulose bestehende Blot-Membran übertragen. Bei bekannter Proteingröße gestattet der Marker die Zuordnung der Banden.

Durch Blocken mit 5% Milchpulver in TBS für 1½ Stunden werden unspezifische freie Bindungsstellen auf der Blot-Membran besetzt.

Nach Waschen in TBST Inkubation von Membranstreifen mit Patientenserum (Verdünnung 1:500 in 3% Milchpulver in TBS) bzw. zur Positivkontrolle einen Streifen mit His-Probe (rabbit polyclonal IgG 200µg/ml, Santa Cruz Biotechnology; Verdünnung 1:250 in 3% Milchpulver in TBS) für 1½ Stunden. Hierbei binden sich, falls vorhanden, die Antikörper im Patientenserum an das jeweilige Protein, bzw. der Anti-His-Antikörper, mit dem der Streifen für die Positivkontrolle inkubiert wird, mit dem Poly-Histidin-Tag des Proteins.

Nach erneutem Waschen in TBST Inkubation der Membranstreifen mit anti-human IgG (developed in goat, Sigma; Verdünnung 1:5000 in 3% Milchpulver in TBS) bzw. der Positivkontrolle mit goat-anti-rabbit IgG (mouse/human adsorbed, 200 µg/0,5ml, Santa Cruz Biotechnology; Verdünnung 1:1000 in 3% Milchpulver in TBS) für 45 min, beide Zweitantikörper sind mit Horseradish(Meerrettich)-Peroxidase (HRP) konjugiert.

Nicht gebundene Zweitantikörper werden nun durch erneutes Waschen mit TBST entfernt.

Inkubation der Streifen für 1 min in je 1 ml der beiden Komponenten des Entwicklers (ECL Western Blotting Detection Reagents, Amersham Biosciences). Anschließend wird die durch die Peroxidase katalysierte Chemilumineszenzreaktion mittels Röntgenfilm detektiert. Die Belichtungszeiten betragen je Membran 10 Sekunden, 30 Sekunden, 1 Minute und 5 Minuten.

Anhand dieses Testverfahrens werden belichtete Röntgenfilme gewonnen, die jeweils eine Spur für jeden getesteten Patienten, eine pro Marker sowie eine mit der Bande der Positivkontrolle aufweisen. Anhand eines Abgleichs mit der Positivkontrolle sowie eines weiteren Vergleichs mit der Höhe des Markers kann jede eventuell vorhandene Bande als positiv oder negativ gewertet werden, also als An- oder Abwesenheit von spezifischen Antikörpern gegen das jeweilige Protein im Serum des Patienten.

2.4 Chemikalienliste

Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Riedl-deHaën, Seelze
β -Mercaptoethanol	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Methanol	Riedl-deHaën, Seelze
Milchpulver	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Polyoxyethylensorbitanmonolaureat (Tween)	Sigma, Deisenhofen
Sodiumlaurylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Riedl-deHaën, Seelze

2.5 Statistische Analyse

Die Reaktivität der Seren von gesunden Kontrollen sowie LEMS-Patienten mit und ohne Tumorerkrankung gegenüber der extrazellulären Domänen I, III und IV des VGCC wurden mit Hilfe des chi-quadrat Tests verglichen. Da die Aussagekraft dieses Tests bei niedrigen Patientenzahlen gering ist, wurde zusätzlich der nicht-parametrische Fisher's exact Test durchgeführt, um die Reaktivitäten der LEMS-Patienten mit und ohne Tumor sowie das Gesamtkollektiv der LEMS-Patienten mit den gesunden Probanden zu vergleichen.

3 ERGEBNISSE

3.1 Antikörperreaktivitäten

3.1.1. Klinische Charakteristika der getesteten Patienten

Es wurden insgesamt Seren von 46 LEMS-Patienten, darunter 21 mit histologisch gesichertem Tumor und 25 ohne relevante Tumorerkrankung, sowie als Negativkontrolle von 9 gesunden Probanden auf ihre Reaktivität gegenüber der extrazellulären S5-6 Verbindungsproteine der Domänen I, III und IV der α 1-Untereinheit des spannungsgesteuerten Kalziumkanals (VGCC) getestet.

Der histologisch gesicherte Tumor war in allen Fällen ein kleinzelliges Bronchialkarzinom.

Das mediane Alter war 54 Jahre im NT-Kollektiv, 57 Jahre bei den T-LEMS Patienten. Die Mehrzahl der NT-Patienten war weiblich (62%), 46% mit Raucheranamnese. Bei den T-LEMS Patienten waren Männer prädominant (80%), 95% gaben Nikotinabusus an.

Autoimmunerkrankungen waren bei den NT-LEMS Patienten häufiger: 27% vs. 15%.

Median der Krankheitsdauer bis zur Blutentnahme war bei den NT-Patienten 40 Monate, bei den Tumorpatienten 10 Monate.

Zum Zeitpunkt der Blutentnahme wurden 46% der NT-Patienten immunsuppressiv behandelt, 30% der Patienten mit T-LEMS bekamen eine immunsuppressive oder Chemotherapie.

3.1.2. Nachweis der unterschiedlichen Antikörperreaktivität bei T- und NT-LEMS

Die Reaktivitäten der Seren gegen die unterschiedlichen Proteine wurde mit Hilfe des Western Blot Verfahrens untersucht. Die Zeichen + und – zeigen die Reaktivität an, die Positivkontrolle (PC) wurde zur technischen Kontrolle bei jedem Ansatz durchgeführt. Exemplarisch sind im Folgenden drei Abbildungen zu sehen. Die Bahnen wurden mit Patienten- bzw. Probandenseren inkubiert, am rechten Rand befindet sich die Positivkontrolle.

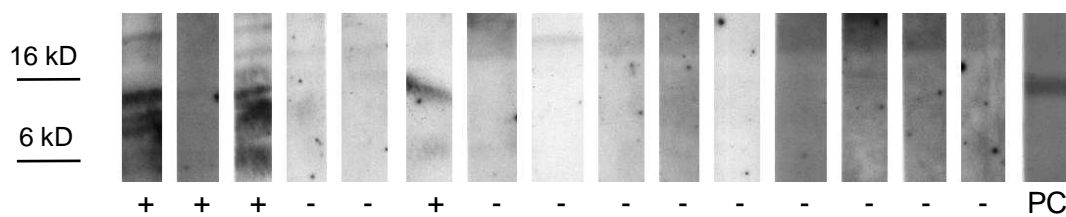


Abbildung 4

Reaktivität von Patientenseren gegen die S5-S6 Verbindungsregion von Domäne IV

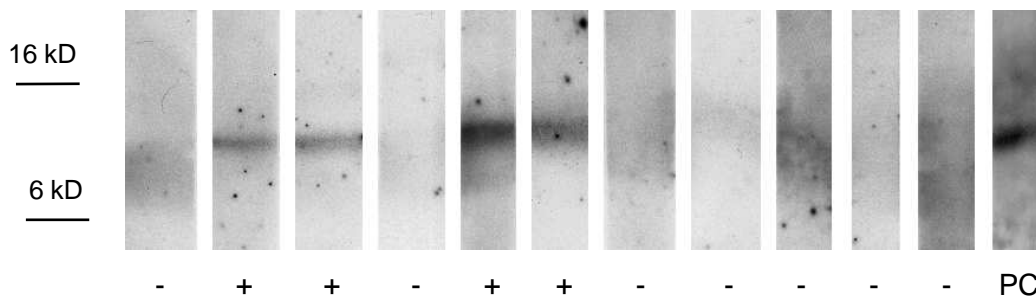


Abbildung 5

Reaktivität von Patientenseren gegen die S5-S6 Verbindungsregion von Domäne III

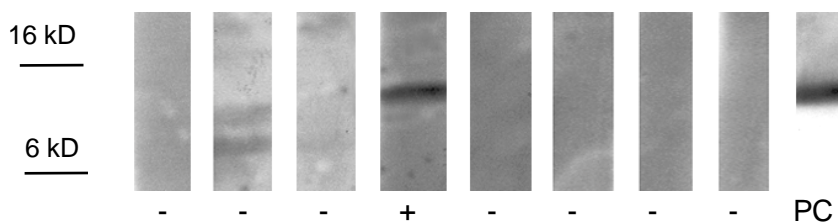


Abbildung 6

Reaktivität von Probandenseren gegen die S5-S6 Verbindungsregion von Domäne IV

Da die verwendeten Proteine mit etwa 10 kD sehr klein sind, war das Testverfahren störungsanfällig. Es wurde stets auf eine qualitativ ausreichende Positivkontrolle geachtet und die Blots mindestens zweimal wiederholt. Bei sicherer Beurteilbarkeit der Blots wurde die zweimalige positive Testung eines Serums als Antikörpernachweis gewertet. Jedes Serum wurde also mindestens zweimal auf Antikörper gegen jedes der drei Proteine getestet.

