

Aus dem Institut für Klinische Neuroimmunologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Emeritus: Prof. Dr. Reinhard Hohlfeld
Direktor: Prof. Dr. Martin Kerschensteiner
in Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut für Neurobiologie München

Glykosylierungen von Autoantikörpern bei entzündlichen Erkrankungen des Nervensystems

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von
Ilona Maria Karolina Baumann
aus
Regensburg
2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Edgar Meinl

Mitberichterstatter: PD Dr. Christian Kellner
PD Dr. Tobias Birnbaum

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. Markus Krumbholz

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 30.01.2020

*Gewidmet
meiner Familie*

*„Symptoms, then, are in reality nothing
but a cry from suffering organs.“*

Jean-Martin Charcot

Französischer Neurologe und Pathologe (1825 – 1893)

Danksagung

An dieser Stelle ist es mir ein besonderes Anliegen, mich bei all den Menschen zu bedanken, die maßgeblich zu dieser Forschungsarbeit beigetragen haben.

An erster Stelle ist hier die gesamte Arbeitsgruppe am Max-Planck-Institut für Neurobiologie zu nennen, bei der ich von Anfang an integriert war. Besonderer Dank geht dabei an meinen Doktorvater Prof. Edgar Meinl, der nicht nur mein Interesse für die Neuroimmunologie weckte, sondern auch mit mir zusammen mein Forschungsthema entwickelte. Während der ganzen Arbeit war er stets ein verlässlicher Ansprechpartner für mich und konnte mir mit seinem großen Fachwissen weiterhelfen.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinem Betreuer PD Dr. Markus Krumbholz vor allem für die methodische und fachliche Expertise und Unterstützung bedanken. In vielen Gesprächen und fachlichen Diskussionen, konnte ich viel von ihm lernen und dies auch in meiner Forschungsarbeit umsetzen. Auch trotz räumlicher Distanz konnte ich auf seine Unterstützung bauen.

Dem Institut für klinische Neuroimmunologie unter der Leitung von Prof. emeritus Wekerle und Prof. emeritus Hohlfeld, aktuell Prof. Kerschensteiner machte meine Forschungsarbeit überhaupt erst möglich. Hier bot sich für mich nicht nur eine Plattform zum internationalen Austausch und sammeln neuer Ideen, sondern auch ein überaus professionelles und modern ausgestattetes Umfeld für die Forschungsarbeit.

Ich danke den Mitarbeitern des Instituts und allen Arbeitsgruppen für die Unterstützung und die Lehrbereitschaft.

Ein großer Dank geht dabei vor allem an Petra Sperl für die gute Einarbeitung und jegliche Unterstützung bei den experimentellen Arbeitstechniken. Ich danke ihr besonders für die Hilfsbereitschaft und für das technische Wissen, dass sie jederzeit mit mir teilte.

Von Hema, Robert, Cora, Cathrin, Anita, Heike, Sarah und Judy konnte ich ebenso sehr viel lernen und es war eine Freude mit ihnen zusammen zu arbeiten.

Besonders der Austausch mit meinen KollegInnen aus dem Medizinstudium Anne-Katrin, Johann und Ellen war für mich ebenso wichtig wie unsere mittlerweile jahrelange Freundschaft.

Aufgrund der Förderung durch das FöFoLe-Programm (Förderprogramm für Forschung und Lehre) der Medizinischen Fakultät LMU München unter Prof. Reincke und Prof. Heesemann hatte ich die großartige Möglichkeit finanzielle Unterstützung für meine Forschungsarbeit zu erhalten und am Promotionsstudiengang „Molekulare und Systembiologische Medizin“ teilzunehmen.

Unseren Kollaborationspartnern gilt großer Dank. Die Arbeitsgruppen von Prof. Reindl, Prof. Nimmerjahn und Prof. Collin haben uns nicht nur Material zur Verfügung gestellt, sondern uns auch im Austausch mit ihren Erfahrungen und Methoden unterstützt.

Ein großer Dank geht natürlich an die Patienten, deren Seren wir verwenden durften. Ohne sie wäre ein Großteil der Versuche nicht möglich gewesen.

Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Freundin Ruth, die für mich nützliche Hinweise für die formale Ausarbeitung hatte.

Ich möchte mich auch bei meinem Verlobten bedanken, der mich mit viel Geduld, Ruhe und Kraft jederzeit unterstützt hat und bei der Bearbeitung von Abbildungen mit modernen Programmen geholfen hat.

Zum Schluss möchte ich noch meinen Eltern danken, die nie müde geworden sind mich zu unterstützen und zu motivieren. Ich danke Ihnen, dass sie immer ein offenes Ohr für mich haben und stets einen guten Rat. Sie sind ganz besondere Menschen, die mir immer Rückhalt geben.

Ich bin sehr dankbar durch all die Unterstützung meine Forschungsarbeit abschließen zu können.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Demyelinisierende Erkrankungen des ZNS	1
1.1.1	Epidemiologie	4
1.1.2	Pathophysiologie	6
1.2	Die Rolle der Autoantikörper bei der NMOSD und der MS	8
1.3	Glykosylierung von Antikörpern	13
1.3.1	Fcγ-Rezeptor-Aktivierung	14
1.3.2	C1q-Komplement Aktivierung	17
1.4	Zielsetzung	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Material	19
2.1.1	Patientenmaterial	19
2.1.2	Labormaterial	19
2.1.2.1	Geräte	19
2.1.2.2	Chemikalien und Reagenzien	21
2.1.2.3	Verbrauchsmaterialien	21
2.2	Methoden	22
2.2.1	Zellbiologische Methoden	22
2.2.1.1	Zelllinien und ihre Kultivierung	22
2.2.1.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	23
2.2.1.3	Bestimmung der Zellzahl und Viabilität	24
2.2.1.4	Stabile Transfektion eines Plasmids	24
2.2.1.5	Zellstimulation	25
2.2.2	Proteinanalytik	25
2.2.2.1	Antikörperaufreinigung	25
2.2.2.2	Antikörperdeglykosylierung	26
2.2.2.3	Gelelektrophorese und Lektin-Blot	27
2.2.3	Immunologische Methoden	29