Von den 21 LEMS-Patienten mit nachgewiesenem Tumor reagierten 3 mit Domäne I, 9 mit Domäne III und einer auf Domäne IV. Von diesen Patienten wurden zwei auf Antikörper gegen Domäne I und III positiv getestet sowie ein Patient auf alle drei Domänen. Insgesamt wurden weiterhin 13 dieser Patienten negativ getestet, d.h. sie hatten gegen keine der drei Domänen Antikörper. Einer dieser negativ getesteten Patienten zeigte allerdings im zeitlichen Verlauf eine Reaktivität gegen alle drei Proteine.

Die 25 getesteten LEMS-Patienten ohne Tumor zeigten folgende Reaktivitäten: 2 Seren hatten Antikörper gegen Domäne I, 11 gegen Domäne III sowie 9 gegen Domäne IV. 6 dieser Patienten reagierten gleichzeitig mit zwei Domänen, davon 5 mit Domäne III und IV sowie einer mit I und III. Außerdem wies ein Patient Antikörper gegen alle drei Domänen auf, ein weiterer, der zuvor nur mit Domäne IV reagierte, hatte im zeitlichen Verlauf ebenfalls Antikörper gegen alle drei Proteine.

Bei der Evaluation der 9 gesunden Probanden erwiesen sich bis auf eine Reaktion mit der Domäne IV sämtliche Tests als negativ, d.h. es gab keinerlei Antikörper gegen die Domänen I und III.

Ein Überblick über die Ergebnisse ist aus der Abbildung 7 sowie der Tabelle 1 ersichtlich.

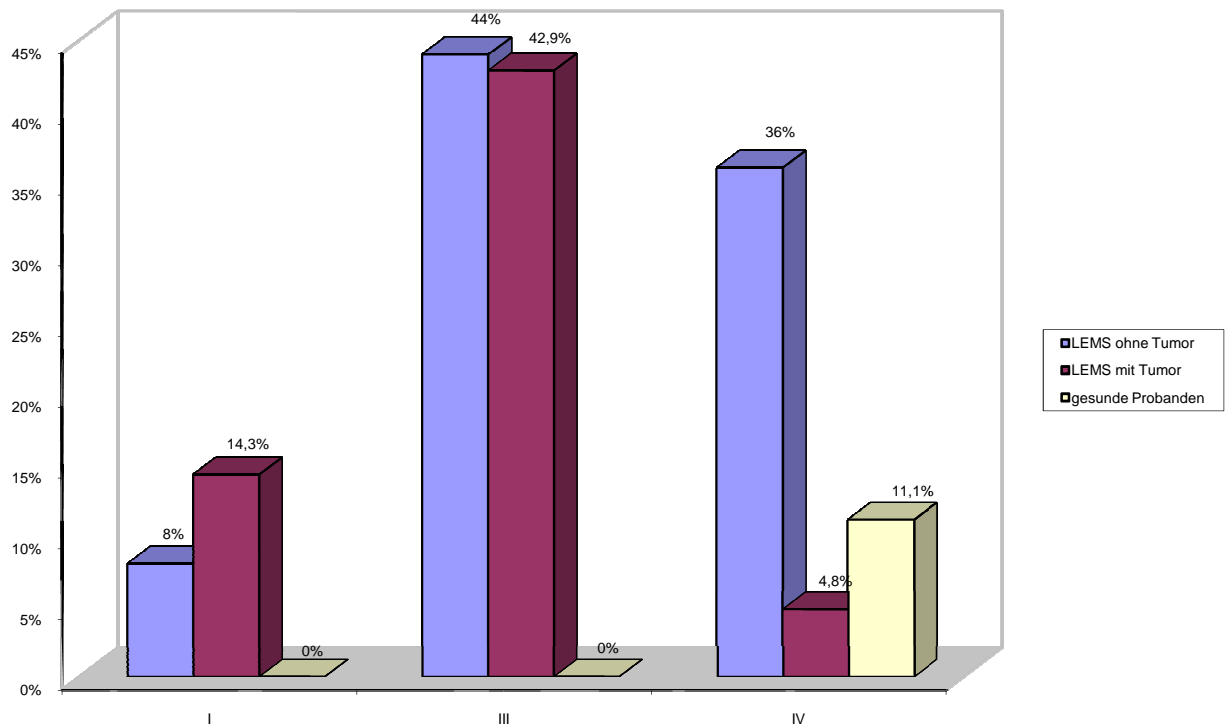


Abbildung 7

Reaktivitäten der Patienten- bzw. Probandenseren gegenüber Domäne I, III und IV

Die Seren von 22 LEMS-Patienten mit Tumor, 24 LEMS-Patienten ohne Tumor sowie 10 gesunden Probanden wurden analysiert.

	I	III	IV	zweifache Reaktivität	dreifache Reaktivität
T-LEMS	3/21 14,29%	9/21 42,86%	1/21 4,76%	2/21 9,52%	1/21 4,76%
NT-LEMS	2/25 8%	11/25 44%	9/25 36%	6/25 24%	1/25 4%
gesunde Probanden	0/9 0%	0/9 0%	1/9 11,11%	0/9 0%	0/9 0%

Tabelle 1

Reaktivitäten der Patienten- bzw. Probandenseren gegenüber Domäne I, III und IV

Zusätzlich zu den Angaben in Abb. 1 wird ersichtlich, wie viele Patienten bzw. Probanden Antikörperreaktivität auf mehr als ein Protein zeigten.

Die Ergebnisse zeigen einen statistisch signifikanten Unterschied im Hinblick auf die Reaktivitäten gegen Domäne IV. Patienten ohne Tumor hatten deutlich häufiger Antikörper gegen dieses Protein als Patienten mit Tumor ($p=0.011$ im Fisher's exact Test).

Der Nachweis von Antikörpern gegen Domänen I und III ließ keinen signifikanten Unterschied zwischen Patienten mit bzw. ohne Tumor erkennen.

3.2 klinisch-epidemiologische Daten der NT-LEMS-Patienten

3.2.1 Patientenalter, Latenz bis zur Diagnosestellung

Zum Zeitpunkt der Datenerhebung waren die Patienten zwischen 22 und 79 Jahre alt, im Mittel 55 Jahre, erste Symptome eines LEMS waren im Mittel mit 44 Jahren (17-71 Jahre) aufgetreten.

Bis zur Diagnosestellung vergingen 2 Monate bis 25 Jahre, die mittlere Latenz betrug 4,4 Jahre.

3.2.2 Auslöser und Verstärker

Von den insgesamt 25 Patienten gaben 15 Patienten Faktoren an, die in unmittelbarem zeitlichen Zusammenhang mit dem Erstauftreten oder einer merklichen Verschlechterung der klinischen Symptomatik des LEMS in Zusammenhang standen.