2.2.3.1	ELISA: Quantifizierung von IL8	29
2.2.3.2	FACS-Analyse	30
2.2.4	Molekularbiologische Methoden	31
2.2.4.1	Transformation des Plasmides.....	31
2.2.4.2	Präparation von Plasmid-DNA.....	31
2.2.4.3	Analyse der Plasmid-DNA.....	32
3	Ergebnisse.....	33
3.1	Modulation und Reaktivität von Neurofascin-Antikörpern	33
3.1.1	Differentielle Deglykosylierung des monoklonalen anti-Neurofascin Antikörpers	33
3.1.2	Antigenerkennung deglykosylierter monoklonaler anti-Neurofascin Antikörper	36
3.1.3	Aktivierung von F _c -Rezeptoren nach differentieller Deglykosylierung der monoklonalen anti-Neurofascin Antikörper	37
3.1.3.1	Antigenspezifische und dosisabhängige Induktion von IL8	38
3.1.3.2	Stimulationsversuch mit monoklonalen anti-Neurofascin Antikörpern....	40
3.1.3.3	Ergebnisse und statistische Analyse	41
3.1.3.4	Gesamtauswertung.....	47
3.1.4	C1q-Bindung deglykosylierter Neurofascin-Antikörper	48
3.2	Modulation und Reaktivität von Aquaporin-4-Antikörpern von Patienten mit NMOSD.....	50
3.2.1	Differentielle Deglykosylierung von Aquaporin-4-Antikörper aus NMOSD- Plasmapheresen.....	50
3.2.2	Etablierung einer mit Aquaporin-4 stabil transfizierten Zelllinie	52
3.2.3	Erkennung von Aquaporin-4 der differentiell deglykosylierten AKs aus den NMOSD-Plasmapheresen	54
4	Diskussion.....	57
4.1	Enzymatische Deglykosylierung von Autoimmunantikörpern	58
4.2	Unveränderte Antigen-Antikörper-Reaktion nach differentieller Deglykosylierung	59
4.3	IgG-Glykosylierungen beeinflussen Effektorfunktionen der Antikörper	60

5	Zusammenfassung.....	64
6	Literaturverzeichnis.....	67
7	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	80
8	Abkürzungsverzeichnis.....	83
9	Kongressbeiträge	86

1 Einleitung

Bei Autoimmunerkrankungen werden körpereigene Strukturen durch das fehlgesteuerte Immunsystem angegriffen und dadurch stark geschädigt. Welche Prozesse zu dem fehlgeleiteten Immunsystem führen, sind nur in Teilen bekannt.

Aufgrund der Bluthirnschranke wurde das Zentralen Nervensystem (ZNS) lange Zeit als ein Raum angesehen, der nicht vom peripheren Immunsystem angegriffen werden kann. Man nahm an, das periphere Immunsystem sollte durch die Bluthirnschranke vom zentralen Nervensystem separiert sein. Neuere Daten belegen, dass das ZNS nicht vollständig isoliert ist und die Bluthirnschranke eher als selektierende Instanz interagiert (Banks 2015). Vielmehr werden die ins ZNS gelangten Immunzellen wohl durch Zellen des ZNS selbst reguliert (Carson et al. 2006). Immunzellen können somit von der Blutbahn ins ZNS wandern und dort zum Beispiel eine Infektion bekämpfen oder aber auch zu einer Autoimmunerkrankung führen. (Becher et al. 2000)

1.1 Demyelinisierende Erkrankungen des ZNS

Die chronisch-entzündlichen Erkrankungen des Zentralen Nervensystems stellen Immunvermittelte, sogenannte Autoimmunerkrankungen dar.

Hierbei werden die Myelinschichten der Neurone und schließlich die Nervenzellen selbst durch autoimmunvermittelte Prozesse geschädigt. Die Nervenzellen sind somit in ihrer Funktion, der Weiterleitung elektrischer Impulse, verlangsamt.

Zu den primär chronisch-entzündlichen Autoimmunerkrankungen des ZNS zählen u.a. die Multiple Sklerose, die Neuromyelitis optica, die Neuritis nervi optici und die Akut disseminierte Enzephalomyelitis (Popescu and Lucchinetti 2012, The optic neuritis study group 2008). Wichtig hierbei ist zu erwähnen, dass die Neuritis nervi optici nur selten als isoliertes Krankheitsbild bestehen bleibt, sondern meist in den Symptomkomplex einer Multiplen Sklerose oder Neuromyelitis optica übergeht.

Demeyelinisierende Erkrankungen gehen zum Teil mit ähnlichen Krankheitssymptomen einher, sodass es lange schwer war diese zu differenzieren.

Die bei der Multiplen Sklerose (MS) makroskopisch sichtbaren Herde bzw. sklerosierenden Plaques im Marklager des ZNS sind nicht nur namensgebend, sondern auch wegweisend gewesen. Eine erste histopathologische Aufarbeitung fand durch den Pathologen und Neurologen Jean-Martin Charcot statt, der diese Herde in „De la sclérose en plaques disséminées“ näher beschrieb.

Durch ihn wurde auch die Charcot-Trias (Intensionstremor, Nystagmus, skandierte Sprache) als typisches klinisches Bild für die Multiple Sklerose geprägt. (Goetz 2009, Kumar et al. 2011, Pearce 2005)

Meist ist das klinische Bild der MS durch schubartige Symptome wie motorische und sensible Ausfälle, Gangunsicherheit oder Gleichgewichtsstörungen geprägt, welche nach einem Schub meist wieder abklingen. Aktuell wird eine schubartige Form mit vollständiger Remission der Symptome von einer chronisch-progredienten Form der Multiplen Sklerose unterschieden. (Lublin 2014) Zu Beginn tritt oft eine Sehstörung mit Bewegungsschmerz des Auges auf. (Compston et Coles 2008, Malik et al. 2014) (*Abb. 1.1*)

So wurde die Neuromyelitis optica (NMO, Devic-Syndrom) lange als Unterform der MS angesehen, da diese ebenfalls mit Sehstörungen einhergeht. Zudem sind aber auch Querschnittssymptome häufig ausgeprägt, was auf eine Myelitis hinweist (Lucchinetti 2014). Eine akute Hirnstammsymptomatik oder ein Area postrema Syndrom (mit Übelkeit und Erbrechen zählen ebenfalls zum Symptomkomplex nach aktuellen Leitlinien. (Thompson et al. 2018) Seit 2015 wird die neue Nomenklatur der Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankungen („neuromyelitis optica spectrum disorders“ – NMOSD) verwendet, um eine deutlichere Unterscheidung zur MS zu vorzunehmen. (Wingerchuk et al. 2010 und 2015)

Klinisch ist es daher bei Erstmanifestation schwer zu unterscheiden, ob eine MS, NMOSD oder Neuritis nervi optici (NNO) vorliegt. (AWMF-Leitlinie 2018 Optikusneuritis)

Oft werden diese Symptome daher vorerst als CIS (klinisch isoliertes Syndrom) zusammengefasst, bis ein erneuter Schub eintritt und damit eine Diagnose gestellt werden kann. (Langer-Gould et al. 2014, Lublin et al. 2014) Zudem sollten Untersuchungen wie Liquordiagnostik und MRT durchgeführt werden.

Erst mit der zeitlichen und räumlichen Dissemination ist letztendlich die Diagnose z.B. einer MS zu stellen. (Polman et al. 2011) Das bedeutet, sind mehrere Schübe einer Erkrankung festzustellen, u.a. durch klinische Symptome, MRT oder Liquordiagnostik, spricht man von einer chronisch-entzündlichen Erkrankung des ZNS.

Für die MS sind diese Diagnosekriterien nach McDonald zusammengefasst, s. Abb. 1.1. Diese Kriterien werden regelmäßig überarbeitet, zuletzt 2017. Man spricht von einer MS, wenn es bereits zwei oder mehr klinische Schübe mit klinischem Nachweis gab, oder zu einem Schub mehrere zeitlich oder räumlich disseminierte Läsionen im MRT erkennbar sind bzw. der Liquorbefund auffällig ist. Dazu gehört nach den neuen Richtlinien auch, dass im Liquor nachgewiesene OKBs zur zeitlichen Dissemination gehören, wodurch sich die Diagnose bei manchen Patienten früher stellen lässt. (Thompson et al. 2018)

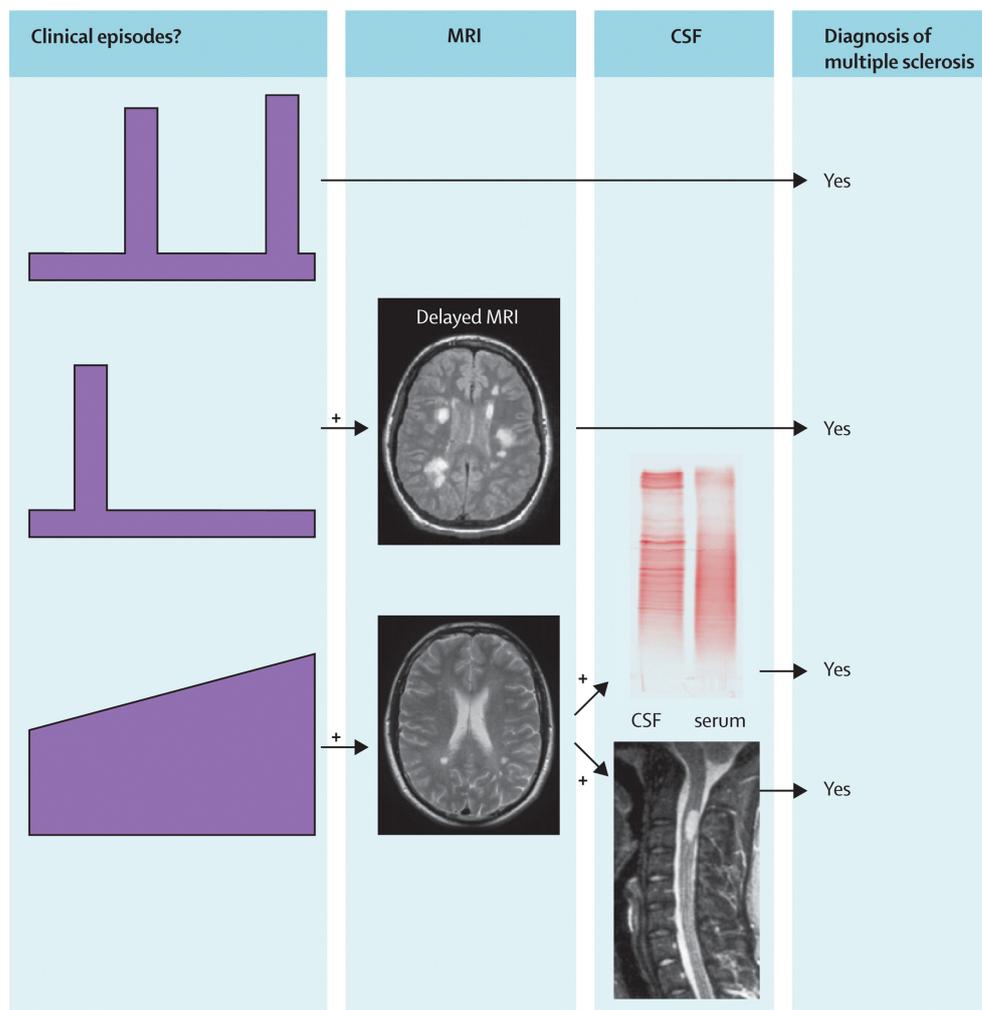


Abb. 1.1: Diagnosekriterien der Multiplen Sklerose (Compston et Coles 2008)

Obwohl sich die Darstellung auf alte Richtlinien für die Diagnose einer MS bezieht, zeigt sie übersichtlich das Zusammenspiel der Komponenten (u.a. klinische Symptomatik, MRT-Diagnostik ZNS, Liquordiagnostik), die für eine Diagnose benötigt werden. Räumliche und zeitliche Dissemination führen zur Diagnose einer Multiplen Sklerose. Klinische Episoden können schubweise oder progredient verlaufen. Im MRT des Schädels oder Rückenmarks lassen sich hyperintense Läsionen in verschiedenen Bereichen des ZNS finden und zeitlichen Abschnitten zuordnen. Zusätzliche Oligoklonale Banden im Liquor ermöglichen die Diagnose einer MS. (Thompson et al. 2018)

Im weiteren Verlauf bleibt die NNO auf den Sehnerv isoliert (The optic neuritis study group 2008). Als Leitsymptome einer NMOSD sind der Befall des Sehnervs und das Rückenmarks zu nennen. (Lucchinetti 2014)

Im Vergleich zur MS verläuft die NMOSD oft schwerer und eine Optikusneuritis tritt nicht selten bilateral auf. Sichtbare Läsionen finden sich im MRT bei der MS meist periventrikulär, bei der NMOSD hingegen überwiegen Läsionen im Rückenmark ab dem 3. Segment. Oligoklonale Banden lassen sich hauptsächlich bei der MS nachweisen. (Wingerchuk 2007)

Die Akut disseminierte Enzephalomyelitis (ADEM) hingegen tritt überwiegend bei Kindern und monophasisch auf. Die neurologischen Defizite werden von einem allgemeinen Krankheitsgefühl (Kopfschmerz, Erbrechen, Schwäche) begleitet und können einen fulminanten Verlauf bis hin zu Koma oder Tod nehmen. (Young et al. 2010, Pohl et al. 2006)

1.1.1 Epidemiologie

Die Multiple Sklerose ist mit einer Inzidenz von 2500 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen, vor allem im jungen Erwachsenenalter. Frauen sind doppelt so häufig betroffen als Männer (DMSG2013), wobei Studien der letzten Jahre ein noch höheres Krankheitsrisiko für Frauen vermuten lassen (Alonso et al. 2008, Compston et al. 2008). Das mediane Erkrankungsalter liegt zwischen 20 und 40 Jahren, wobei kindlichen MS Formen (2-10 % der MS-Patienten sind jünger als 18 Jahre (Waldman et al. 2015) und eine Erstmanifestation nach dem 60. Lebensjahr als selten angesehen werden (DMSG2013). Noch ungeklärt ist das höhere Erkrankungsrisiko z.B. der Europäer. Für Menschen aus Regionen mit zunehmendem Abstand zum Äquator steigt die Wahrscheinlichkeit an einer MS zu erkranken (*Abb. 1.2*), wobei hier vor allem die Zeit von Geburt bis ins junge Erwachsenenalter prägend erscheint. Als Risikofaktor kann hier ein möglicher Vitamin-D-Mangel diskutiert werden. (Compston et Coles 2008)