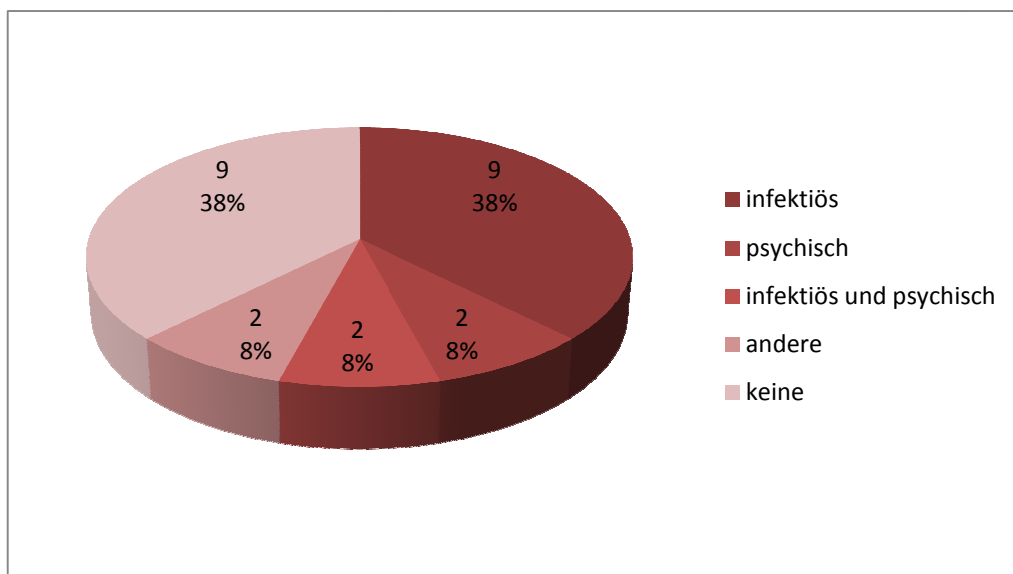


Abbildung 8

Auslöser und Verstärker der Symptome bei 25 LEMS-Patienten

Am häufigsten wurde über Infektionskrankheiten berichtet. Hier waren insbesondere Infekte der Atemwege besonders häufig, insgesamt 10 Patienten gaben Erkältungen, Husten und Grippe an, zwei Patienten einen gastrointestinalen Infekt, davon einer zusätzlich eine Cholezystitis. Bei einem weiteren Patient traten erste Beschwerden nach einer Grippeimpfung auf.

Ebenfalls zu einer Verschlechterung bzw. zum Erstauftreten führten bei 4 Patienten Anstrengung, Stress oder psychische Belastungen.

Je ein Patient gaben, teils zusätzlich, Wetterumschwung, Schwangerschaft, eine allergische Reaktion bzw. Traumata an.

Mehrfachnennungen waren möglich.

3.2.3 klinische Symptome

Die von den Patienten angegebenen klinischen Symptome lassen sich in Paresen, autonome Dysfunktion, Sensibilitätsstörungen sowie Allgemeinsymptome unterteilen, wobei die Patienten meist über Symptome aus mehrerer dieser Gruppen berichteten.

3.2.3.1 Paresen

Bei allen 25 Patienten bestand eine Muskelschwäche, die Paresen waren meist proximal- und beinbetont (Abb. 9).

Dysphagie und Dysarthrie kamen bei 18 (72%) Patienten vor, davon bei 11 (44%) Patienten in Kombination, bei jeweils 3 (12%) Patienten eines der beiden Symptome. Ein Patient gab ausschließlich eine Schwäche der Kaumuskulatur an, ein weiterer berichtete dies als zusätzliches Symptom.

Paresen der okulären Muskulatur traten bei 15 (60%) Patienten auf, Doppelbilder oder Verschwommensehen wurde von 5 (20%) Patienten, eine Ptose von 2 (8%) Patienten berichtet. 8 (32%) weitere Patienten gaben das Vorkommen sowohl einer Ptose als

auch von Doppelbildern/Verschwommensehen an, bei einem Patienten bestand zusätzlich ein upbeat-Nystagmus.

3 (12%) Patienten berichteten über Dyspnoe, zwei dieser Patienten gaben zusätzlich eine Schwäche der Nackenmuskulatur an.

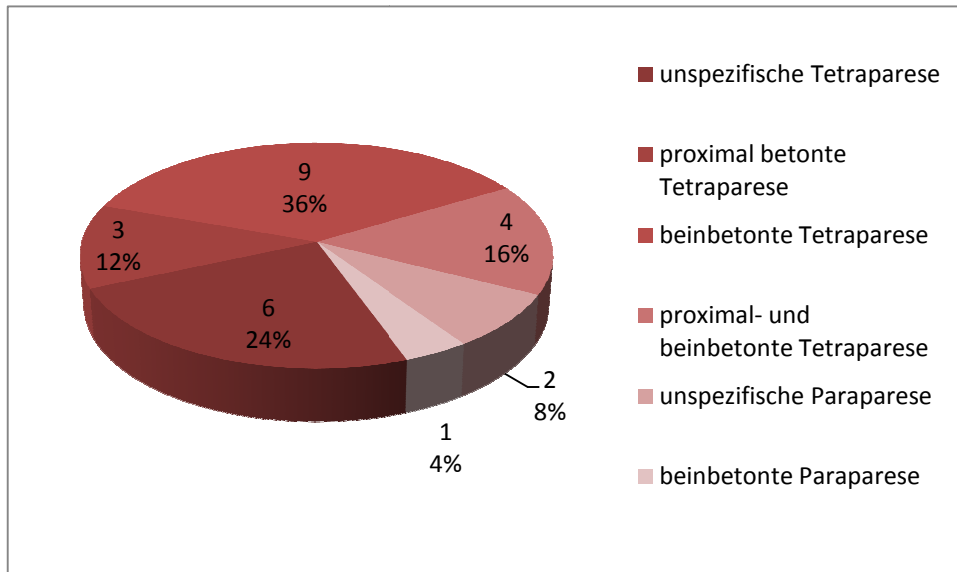


Abbildung 9

Paresen der Extremitäten bei 25 LEMS-Patienten

3.2.3.2 Autonome Dysfunktion

Typischerweise treten bei LEMS-Patienten auch autonome Störungen auf, in unserm Kollektiv bei 21 (84%) Patienten: Am häufigsten wurde Mundtrockenheit genannt, hiervon waren 20 (80%) Patienten betroffen. 6 (24%) Patienten klagten über Obstipation, 4 (16%) über Harninkontinenz, 2 (8%) über erektile Dysfunktion und ein Patient (4%) über Anhidrose. Mehrfachnennungen waren möglich.

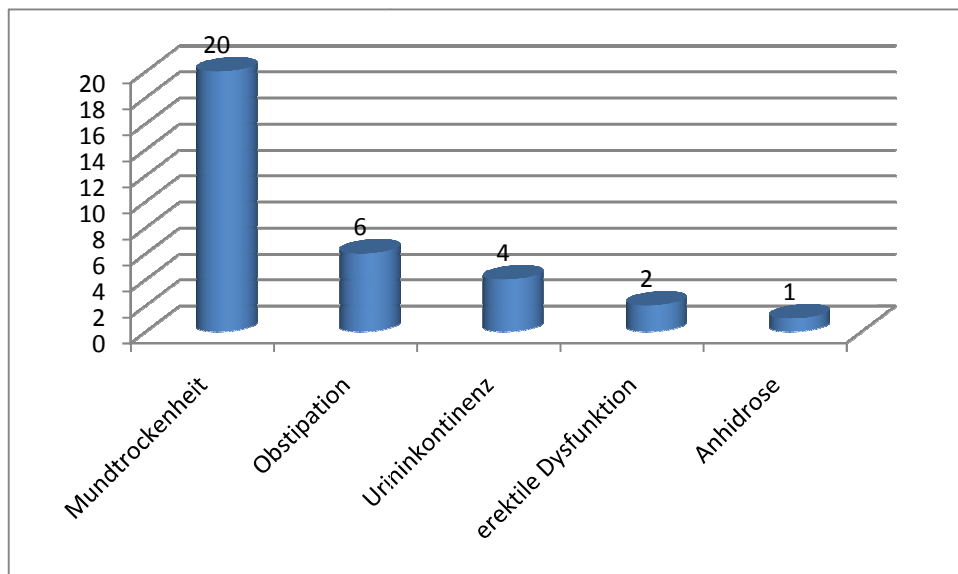


Abbildung 10

Autonome Dysfunktion der 25 LEMS-Patienten

3.2.3.3 Weitere Symptome

Weitere unspezifische Beschwerden, die im Detail im Folgenden aufgeführt sind, wurden von 16 (64%) der 25 Patienten angegeben, wobei Mehrfachnennungen möglich waren.