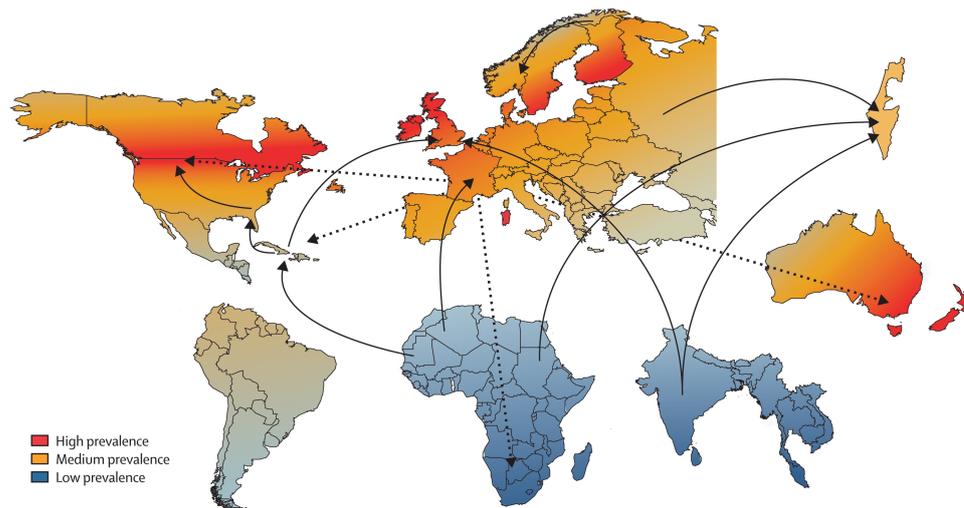


Abb. 1.2: Regionenbezogene MS-Häufigkeit (Compston et Coles 2008)

Darstellung der weltweiten Verteilung des Risikos an Multiple Sklerose zu erkranken. Die Pfeile stellen Migrationen zwischen Hoch- und Niedrig-risiko Gebieten dar.

Im Vergleich zur MS liegt das mediane Erkrankungsalter der NMOSD bei 39 Jahren etwas höher. Frauen sind neun mal häufiger betroffen als Männer. Das weltweite Verteilungsmuster ähnelt dem der MS. (Wingerchuk et al. 2007) Die Daten zur Prävalenz sind ungenau, nach Etemadifar et al. (2015) liegt diese bei 1,3 pro 100.000 Einwohner in Deutschland. Grund für die erschwerte Datenerhebung ist eine oft fälschlicherweise diagnostizierte MS. Damit ist anzunehmen, dass die NMOSD seltener als die MS in Deutschland ist.

Das Haupterkrankungsalter der ADEM liegt zwischen 3-8 Jahren. Nach einer Kohortenanalyse läge die Inzidenz in Deutschland bei ca. 0,07 pro 100.000 Einwohner mit einer etwas höheren Erkrankungshäufigkeit bei den Jungen gegenüber den Mädchen. (Pohl et al. 2007)

Die Inzidenz der isolierten NNO (Neuritis nervi optici, oder auch Optikusneuritis, Sehnervenentzündung bzw. Retrobulbärneuritis genannt) lässt sich auf ca. 3-4 pro 100.000 Einwohner schätzen, wobei hier auch Erstmanifestationen von MS einberechnet sind. (Langer-Gould et al. 2014, GBE des Bundes, AWMF-Leitlinie 2018 Optikusneuritis)

Das Risiko, nach einer Optikusneuritis an einer Multiplen Sklerose innerhalb der nächsten 15 Jahre zu erkranken, liegt bei 50 %. (The optic neuritis study group 2008) Bei ca. 50 % der NMOSD-Patienten ist die Optikusneuritis die Erstmanifestation. (Morrow 2012)

Isolierte Verlaufsformen sind eher selten, oft ist die Retrobulbärneuritis ein Frühsymptom einer MS oder einer NMO.

1.1.2 Pathophysiologie

Der genaue Pathomechanismus der autoimmunentzündlichen Erkrankungen ist noch unbekannt. Die entzündlichen Läsionen werden jedoch von fehlgeleiteten Immunzellen ausgelöst. Es gibt Hinweise darauf, dass virale Infektionen oder Umwelteinflüsse, wie Vitamin D-Mangel als Auslöser der Multiplen Sklerose anzunehmen sind. So lassen aktuelle Forschungsergebnisse weiterhin einen möglichen Zusammenhang zwischen Virusinfektionen insbesondere einer latenten EBV (Epstein-Barr-Virus) - Infektion und aktiven MS-Läsionen vermuten. (Tzartos et al. 2012, Ascherio et Munger 2007, Ascherio et Munger 2007, Ruprecht et al. 2018, Reich et al. 2018)

Eine genetische Disposition ist ebenfalls in Betracht zu ziehen, da vor allem Zwillinge ein erhöhtes Risiko (ca. 30 %) besitzen an MS zu erkranken (Compston et coles 2008). Olerup et al. (1991) konnten zeigen, dass eine Assoziation zu den Human-Leucocyte-Antigen (HLA) DRB1-15 besteht. Derzeit werden eine Reihe von Allelen untersucht, die ebenfalls eine Assoziation vermuten lassen. So scheinen auch die Gene des Interleukin-2-Rezeptors (IL-2RA), sowie des Interleukin-7-Rezeptors (IL-7RA) eine Rolle zu spielen. (Grigorian 2012)

Eine wichtige Rolle bei der Autoimmunreaktion spielen die T-Zellen. Diese werden in der Peripherie aktiviert und können durch Adaptation an Endothelzellen die Blut-Hirn-Schranke durchqueren. Die erhöhte Permeabilität hat vermutlich ihre Ursache in viralen Infektionen oder genetischen Faktoren. Im Zentralen Nervensystem erkennen die T-Zellen ihnen präsentierte Antigene und lösen eine Entzündungsreaktion aus. Die durch Zytokine (Interleukine, Interferon γ , Tumornekrosefaktor TNF α) getriggerte Entzündungsreaktion fördert die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke und setzt weitere immunologische Prozesse in Gang. Fälschlicherweise erkennen die T-Zellen allerdings körpereigene Antigene, z.B. Myelinproteine, die eine hohe Ähnlichkeit zu Fremdanitigenen aufweisen (molekulares mimikry). Durch die proinflammatorischen Zytokine der T-Zellen werden auch Makrophagen und B-Zellen stimuliert, das körpereigene Gewebe anzugreifen. Dadurch werden die körpereigenen Zellen zerstört. Zunächst gehen die Oligodendrozyten, welche die Myelinscheiden bilden, zugrunde (Demyelinisierung) und im weiteren Verlauf die Neurone selbst. Der Untergang der Myelinscheiden ist in sehr geringem Maß reversibel, nicht allerdings der Untergang der Neurone. (Noseworthy 2000, Multiple Sklerose Schmidt/Hoffmann 2012, Hohlfeld et al. 2016 (A), Hohlfeld et al. 2016 (B)) (Abb. 1.3)