Ein Gewichtsverlust trat bei 9 (36%) Patienten auf, Nachtschweiß bei einem Patienten (4%). Bei keinem dieser Patienten war auch Jahre nach Erstmanifestation der neurologischen Symptome ein Tumor nachweisbar.

Muskelschmerzen oder ein Gefühl der Muskelsteifigkeit trat bei 8 (32%) Patienten auf.

2 (8%) Patienten berichteten über abnorme Müdigkeit, jeweils ein Patient gab Schlafstörungen, Schwindel, Depression und psychomotorische Verlangsamung an.

Parästhesien oder Dysästhesien bemerkten insgesamt 3 (12%) Patienten.

Bei einem der Patienten bestanden zusätzlich ausgeprägte cerebelläre Symptome mit Gangunsicherheit, Dysarthrie und Dysphagie, sodass er nicht mehr selbständig gehen oder schlucken konnte. Bei diesem Patienten wurden keine zusätzlichen anti-neuronalen Antikörper gefunden, ebenso wenig ließ sich eine Tumorerkrankung

nachweisen, trotz wiederholter Durchführung eines FDG-PET/CT innerhalb der ersten 4 Jahre nach Diagnosestellung. Die neurologischen Symptome besserten sich langsam unter Plasmapherese und symptomatischer Therapie, sodass er inzwischen ohne Gehhilfe gehfähig ist. Der VGCC-Antikörpertiter war bei diesem Patienten sowohl initial als auch in den Folgeuntersuchungen des vierjährigen follow-up außergewöhnlich hoch.

Zwei Patienten gaben Konzentrations- und kognitive Defizite an, die einige Monate nach Einsetzen der Muskelschwäche auftraten. Diese Symptome besserten sich in beiden Fällen nach der Einnahme von 3,4-Diaminopyridin reproduzierbar jeweils für wenige Stunden.

3.2.4 Autoimmunerkrankungen

In vorangegangenen Studien wurde bereits gezeigt, dass Autoimmunerkrankungen bei Patienten mit idiopathischem LEMS häufiger als bei Patienten mit T-LEMS vorkommen (O'Neill et al., 1988; Wirtz et al., 2004). Auch in unserem Patientenkollektiv waren gehäuft Antikörper gegen ANA (8/25, 32%), Cardiolipin (4/25, 16%), Thyreoglobulin (4/25, 16%), Thyreoperoxidase (2/25, 8%), Parietalzellantikörper (2/25, 8%) und TSH-Rezeptor-Antikörper (1/25, 4%) nachweisbar. Neben Erkrankungen der Schilddrüse (4/25, 16%) kamen bei jeweils einem Patienten Diabetes mellitus Typ I, Psoriasis und Colitis ulcerosa vor.

Insgesamt waren bei 15 der 25 Patienten entweder klinisch eine Autoimmunerkrankung oder Autoantikörper im Serum nachweisbar, was mit den Daten vorangegangener Studien übereinstimmt.

3.2.5 FDG-PET-CT

Bei Patienten, bei denen die Diagnosestellung weniger als 5 Jahren zurücklag wurde zusätzlich zum Ausschluss eines Tumors ein FDG-PET-CT durchgeführt, insgesamt bei 18 Patienten. Bei keinem Patienten wurde ein Tumor festgestellt.

Bei einem Patienten zeigte sich eine Anreicherung in der rechten dorsomedialen Pleura mit V.a. Malignität. In den weiterführenden PET-Kontrollen, zuletzt im Februar 2008, konnte auch in diesem Fall kein Tumor nachgewiesen werden, obwohl auch klinisch der Verdacht auf eine maligne Erkrankung bestand.

4 DISKUSSION

4.1 Diskussion der Ergebnisse der Antikörperreaktivität

Wir konnten zeigen, dass im Serum der Patienten enthaltene Antikörper, die gegen die $\alpha 1$ -Untereinheit des spannungsgesteuerten Kaliumkanals (VGCC) von PQ-Typ gerichtet sind, im einzelnen gegen die S5-S6 Verbindungssegmente der Domänen I, III und IV der $\alpha 1$ -Untereinheit gerichtet sein können. Zusätzlich gab es einen signifikanten Unterschied in der Reaktivität gegen die S5-S6 Verbindungssegmente der Domäne IV bei LEMS-Patienten mit und ohne Tumor.

Die $\alpha 1$ -Untereinheit des VGCC hat die Funktion, abhängig von Spannungsänderungen die Leitfähigkeit für Kalzium zu verändern, außerdem ist sie eine Bindungsstelle für Pharmaka. Sie besteht aus vier strukturell sehr ähnlichen Domänen (I, II, III und IV), die je sechs transmembranäre Segmente (S1 bis S6) enthalten (Hofmann et al., 1994; Mori et al., 1991; Snutch et al., 1992; Starr et al., 1991).

In insgesamt 50% der getesteten Seren von LEMS-Patienten konnten wir Antikörper nachweisen, die spezifisch gegen Antigene gerichtet waren, die wir basierend auf der Primärstruktur der $\alpha 1$ -Untereinheit des PQ-Typ VGCC synthetisiert hatten. Wir wählten die Verbindung zwischen den Segmenten S5 und S6 (markierte Bereiche in Abb. 1), da diese Regionen extrazellulär lokalisiert und damit für Autoantikörper potentiell erreichbar sind. Außerdem ist bereits bekannt, dass LEMS-Antikörpern mit den extrazellulären Schleifen (S5-S6) der Domänen II und IV kreuzreagieren (Takamori et al., 1997). In Studien, bei denen synthetische Peptide benutzt wurden, die analog zu den transmembranären S5-S6 Regionen der Domänen I-IV des VGCC vom P/Q-Typ hergestellt wurden, konnten bei 30% der LEMS-Patienten, im Gegensatz zu gesunden Kontrollen sowie Patienten mit SCLC ohne LEMS, Antikörper gegen die S5-S6 Verbindungsregionen der Domäne IV nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu unseren Beobachtungen konnten in vorherigen Studien bei LEMS-Patienten keine Antikörper gegen synthetische Proteine der S5-S6 Region der Domänen I und III nachgewiesen werden (Takamori et al., 1999; Takamori et al., 1997), wobei dies durch eine abweichende Konformation des Proteins erklärbar wäre. Ebenso kann dadurch

die Tatsache verständlich werden, dass das Protein der Domäne II zwar bei der Etablierung eines Tiermodells des LEMS immunogen wirkte (Takamori et al., 1998), aber von LEMS-Antikörpern nicht als Antigen erkannt wurde (Takamori et al., 1997). Synthetische Proteine nehmen nicht automatisch eine Konformation an, die von Autoantikörpern gegen das natürliche körpereigene Protein als Antigen erkannt wird (Dyson et al., 1985; Rose et al., 1985; Takamori et al., 1992). Leider ist auch nicht klar, ob die rekombinante Expression von Proteinen das Problem der inkorrekten Konformation lösen kann. Allerdings konnte durch Verwendung eines längeren Abschnittes der S5-S6 Verbindungsregion der Domäne III von Iwasa et al. (2000) bei 50% der getesteten LEMS-Patienten eine Antikörperbindung an dieses Protein nachgewiesen werden.

Domäne III scheint für die Funktion des Kalziumkanals am bedeutsamsten zu sein, da sie die höchste Kalziumaffinität und Kalziumselektivität sowie die stärkste Bindungsfähigkeit für Liganden besitzt (Ellinor et al., 1994; Ellinor et al., 1995). Außerdem kann LEMS bei Ratten induziert werden, indem man sie mit dem Protein von Domäne III immunisiert, was auf eine potentielle Bindungsstelle für Antikörper in der S5-S6 Verbindungsregion hinweisen könnte (Komai et al., 1999), ebenfalls kann dies ein Anhalt für eine mögliche Entstehung der Erkrankung auch beim Menschen durch diesbezüglich gerichtete Antikörper sein. Diese Vermutung wird erhärtet durch den Nachweis von Antikörpern gegen Domäne III bei 43,5% unserer getesteten LEMS-Patienten, jedoch bei keinem unserer gesunden Probanden. Trotzdem könnten durch die Verwendung von denaturierten Proteinen bei unserer Versuchsreihe Antikörper gegen das Protein in seiner natürlichen Konformation übersehen worden sein.

Obwohl bei all unseren Patienten mittels Radioimmunoassay Antikörper gegen native VGCC nachgewiesen werden konnten, waren nur bei etwa der Hälfte der Patienten Antikörper gegen die von uns getesteten S5-S6-Verbindungsregion der Domänen I, III und IV nachweisbar. Mögliche Erklärungen hierfür sind zum einen die technisch leider nicht realisierbare Testung der Domäne II, die Verwendung von rekombinanten Proteinen sowie die Tatsache, dass bei Verwendung des nativen VGCC auch Antikörper gegen andere Strukturen als die S5-S6-Verbindungsregion erkannt werden, beispielsweise gegen intrazelluläre Anteile des Rezeptors.

Interessanterweise konnten wir abhängig von der Ätiologie (paraneoplastisch bzw. idiopathisch) einen signifikanten Unterschied bei der Reaktivität der Patientenserum mit dem Protein der Domäne IV feststellen. Unsere Daten liefern hierfür zwei mögliche Erklärungen: Einerseits könnten bedingt durch die längere Erkrankungsdauer bei NT- im Vergleich zu T-LEMS Patienten zusätzlich Antikörper gegen Domäne IV als ein weiteres Epitop entstanden sein, andererseits könnte dies ein Hinweis auf eine Rolle dieses Proteins in der Pathogenese der idiopathischen Form des LEMS sein. Sequenzanalysen der Aminosäuren des extrazellulären Anteils des S5-S6 Verbindungssegments der Domäne IV zeigten keine offensichtliche Ähnlichkeit mit anderen bekannten Proteinen mit Ausnahme diverser anderer Kalziumkanal-Typen. Jedoch wurde bei der Analyse kürzerer Proteinsequenzen mittels NCBI-BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ein lineares B-Zell-Epitop gefunden (EEDSDEDE), das in 8 von 10 Aminosäuren mit dem Lactoferrin-bindenden Protein von *Neisseria meningitidis*, dem US22-Genprodukt des AD169-Stamms von CMV und Zinedin, einem Protein des ZNS übereinstimmte (Takamori et al., 1997).

Die Entstehung des Lambert-Eaton Myasthenie Syndroms ist komplex. Vermutlich spielt auch epitope-spreading, das heißt Bildung von Antikörpern gegen neue, durch Antigenverarbeitung und konsekutive Antigenpräsentation exprimierte Proteinbausteine eine Rolle, sodass eine Identifikation der relevanten pathogenen B-Zell-Epitope erschwert wird. Möglicherweise ist auch eine Induktion der B-Zell-Reaktion durch spezifische T-Zellen beteiligt, sodass identifizierte B-Zell-Epitope für weitere Studien bezüglich einer T-Zell-medierten Reaktion getestet werden könnten, wie bereits für andere paraneoplastische Erkrankungen durch Etablierung eines Tiermodells erfolgt (Pellkofer et al., 2004).

Da darüber hinaus 90% der Patienten, bei denen Antikörper gegen Protein IV nachweisbar waren, keinen Tumor hatten, könnte dies richtungsweisend für weitere potentielle Vorgehensweisen sein. Durch Verbesserung des Testverfahrens könnte anhand dieser Reaktivität das Risiko der Patienten einen Tumor zu entwickeln bestimmt werden. Dies hätte enorme Konsequenzen hinsichtlich des weiteren diagnostischen und therapeutischen Vorgehens sowie bezüglich der Prognose der Erkrankung. Dieses Ergebnis wird allerdings durch den Nachweis von Antikörpern gegen Domäne IV bei einer gesunden Kontrolle limitiert. Bis zur klinischen Verwendung eines Tests auf Antikörper gegen Domäne IV wären eine Verbesserung

des Testverfahrens und eine erneute Studie mit prospektivem Design notwendig, jedoch wäre eine mögliche prädiktive Aussage bezüglich einer nicht-paraneoplastischen Genese denkbar. Ein positiver Test auf Antikörper gegen die Domäne IV sollte einen behandelnden Neurologen aber aktuell nicht von der weiteren Tumorsuche abhalten.

4.2 Diskussion der klinischen Daten

Generell werden bei Patienten mit NT-LEMS häufiger Autoantikörper, in den meisten Fällen gegen Gewebe des Endokrinen Systems gefunden, als bei Patienten mit T-LEMS (Lennon et al., 1982). In unserem Patientenkollektiv waren bei 60% der Patienten Autoantikörper im Serum nachweisbar oder es bestand klinisch eine Autoimmunerkrankung. Dies stimmt mit den Ergebnissen vorangegangener Studien überein (O'Neill et al., 1988; Wirtz et al., 2004).

Bei den von uns befragten Patienten vergingen von der klinischen Erstmanifestation bis zur korrekten Diagnosestellung im Mittel 4,4 Jahre (2 Monate bis 25 Jahre). Im Vergleich zu anderen Studien, beispielsweise von O'Neill et al. 1988, wo die mittlere Latenz 8 Monate (1 Monat bis 13,6 Jahre) betrug, ist dieser Zeitraum in unserem Patientenkollektiv deutlich länger. Da in unserer Studie nur Patienten mit NT-LEMS evaluiert wurden, könnte dies durch den benigneren klinischen Verlauf der Erkrankung bei Patienten ohne zugrunde liegende Tumorerkrankung zu erklären sein (Titulaer und Verschuuren, 2008; Wirtz et al., 2004; Wirtz et al., 2005c).

Ein CT-Thorax ist bei Diagnose eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms (SCLC) die Methode der Wahl zur initialen Staging-Untersuchung, da bezüglich kleiner peripherer Läsionen und damit bezüglich der Tumorausbreitung eine hohe Sensitivität gegeben ist (Bonomo et al., 1996; Pastorino et al., 2003). Grundsätzlich wird die Sensitivität und Spezifität durch eine Kombination mit einer FDG-PET erhöht (Fischer et al., 2007; Pastorino et al., 2003). Aufgrund der Immunreaktion sind bei Patienten mit paraneoplastischen neurologischen Erkrankungen die zugrunde liegenden Tumore in den meisten Fällen bei Auftreten der klinisch-neurologischen Symptome sehr klein, weshalb bei diesen Patienten die Durchführung eines FDG-PET-CT als Goldstandard gilt (Antoine et al., 2000; Linke R et al., 2004; Rees JH et al., 2001). Ähnliches sollte für Patienten mit LEMS im Rahmen der Diagnosestellung und zur Zuordnung bezüglich der paraneoplastischen oder nicht-paraneoplastischen Erkrankungsform gelten.

Im Rahmen unserer Studie hatten wir die Möglichkeit, die FDG-PET-Daten von insgesamt 18 Patienten auszuwerten, die in allen Fällen innerhalb von 5 Jahren nach Diagnosestellung durchgeführt wurden, nachdem mithilfe konventioneller Methoden

kein Tumor festgestellt werden konnte und die Diagnose NT-LEMS gestellt worden war. Trotz der hohen Sensitivität und Spezifität der Methode konnte bei keinem dieser Patienten ein Tumor gefunden werden, was möglicherweise mit der bereits genannten langen Latenz zwischen klinischer Erstmanifestation und Diagnosestellung zusammenhängt. Wie bereits von Titulaer et al. 2008a vorgeschlagen, halten wir die Durchführung eines CT-Thorax, bei unauffälligem Befund gefolgt von einem FDT-PET, für eine sinnvolle Kombination zur initialen Diagnostik bei neu diagnostizierten LEMS-Patienten.