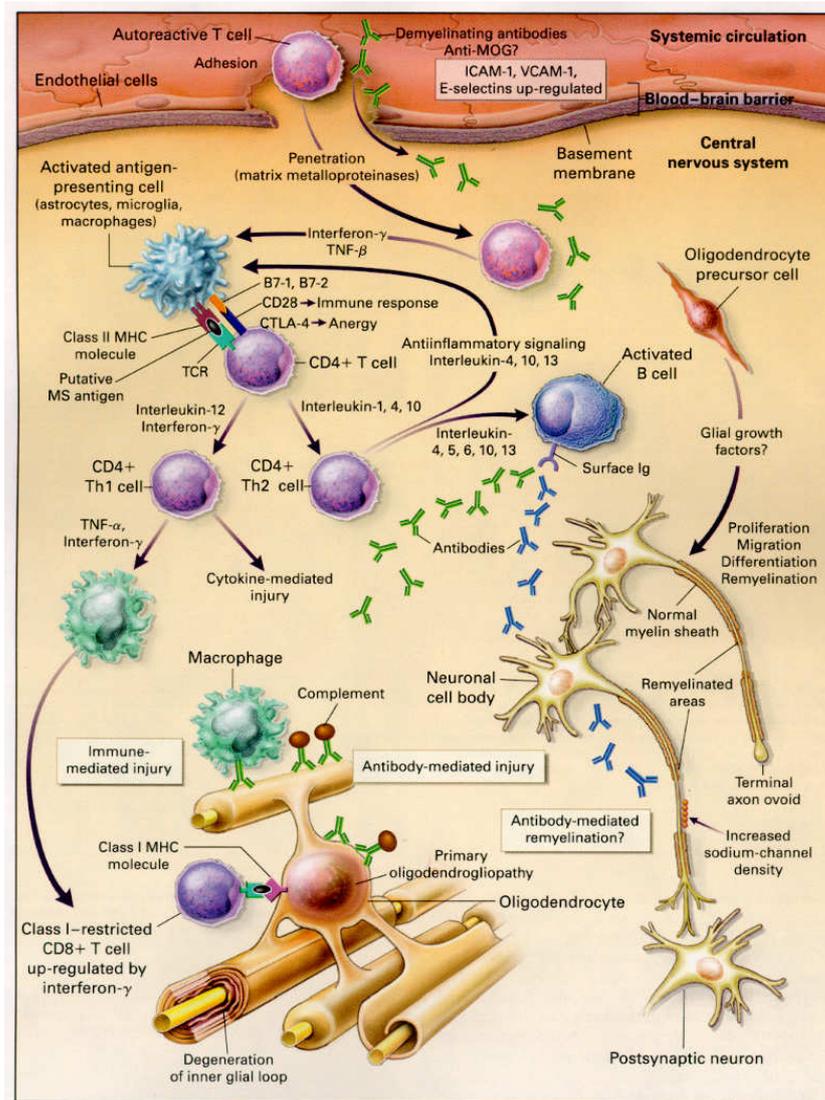


Abb. 1.3: Pathophysiologie der MS (Noseworthy 2000)

Aktiviert T-Zellen passieren die Bluthirnschranke und erkennen körpereigene Antigene wie Myelinproteine. Durch immunologische Prozesse werden zunächst Oligodendrozyten, später auch Neurone angegriffen. Es kommt zur Demyelinisierung der Neurone und zu einem Funktionsverlust.

Histopathologisch sind während der akuten Entzündungsreaktion Infiltrate aus T-Zellen, Makrophagen und B-Zellen zu sehen (Abb. 1.4). Begleitet wird die Reaktion von Ödemen. Der Körper setzt Reparaturmechanismen in den Entmarkungsherden in Gang und aktiviert Astrozyten, welche proliferieren. Diese bilden allerdings nur ein Art Narbengewebe (Gliose), was nicht die ursprüngliche Funktionsfähigkeit wiederherstellt.

Die Demyelinisierung bzw. der Zelluntergang zeigt sich letztendlich klinisch in neurologischen Ausfallerscheinungen, wobei diese histopathologisch nicht zwingend mit dem klinischen Verlauf korrelieren.

In späten Stadien schreitet die Demyelinisierung kortikal (zerebral und zerebellar) fort. (Popescu 2013, Kutzelnigg et al. 2007, Lassmann 2019)

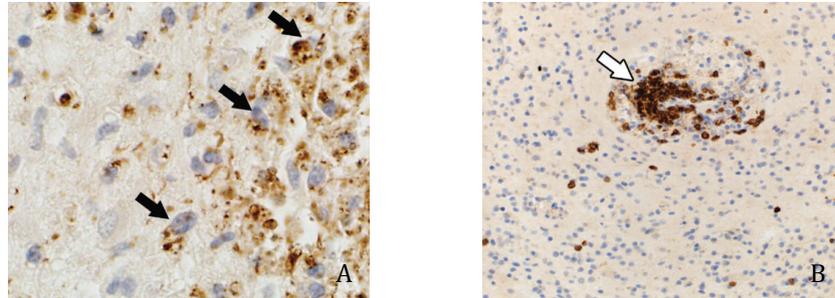


Abb. 1.4: Histologisches Schnittpräparat von MS-Läsionen (Popescu 2013)

- A) Aktive Demyelinisierung:
hyperzellulär infiltrierte Gewebe, u.a. Myelin beladene Makrophagen (Pfeil)
(Myelin Proteolipid-Protein Immunhistochemische Färbung)
- B) Perivaskuläres Infiltrat von T-Zellen (Pfeil)
(Lymphozyten Immunhistochemische Färbung)

Ebenfalls Infiltrate von Immunzellen in Läsionen finden sich sowohl bei der NMOSD (Brück 2012), als auch bei der ADEM und lassen auf ähnliche Umbauprozesse schließen. (Popescu 2013)