Bisherige Daten zeigten, dass es 4 bis 5 Jahre nach Diagnosestellung sehr unwahrscheinlich ist, einen Tumor als zugrunde liegende Ursache festzustellen (O'Neill et al., 1988), dies kann jedoch endgültig nur in einer prospektiv angelegten Studie gezeigt werden. Aufgrund der Daten unserer Studie halten wir es für sinnvoll, den Zeitraum der regelmäßigen Untersuchungen bezüglich eines Tumors auf die ersten 4 Jahre nach Auftreten der Symptome anstatt nach der Diagnosestellung zu beschränken.

Das längste bisher veröffentlichte Intervall zwischen klinischem Erkrankungsbeginn und Tumordiagnose mittels Röntgen-Thorax betrug 3,8 Jahre (O'Neill et al., 1988). Unsere Daten weisen darauf hin, dass die kritische Zeitspanne bezüglich der Differenzierung zwischen Tumor- und nicht-Tumor-Patienten ab Beginn der klinisch eindeutigen, mit LEMS assoziierten Symptome und nicht ab der Diagnosestellung bemessen werden sollte.

4.3. Schlussfolgerungen und Ausblick

Unsere Studienergebnisse weisen auf eine unterschiedliche Immunpathogenese von NT- und T-LEMS hin, wie bereits vorangegangene Studien, die eine unterschiedliche HLA-Typisierung und die Anwesenheit von AGNA zeigten (Graus et al., 2005; Sabater et al., 2008; Wirtz et al., 2005a).

Insgesamt 90% der Patienten, bei denen Antikörper gegen Protein IV nachweisbar waren, hatten keinen Tumor. Hieraus könnte eine prädiktive Aussage bezüglich einer nicht-paraneoplastischen Genese erfolgen, Voraussetzung sind die Verbesserung des Testverfahrens und eine erneute Studie mit prospektivem Design.

Unser Patientenkollektiv unterschied sich von anderen Studien mit Einschluss von Patienten mit paraneoplastischer Erkrankungsgenese durch die längere Latenz von Erstmanifestation bis Diagnosestellung (4,4 Jahre vs. 8 Monate). Dies weist wie vorangegangene vergleichende Studien auf den gutartigeren Verlauf des LEMS bei NT-Patienten hin (Titulaer und Verschuuren 2008; Wirtz et al., 2004; Wirtz et al., 2005c).

Zusätzlich empfehlen wir, die kritische Zeitspanne bezüglich der Differenzierung zwischen Tumor- und nicht-Tumor-Patienten mittels intensiver Tumorsuche ab Beginn der klinisch eindeutigen, mit LEMS assoziierten Symptome und nicht ab der Diagnosestellung zu bemessen.

5 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1.....	26
----------------	----

6 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1	7
Abbildung 2	8
Abbildung 3	17
Abbildung 4	24
Abbildung 5	24
Abbildung 6	24
Abbildung 7	26
Abbildung 8	28
Abbildung 9	30
Abbildung 10	31

7 LITERATURVERZEICHNIS

AAEM Quality Assurance Committee. American Association of Electrodiagnostic Medicine. Literature review of the usefulness of repetitive nerve stimulation and single fiber EMG in the electrodiagnostic evaluation of patients with suspected myasthenia gravis or Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Muscle Nerve* 2001 Sep; 24(9): 1239-47

Anderson HJ, Churchill-Davidson HC, Richardson AT. Bronchial neoplasm with myasthenia: prolonged apnoea after administration of succinylcholine. *Lancet* 1953; 2: 1291-3

Antoine JC, Cinotti L, Tilikete C, et al. [18F]Fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the diagnosis of cancer in patients with paraneoplastic neurological syndrome and anti-Hu antibodies. *Ann Neurol*. 2000 Jul; 48(1): 105-8

Bain PG, Motomura M, Newsom-Davis J, Misbah SA, Chapel HM, Lee ML, Vincent A, Lang B. Effects of intravenous immunoglobulin on muscle weakness and calcium channel autoantibodies in the Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Neurology* 1996 Sep; 47(3): 678-83

Berglund S, Erikson M, von Eyben FE, Hellekant C, Mattson W. Remission by chemotherapy of the Lambert-Eaton myasthenic syndrome in a patient with small cell bronchiogenic carcinoma. *Acta Med. Scand.* 1982; 212: 429-432

Bird SJ. Clinical and electrophysiologic improvement in Lambert-Eaton syndrome with intravenous immunoglobulin therapy. *Neurology* 1992 Jul; 42 (7): 1422-3

Bonomo L, Ciccotosto C, Guidotti A, Storto ML. Lung cancer staging: the role of computed tomography and magnetic resonance imaging. *Eur J Radiol.* 1996 Aug;23(1):35-45

Chalk CH, Murray NM, Newsom-Davis J, O'Neill JH, Spiro SG. Response of the Lambert-Eaton myasthenic syndrome to treatment of associated small-cell lung carcinoma. *Neurology* 1990; 40: 1552-1556

Darnell RB, Posner JB. Paraneoplastic syndromes involving the nervous system. *N Engl J Med* 2003; 349: 1543-54

Dyson HJ, Cross KJ, Houghten RA, Wilson IA, Wright PE, Lerner RA. The immunodominant site of a synthetic immunogen has a conformational preference in water for a type-II reverse turn. *Nature* 1985;318:480-483

Eaton LM, Lambert EH. Electromyography and electrical stimulation of nerves in diseases of the motor unit: observations on a myasthenic syndrome associated with malignant tumors. *JAMA* 1957; 163: 1117-24

Ellinor PT, Zhang JF, Horne WA, Tsien RW. Structural determinants of the blockade of N-type calcium channels by a peptide neurotoxin. *Nature*. 1994 Nov 17;372(6503):272-5

Ellinor PT, Yang J, Sather WA, Zhang JF, Tsien RW. Ca²⁺ channel selectivity at a single locus for high-affinity Ca²⁺ interactions. *Neuron*. 1995 Nov;15(5):1121-32

Elrington GM, Murray NM, Spiro SG, Newsom-Davis J. Neurological paraneoplastic syndromes in patients with small cell lung cancer. A prospective survey of 150 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1991 Sep; 54(9): 764-7

Fischer BM, Mortensen J, Langer SW, Loft A, Berthelsen AK, Petersen BI, Daugaard G, Lassen U, Hansen HH. A prospective study of PET/CT in initial staging of small-cell lung cancer: comparison with CT, bone scintigraphy and bone marrow analysis. *Ann Oncol* 2007 Feb; 18(2): 338-45.