1.2 Die Rolle der Autoantikörper bei der NMOSD und der MS

Die Liquoruntersuchung von NMOSD oder MS Patienten zeigt oft eine Pleozytose, bestehend aus u.a. Lymphozyten und Plasmazellen. Zudem sind intrathekale synthetisierte Immunglobuline nachweisbar. Der Nachweis der Liquorspezifität der Immunglobuline gelingt durch die isoelektische Fokussierung. Die Auftrennung der Proteine aus dem Liquor veranschaulicht oligoklonale IgG-Banden (OKB) im Vergleich zum Serum. (Abb. 1.1) Diese sind ein Beweis für die Aktivität der B-Zellen im zentralen Nervensystem und deren Produktion von Immunglobulinen. OKBs sind bei der Mehrzahl der MS-Patienten zu finden. (Wingerchuk et al. 2007, Compston et Coles 2008, Correale et al. 2002) Oft lassen sich auch Antikörper gegen Mumps, Masern oder Röteln nachweisen, die sogenannte MRZ-Reaktion. Allerdings ist noch unklar, warum bei vielen MS-Patienten diese im Gegensatz zum Serum erhöht sind. (Reiber et al. 1998)

Bei MS-Patienten finden sich Antikörper gegen Myelinbestandteile, wie das basische Myelinprotein (MBP), so dass diskutiert wird, welche Rolle diese in der Pathogenese spielen. Als mögliche Angriffsfläche für Autoantikörper stellt sich das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) dar, ein Glykoprotein in der äußeren Schicht von Oligodendrozyten, welches nur im zentralen Nervensystem exprimiert wird (*Abb. 1.5*). Die Funktion des Proteins ist noch weitestgehend unbekannt. (Reindl et Waters 2019, Mayer et Meinl 2012)

Experimentell konnte gezeigt werden, dass anti-MOG IgG eine Demyelinierung auslösen können (im Model des EAE = experimental autoimmune encephalomyelitis, induziert durch CD4+ T-Zellen), welche mit humanen MS-Läsionen vergleichbar ist. (Linnington et al. 1988, Meinl 2011, Wekerle 2008) Aus einer aktuellen Analyse geht hervor, dass aufgereinigte spezifische MOG-Antikörper aus humanen Proben (von Patienten mit entzündlichen demyelinisierenden Erkrankungen) nach Transfer ins Tier dort zu einer vergleichbaren Demyelinisierung führen (Spadaro et al 2018). Derzeit ist noch nicht klar erwiesen, ob anti-MOG-Ak oder andere Autoantikörper als prädiktive Faktoren für eine MS angesehen werden können. (Meinl et al. 2010) Eine Korrelation der anti-MOG zu entzündlichen demyelinisierenden Erkrankung scheint allerdings zu bestehen, der genaue Pathomechanismus ist aber noch nicht geklärt. (Reindl et Waters 2019) Hingegen bei der kindlichen MS oder ADEM werden anti-MOG-Ak bereits für prognostisch relevant gehalten. (Pröbstel et al. 2011)

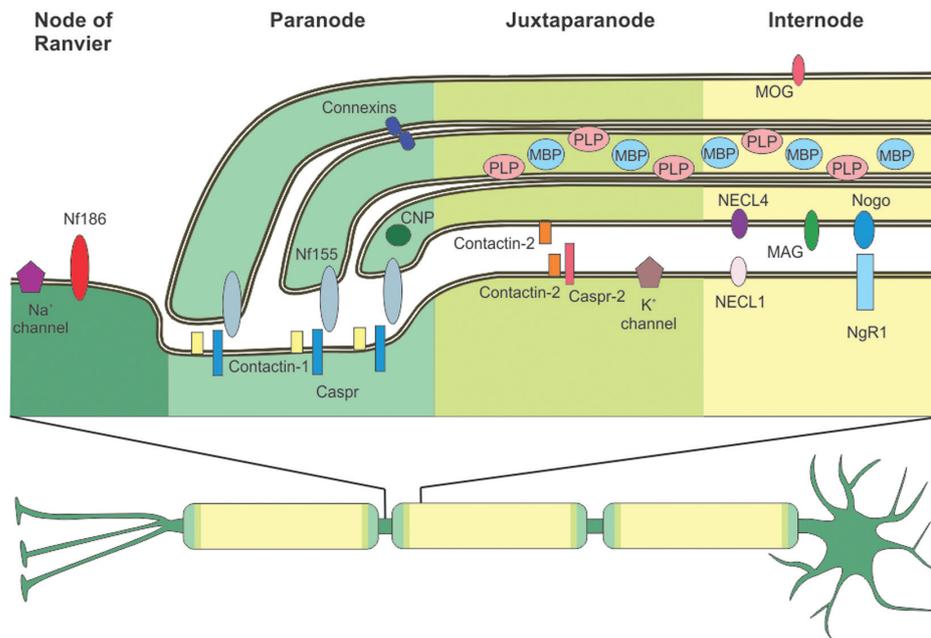


Abb. 1.5: Antigene der Oligodendrozyten (Mayer et Meisl 2012)

Vergrößerte Darstellung eines Neurons und dessen Oligodendrozyten an einem Ranvierschen Schnürring. Die Oligodendrozyten (gelb) umhüllen dabei spiralförmig die Neurone (grün). An den kleinen Lücken die dabei zwischen den Oligodendrozyten entstehen, liegen die Neurone frei. Diese Bereiche werden Ranviersche Schnürringe genannt. Mögliche Antigene der Myelinschicht für Autoantikörper bei der Multiplen Sklerose sind MOG (Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein) an der Oberfläche und MBP (basisches Myelinprotein) im Inneren des Myelins. Weitere Angriffsstellen sind Proteine wie das Neurofascin 186 und 155 am Ranvierschen Schnürring.

Antigene des Myelins wie Neurofascin oder Contactin-2 stellen weitere Angriffspunkte bei demyelinisierenden Erkrankungen dar. Diese Proteinbestandteile befinden sich vorwiegend an den Ranvierschen Schnürringen. Zwei Formen des Neurofascin können hierbei unterschieden werden, ein axonales (NF186) und ein gliales Neurofascin (NF155). NF155 bildet mitunter die Zytoarchitektur aus und NF186 ist an einen spannungsabhängigen Natriumkanal gekoppelt, welcher an der Weitergabe des Aktionspotenzials am Ranvierschen Schnürring beteiligt ist. (Meisl et al. 2010, Meisl 2011) Autoantikörper gegen Neurofascin sind bei ca. 10 % der Patienten mit Chronisch inflammatorischen demyelinisierenden Polyneuropathie (CIDP) nachweisbar, was einen möglichen Rückschluss über die Pathogenität dieser Antikörper zulässt. Bei der CIDP findet die Demyelinisierung im peripheren Nervensystem statt. (Ng et al. 2012, Vural et al. 2018, Kurzlehrbuch Neurologie Bender/Rémi/Feddersen/Fesl 2015, Manso et al. 2019) Die Rolle der NF-Ak bei der MS ist nach wie vor unklar. (Mathey et al. 2007)

Spezifisch für die NMOSD ist der Antikörper gegen Aquaporin-4, einem Wasserkanal der Astrozyten, welcher vornehmlich auf Sehnerv, Hirnstamm und Rückenmark exprimiert wird