Fukunaga H, Engel AG, Lang B, Newsom-Davis J, Vincent A. Passive transfer of Lambert-Eaton myasthenic syndrome with IgG from man to mouse depletes the presynaptic membrane active zones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1983 Dec; 80(24): 7636-7640

Graus F, Vincent A, Pozo-Rosich P, Sabater L, Saiz A, Lang B, Dalmau J. Anti-glial nuclear antibody: marker of lung cancer-related paraneoplastic neurological syndromes. *J Neuroimmunol.* 2005 Aug; 165(1-2): 166-7

Graus F, Delattre JY, Antoine JC, Dalmau J, Giometto B, Grisold W, Honnorat J, Smitt PS, Vedeler Ch, Verschuuren JJ, Vincent A, Voltz R. Recommended diagnostic criteria for paraneoplastic neurological syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004 Aug; 75(8): 1135-40

Hofmann F, Biel M, Flockerzi V. Molecular basis for Ca²⁺ channel diversity. *Annu. Rev. Neurosci*. 1994; 17: 399-418

Iwasa K, Takamori M, Komai K, Mori Y. Recombinant calcium channel is recognized by Lambert-Eaton myasthenic syndrome antibodies. *Neurology*. 2000 Feb 8;54(3):757-9

Jenkyn LR, Brooks PL, Forcier RJ, Maurer LH, Ochoa J. Remission of the Lambert-Eaton syndrome and small cell anaplastic carcinoma of the lung induced by chemotherapy and radiotherapy. *Cancer* 1980; 46: 1123-1127

Komai K, Iwasa K, Takamori M. Calcium channel peptide can cause an autoimmune-mediated model of Lambert-Eaton myasthenic syndrome in rats. *J Neurol Sci*. 1999 Jul 1;166(2):126-30

Lambert EH, Eaton LM, Rooke ED. Defect of neuromuscular conduction associated with malignant neoplasms. *Am J Physiol* 1956; 187: 612-3

Lambert EH, Lennon VA. Selected IgG rapidly induces Lambert-Eaton myasthenic syndrome in mice: complement independence and EMG abnormalities. *Muscle Nerve*. 1988 Nov;11(11):1133-45

Lang B, Newsom-Davis J, Wray D, Vincent A, Murray N. Autoimmune aetiology for myasthenic (Eaton-Lambert) syndrome. *Lancet* 1981 Aug 1; 2(8240): 224-6

Lennon VA, Lambert EH, Whittingham S, Fairbanks V. Autoimmunity in the Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Muscle Nerve*. 1982;5(9S):S21-5

Lennon VA, Kryzer TJ, Griesmann GE, O'Suilleabhain PE, Windebank AJ, Woppmann A, Miljanich GP, Lambert EH. Calcium-channel antibodies in the Lambert-Eaton syndrome and other paraneoplastic syndromes. *N Engl J Med* 1995;332:1467-1474

Leys K, Lang B, Johnston I, Newsom-Davis J. Calcium channel autoantibodies in the Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Ann Neurol* 1991;29:307-314

Linke R, Schroeder M, Helmberger T, Voltz R. Antibody-positive paraneoplastic neurologic syndromes. Value of CT and PET for tumor diagnosis. *Neurology* 2004 Jul; 63: 282-6

Maddison P, Lang B, Mills K, Newsom-Davis J. Long term outcome in Lambert-Eaton myasthenic syndrome without lung cancer. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001; 70: 212-17

Maddison P, Lang B. Paraneoplastic neurological autoimmunity and survival in small-cell lung cancer. *J Neuroimmunol.* 2008 Sep 15; 201-202: 159-62

McEvoy KE, Windebank AJ, Daube JR, Low PA. 3,4-diaminopyridine in the treatment of Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *N Engl J Med.* 1989 Dec 7; 321(23): 1567-71

Mori Y, Friedrich T, Kim MS, Mikami A, Nakai J, Ruth P, Bosse E, Hofmann F, Flockerzi V, Furuichi T, Mikoshiba K, Imoto K, Tanabe T, Numa S. Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel. *Nature* 1991; 350: 398-402

Motomura M, Lang B, Johnston I, Palace J, Vincent A, Newsom-Davis J. Incidence of serum anti-P/Q-type and anti-N-type calcium channel autoantibodies in the Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *J Neurol Sci* 1997 Mar 20; 147(1): 35-4

Motomura M, Hamasaki S, Nakane S, Fukuda T, Nakao YK. Apheresis treatment in Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Ther Apher.* 2000 Aug; 4(4): 287-90

Newsom-Davis J. Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Rev Neurol (Paris)* 2004 Feb; 160(2): 177-180

Newsom-Davis J, Murray NM. Plasma exchange and immunosuppressive drug treatment in the Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Neurology* 1984; 34: 480-485

O'Neill JH, Murray NM, Newsom-Davis J. The Lambert-Eaton myasthenic syndrome: a review of 50 cases. *Brain* 1988; 111: 577-596

Oh SJ, Kurokawa K, Claussen GC, Ryan HF. Electrophysiological criteria of Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Muscle Nerve* 2005; 32:515-20

Parsons KT, Kwok WW. Linear B-cell epitopes in Lambert-Eaton myasthenic syndrome defined by cell-free synthetic peptide binding. *J Neuroimmunol.* 2002 May;126(1-2):190-5

Parsons KT, Kwok WW, Gaur LK, Nepom GT. Increased frequency of HLA class II alleles DRB1*0301 and DQB1*0201 in Lambert-Eaton myasthenic syndrome without associated cancer. *Hum Immunol.* 2000 Aug;61(8):828-33

Pastorino U, Bellomi M, Landoni C, De Fiori E, Arnaldi P, Picchio M, Pelosi G, Boyle P, Fazio F. Early lung-cancer detection with spiral CT and positron emission tomography in heavy smokers: 2-year results. *Lancet.* 2003 Aug 23;362(9384):593-7

Pellkofer H, Schubart AS, Hoftberger R, Schutze N, Pagany M, Schuller M, Lassmann H, Hohlfeld R, Voltz R, Linington C, 2004. Modelling paraneoplastic CNS disease: T-cells specific for the onconeural antigen PNMA1 mediate autoimmune encephalomyelitis in the rat. *Brain* 127 (8), 1822–1830

Rees JH, Hain SF, Johnson MR, et al. The role of [18F]fluoro-2-deoxyglucose-PET scanning in the diagnosis of paraneoplastic neurological disorders. *Brain* 2001 Nov; 124(Pt11): 2223-31

Rich MM, Teener JW, Bird SJ. Treatment of Lambert-Eaton syndrome with intravenous immunoglobulin. *Muscle Nerve* 1997 May; 20(5): 614-615

Rose GD, Gierasch LM, Smith JA. Turns in peptides and proteins. *Adv Protein Chem* 1985;37:1-109

Sabater L, Titulaer M, Saiz A, Verschuuren J, Güre AO, Graus F. SOX1 antibodies are markers of paraneoplastic Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Neurology.* 2008 Mar 18;70(12):924-8

Sanders DB, Massey JM, Sanders LL, Edwards LJ. A randomized trial of 3,4-diaminopyridine in Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Neurology* 2000; 54: 603-7

Sher E, Gotti C, Canal N, et al. Specificity of calcium channel autoantibodies in Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Lancet* 1989;2:640-643

Snutch TP, Reiner PB. Ca²⁺ channels: diversity of form and function. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1992; 2: 247-253

Starr TVB, Prystay W, Snutch TP. Primary structure of a calcium channel that is highly expressed in the rat cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 5621-5625

Takamori M. An autoimmune channelopathy associated with cancer: Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Intern Med.* 1999 Feb; 38(2): 86-96

Takamori M, Hamada T, Okumura S. Myasthenogenicity in the main immunogenic region of acetylcholine receptor as modified by conformational design: an approach to antigenic synthetic peptides. *J Neurol Sci* 1992;109:182-187.

Takamori M, Iwasa K, Komai K. Antigenic sites of the voltage-gated calcium channel in Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 1998 May; 841: 625-35

Takamori M, Iwasa K, Komai K. Antibodies to synthetic peptides of the alpha1A subunit of the voltage-gated calcium channel in Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Neurology.* 1997 May;48(5):1261-5.