(Lehrbuch Neurologie Sitzer/Aksu 2011). Hier gibt es zwei Isoformen M1 und M23. (Crane et Verkam 2009) Serum anti-AQP4-Ak scheinen hier vor allem die kürzere M23-Isoform zu binden (*Abb. 1.6*). Antikörper gegen den Wasserkanal sind somit nicht nur diagnostische Marker, sondern auch pathogene Faktoren und bei einer Vielzahl (aktuelle Daten variieren, liegen aber bei ca. 70%) von NMOSD-Patienten nachweisbar (Mader et al. 2011, Takahashi 2007, Kurzlehrbuch Neurologie Bender/Rémi/Feddersen/Fesl 2015). Noch ungeklärt ist allerdings der Ursprung der Antikörper. Zu erwähnen ist, dass bei manchen Patienten mit NMOSD Antikörper gegen MOG nachweisbar sind. (Wingerchuk et al. 2015)

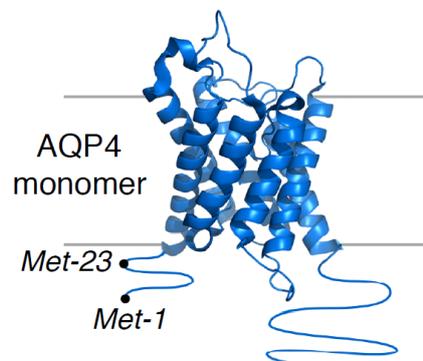


Abb. 1.6: Aufbau Aquaporin-4 (Crane et al. 2011)
Proteinarchitektur des Aquaporin-4 mit Isoformen M1 und M23. Der Wasserkanal spielt eine Rolle bei der Wasserhomöostase. (Wingerchuk 2012)

Im Bereich der Area Postrema ist die Bluthirnschranke weniger dicht ausgebildet als in anderen Hirnregionen, daher haben dort Antikörper leichter einen Zugang zum ZNS. Ob eine Schrankenstörung vorliegt oder intrathekal Immunglobuline gebildet werden, lässt sich herausfinden, wenn man die Immunglobuline und das Albumin aus Serum und Liquor vergleicht. Dies kann im Reiber-Diagramm (*Abb. 1.7*) verdeutlicht werden, welches den Liquor-Serum Quotienten der Immunglobuline gegen Albumin darstellt. Bei manchen Patienten mit chronisch-entzündlichen Erkrankungen des ZNS lässt sich durch das Reiber-Diagramm die vermehrte intrathekale IgG-Synthese nachweisen. (Reiber et al. 1998, Reiber 1998)

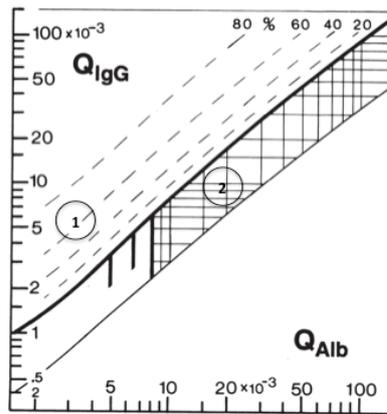


Abb. 1.7: Reiber-Diagramm (Reiber 1998)

Diagramm nach Reiber, Albumin- und Ig-Quotienten aus Serum und Liquor gegeneinander aufgetragen; empirisch ermittelte Grenzlinie. 1) Intrathekale IgG-Synthese 2) Störung der Blut-Hirnschranke.

Bei starken Schüben der Erkrankung kann es daher von Nutzen sein, eine Plasmapherese (Blutwäsche) durchzuführen, um autoreaktive Immunglobuline auszuschwemmen.

Ebenso kann ein Schub durch die Gabe von Intravenösem Immunglobulin G oder Methylprednisolon abgemildert werden. Monoklonale Antikörper, wie Rituximab (anti-CD20-Ak), können die weitere Interaktion von B-Lymphozyten (Träger des Oberflächenantigens CD20) hemmen und werden daher zur Eskalationstherapie eingesetzt. Insgesamt werden immunmodulatorische Medikamente als Dauertherapie zusätzlich zur symptomatischen Therapie im schubfreien Intervall eingesetzt. (Papadopoulos et al. 2014, Wingerchuk et al. 2007, Hauer et al. 2008, AWMF-Leitlinie 2014 Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose)

Die Therapie der NMOSD unterscheiden sich sowohl im Schub als auch im Verlauf sehr von der einer MS. Azathioprin und Methotrexat (Immunsuppressiva) haben sich bei der NMOSD als Dauertherapie bewährt, wohingegen Fingolimod (unterdrückt Lymphozytenwanderung) (Kappos et al. 2010) oder Natalizumab (Antikörper, welcher die Migration von Lymphozyten hemmt) (Polman et al. 2006) als Medikation der MS vorbehalten sind. (Wingerchuk 2012, Kurzlehrbuch Neurologie Bender/Rémi/Feddersen/Fesl 2015) Langzeitstudien haben gezeigt, dass Rituximab als Medikament einsetzbar ist und zur Stabilisierung bei NMOSD Patienten der klinischen Symptome führen kann. (Pellkofer et al. 2011)

1.3 Glykosylierung von Antikörpern

Die Antikörper scheinen eine zentrale Rolle bei neuroimmunologischen Erkrankungen zu spielen. Im Serum ist die meist vertretene Antikörperklasse das IgG. Der Aufbau der Immunglobuline G besteht aus zwei leichten und zwei schweren Polypeptidketten, wobei die variablen Teile Fab durch je einen Teil der schweren und einen Teil der leichten Kette gebildet werden und der konstante Teil Fc allein aus schweren Ketten besteht. Bei Immunglobulinen der Gruppe G finden sich im Bereich des Fc-Teils Zuckerketten. (Abb. 1.8) Diese Glykosylierungen beeinflussen über ihre Zusammensetzung die Struktur und damit die Aktivität des Fragments. Die Oligosaccharide sind an der Aminogruppe der Aminosäure Asparagin 297 gebunden. (Selman et al. 2011, Arnold et al. 2007)

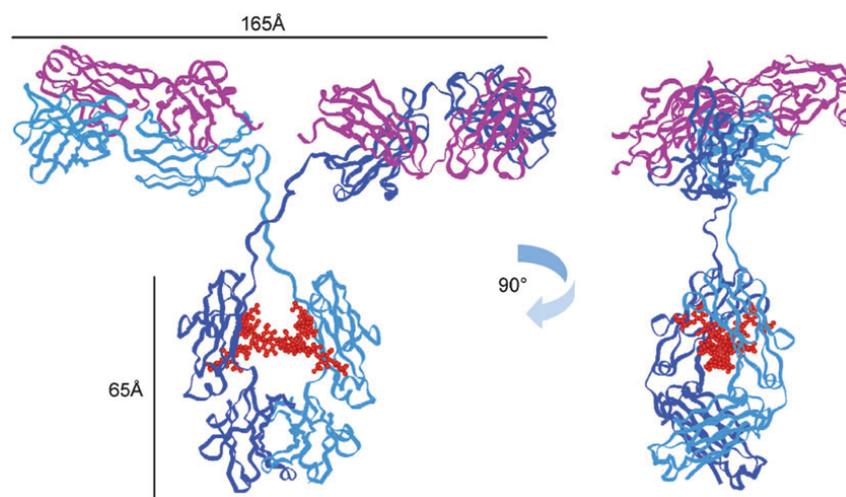


Abb. 1.8: Aufbau von IgG mit Glykosylierung (Arnold et al. 2007)

Die y-artige Struktur ergibt sich aus den schweren (blau) und leichten Ketten (lila). Die Glykosylierung (rot) stabilisiert und modelliert den Fc-Teil des Antikörpers.