Tim RW, Massay JM, Sanders DB. Lambert-Eaton myasthenic syndrome: electrodiagnostic findings and response to treatment. *Neurology.* 2000 Jun 13; 54(11): 2176-8

Titulaer MJ, Wirtz PW, Willems LN, van Kralingen KW, Smitt PA, Verschuuren JJ. Screening for small-cell lung cancer: a follow-up study of patients with Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *J Clin Oncol.* 2008a Sep 10; 26(26): 4276-81

Titulaer MJ, Wirtz PW, Kuks JB, Schelhaas HJ, van der Kooi AJ, Faber CG, van der Pol WL, de Visser M, Smitt PA, Verschuuren JJ. The Lambert-Eaton myasthenic syndrome 1988-2008: a clinical picture in 97 patients. *J Neuroimmunol* 2008b Sep 15; 201-202: 153-8

Titulaer MJ, Verschuuren JJ. Lambert-Eaton myasthenic syndrome: tumor versus nontumor forms. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1132:129-34

Varadi G, Mori Y, Mikala G, Schwartz A. Molecular determinants of Ca²⁺ channel function and drug action. *Trends Pharmacol. Sci.* 1995; 16: 43-49

Vincent A, Lang B, Newsom-Davis J. Autoimmunity to the voltage-gated calcium channels underlies the Lambert-Eaton myasthenic syndrome, a paraneoplastic disorder. *Trends Neurosci.* 1989; 12: 496-502

Wirtz PW, Bradshaw J, Wintzen AR, Verschuuren JJ. Associated autoimmune diseases in patients with the Lambert-Eaton myasthenic syndrome and their families. *J Neurol* 2004; 251: 1255-9

Wirtz PW, Willcox N, van der Slik AR, Lang B, Maddison P, Koeleman BP, Giphart MJ, Wintzen AR, Roep BO, Verschuuren JJ. HLA and smoking in prediction and prognosis of small cell lung cancer in autoimmune Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *J Neuroimmunol* 2005a Feb; 159(1-2): 230-7

Wirtz PW, Lang B, Graus F, van den Maagdenberg AM, Saiz A, de Koning Gans PA, Twijnstra A, Verschuuren JJ. P/Q-type calcium channel antibodies, Lambert-Eaton myasthenic syndrome and survival in small cell lung cancer. *J Neuroimmunol* 2005b Jul; 164(1-2): 161-5

Wirtz PW, Wintzen AR, Verschuuren JJ. Lambert-Eaton myasthenic syndrome has a more progressive course in patients with lung cancer. *Muscle Nerve* 2005c Aug; 32: 226-9

Wirtz PW, Smallegange TM, Wintzen AR, Verschuuren JJ. Differences in clinical features between the Lambert-Eaton myasthenic syndrome with and without cancer: an analysis of 227 published cases. *Clin Neurol Neurosurg.* 2002 Sep; 104(4): 359-63

8 ANHANG

8.1 Abkürzungen

AGNA	anti-glialer nukleärer Antikörper
ANA	Antinukleäre Antikörper
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CMV	Zytomegalievirus
CT	Computertomografie
3,4-DAP	3,4-Diaminopyridin
FDG	[18F]-Fluorodeoxyglucose
HLA	humanes Leukozytenantigen
IgG	Immunglobulin der Klasse G
ivIG	intravenöse Immunglobuline
kD	Kilodalton
LEMS	Lambert-Eaton myasthenes Syndrom
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NT-LEMS	idiopathisches LEMS (non-tumor LEMS)
PAGE	Polyacrylamidelektrophorese
PC	Positivkontrolle

PCR	Polymerase Kettenreaktion
PET	Positronenemissionstomografie
SCLC	kleinzelliges Bronchialkarzinom
SDS	Sodiumlaurylsulfat
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	TBS mit Tween
T-LEMS	paraneoplastisches LEMS (tumor-LEMS)
Tween	Poyoxyethylensorbitanmonolaureat
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
TSH	Thyreotropin
V	Volt
VGCC	Spannungsgesteuerte Kalziumkanäle (voltage-gated calcium channels)
ZNS	Zentrales Nervensystem

8.2 Publikation

Pellkofer HL, Armbruster L, Krumbholz M, Titulaer MJ, Verschuuren JJ, Schumm F, Voltz R. Lambert-Eaton myasthenic syndrome differential reactivity of tumor versus non-tumor patients to subunits of the voltage-gated calcium channel. *J Neuroimmunol.* 2008 Nov 15; 204(1-2): 136-9

Pellkofer HL, Armbruster L, Linke R, Schumm F, Voltz R. Managing non-paraneoplastic Lambert-Eaton myasthenic syndrome: clinical characteristics in 25 German patients. *J Neuroimmunology* 2009 Dec 10;217(1-2):90-4. Epub 2009 Oct 14.

8.3 Lebenslauf

persönliche Angaben:

Name: Lena Corina Armbruster

Geburtsdatum: 11.06.1982

Geburtsort: Heidelberg

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Eltern: Dr. Walter Armbruster, Mathematiker
Fatima Maria Armbruster, Dipl.-Übersetzerin

Schulbildung:

1988-1992 Erich-Kästner-Grundschule Ettlingen

1993-1997 Eichendorff-Gymnasium Ettlingen

1997-2000 Tulla-Gymnasium Rastatt (8-jähriger Zug)

Juli 2000 Abitur

Studium:

10/2000-08/2002 vorklinisches Studium der Humanmedizin, LMU München

August 2002 ärztliche Vorprüfung

08/2002-10/2006 klinisches Studium der Humanmedizin, LMU München

August 2003 1. Staatsexamen

August 2005 2. Staatsexamen

10. Oktober 2006 3. Staatsexamen

praktische Erfahrung:

Februar/März 2001	Pflegepraktikum Kinderchirurgie Karlsruhe
Februar/März 2002	Pflegepraktikum Unfallchirurgie München
Februar/März 2003	Famulatur Chirurgie und Innere Medizin Setúbal (Portugal)
September 2003	Famulatur Kinderchirurgie München
Februar/März 2004	Praxisfamulatur Urologie München
Februar/März 2005	Praxisfamulatur Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie München

Praktisches Jahr:

Okt. 2005 - Februar 2006	Chirurgie am Tigerberg Hospital, Stellenbosch, Südafrika
Februar 2006 - Mai 2006	Neurologie am Klinikum Großhadern, LMU München
Mai 2006 - August 2006	Innere Medizin am Klinikum Großhadern, LMU München

Doktorarbeit: 2004-2009

Experimentelle Arbeit am Institut für Neuroimmunologie der Neurologischen Abteilung des Klinikum Großhadern in München;

Direktor: Prof. R. Hohlfeld

Thema: Lambert-Eaton Myasthenie Syndrom: Klinische Übersicht über 25 Patienten in Deutschland und Reaktivität von 46 Patientenseren gegen Untergruppen des spannungsabhängigen Kalziumkanals

Betreuung durch Prof. Dr. R. Voltz und Dr. H. Pellkofer

Berufliche Tätigkeit:

04/07-06/07 Assistenzärztin in der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikum Essen

seit 06/07 Assistenzärztin in der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik der LMU München Großhadern

Sprachkenntnisse:

Englisch als Muttersprache

Französisch fließend

Portugiesisch gut

8.5 Danksagung

Ich möchte Prof. Dr. Voltz herzlich danken für die freundliche Überlassung des Themas und seine Unterstützung insbesondere bei der Auswertung der Daten.

Mein Dank gilt in erster Linie Frau Dr. Hannah Pellkofer, die mir vom Beginn bis zur Fertigstellung dieser Arbeit jederzeit hilfsbereit und engagiert zur Seite stand und mich in jeder erdenklichen Weise unterstützt hat. Lieben Dank für die Weitergabe Deines Wissens, insbesondere in Bezug auf eine strukturierte und durchdachte Arbeitsweise, ich habe sehr viel von Dir lernen dürfen!

Bei der Einrichtung des Labors war Martina Sölch unverzichtbar, Robert Ciczewski möchte ich für seine Geduld während des Erlernens und Perfektionierens der Methodik danken.

Für die seelische und moralische Unterstützung mit lieben Worten und Schokolade, deren Bedeutung oftmals unterschätzt wird, möchte ich Sabine Pitter stellvertretend für die Mitarbeiter der Abteilung für Neuroimmunologie II danken.

Lieben Dank auch an Dr. Markus Krumbholz für die großzügige und schnelle Hilfe bei der statistischen Analyse.

Schlussendlich schulde ich in größtem Maße meinen Eltern Dank, die mir durch ihre Unterstützung sowohl in moralischer als auch in finanzieller Hinsicht sowohl das Medizinstudium als auch die Promotion erst ermöglicht haben. Ebenso danke meinem Lebensgefährten Holger Lemke, der sich stets geduldig meiner Sorgen und Nöte annahm und ebenfalls einen wesentlichen Teil zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen hat.