Innerhalb der Immunglobulingruppe G können vier Untergruppen IgG1-4 unterschieden werden. Jede Untergruppe zeigt eine Variante in der Glykosylierungssequenz. Ebenso scheint die Sequenz bei physiologischen, sowie pathologischen Prozessen zu variieren. (Huhn et al. 2009, Wuhrer et al. 2015) Die Untergruppen der Immunglobuline G unterscheiden sich auch in der Häufigkeit ihres Vorkommens. Im Serum ist die Subklasse IgG1 am häufigsten zu finden, wie auch bei der MS in den Oligoklonalen Banden des Liquors.

(Correale et al. 2002, Janeway Immunologie Murphy/Travers/Walport 2009, Losy et al. 1990)

1.3.1 Fc γ -Rezeptor-Aktivierung

Die Fc γ -Rezeptoren lassen sich ebenso wie die Immunglobuline in Unterklassen (Fc γ I-III, FcRn) aufteilen. Sie gehören zu einer Familie von Fc-Rezeptoren, wobei die Fc γ -Rezeptoren Immunglobuline G binden. (Lisi et al. 2011, Nimmerjahn et al. 2008)

Die Zellen des Immunsystems exprimieren jeweils Isotypen dieser Rezeptoren. Der Fc γ I-Rezeptor ist vornehmlich auf Makrophagen und Monzyten zu finden, wohingegen auf B-Zellen der Fc γ IIB-Rezeptor zu finden ist. (Bruhns 2012)

Die Tabelle 1.1. zeigt eine Zusammenstellung von Fc γ -Rezeptoren, sowie ihre Vorkommen und Bindungsaffinitäten, ebenso wie den Vergleich von humanen zu Maus Rezeptoren.

Bei der Maus ist die Nomenklatur der Rezeptoren die gleiche wie beim Menschen, allerdings gibt es keine Fc γ IIA-, Fc γ IIC- und Fc γ IIIB-Rezeptoren, dafür allerdings einen Fc γ IV-Rezeptor, welcher beim Menschen nicht vorkommt. Vergleicht man die Rezeptortypen von Maus und Mensch unabhängig von ihrer Struktur eher im Hinblick auf die Funktionalität mit Expressionsmuster und Ligandenbindung, wären sich zum Beispiel der Fc γ RIV und der hFc γ IIIA bzw. hFc γ I am ähnlichsten. (Bruhns 2012)

Fc-Rezeptoren												
HUMAN						MAUS						
Fc-Rezeptor Name	Bindung	Affinität	Zelltyp	Effektorfunktion	Motiv	← Vergleich →	Fc-Rezeptor Name	Bindung	Affinität	Zelltyp	Effektorfunktion	Motiv
FcγRI (CD64)	IgG1 IgG3 IgG4	↑	Basophile Dendritischen Zellen Makrophagen Mastzellen Monozyten Neutrophile	Zellaktivierung	ITAM		FcγRI	IgG2a IgG2b IgG3	↑↓	Dendritischen Zellen	Zellaktivierung	ITAM
FcγRIIA (CD32A)	IgG1 IgG2 IgG3 IgG4	↓	Dendritischen Zellen Eosinophile Makrophagen Monozyten Neutrophile	Zellaktivierung	ITAM							
FcγRIIB (CD32B)	IgG1 IgG2 IgG3 IgG4	↓	Basophile B-Zellen Dendritischen Zellen Makrophagen Monozyten Neutrophile NK-Zellen	Inhibierung Zellfunktion	ITIM		FcγRIIB	IgG1 IgG2a IgG2b	↓	Basophile B-Zellen Dendritischen Zellen Eosinophile Makrophagen Mastzellen Monozyten Neutrophile	Inhibierung Zellfunktion	ITIM
FcγRIIC (CD32C)	IgG1 IgG2 IgG3 IgG4	↓	Makrophagen Monozyten Neutrophile NK-Zellen	Zellaktivierung	ITAM							
FcγRIIIA (CD16A)	IgG1 IgG2 IgG3 IgG4	↓↑	Makrophagen Monozyten NK-Zellen	Zellaktivierung	ITAM		FcγRIII	IgG1 IgG2a IgG2b	↓	Basophile Dendritischen Zellen Eosinophile Makrophagen Mastzellen Monozyten Neutrophile NK-Zellen	Zellaktivierung	ITAM
FcγRIIIB (CD16B)	IgG1 IgG3 IgG4	↓	Basophile Neutrophile	Nicht bekannt	GPI							
							FcγRIV	IgG2a IgG2b	↑	Makrophagen Monozyten Neutrophile	Zellaktivierung	ITAM
FcRn	IgG1 IgG2 IgG3 IgG4	↑	Antigen-präsentierende Zellen Dendritischen Zellen Endothelzellen vaskulär Epithelzellen intestinal Makrophagen Monozyten Neutrophile Synctiotrophoblasten	IgG-Recycling Transport IgG-Ag			FcRn	IgG1 IgG2a IgG2b IgG3	↑	B-Zellen Dendritischen Zellen Endothelzellen vaskulär Epithelzellen intestinal Makrophagen Monozyten Neutrophile	IgG-Recycling	

Tab. 1.1: Übersicht der Fcγ-Rezeptoren bei Mensch und Maus

Die Tabelle zeigt eine Zusammenstellung der gängigen Fcγ-Rezeptoren und deren Bindungsaffinität zu den Immunglobulinklassen, sowie welche Zelltypen die Rezeptoren exprimieren. Dabei gibt es aktivierende (ITAM) und inhibierende (ITIM) Domänen, die an die Rezeptoren gekoppelt sind und somit den Ligandeneffekt beeinflussen. Im Vergleich zu den humanen Fc-Rezeptoren stehen die analog benannten Rezeptoren der Maus. Diese Nomenklatur ist allerdings nach der Beschaffenheit getroffen, daher muss ein genauerer Vergleich in der Funktionalität erfolgen. Zudem sind nicht alle Rezeptortypen bei Maus und Mensch zu finden. So ist der FcγIV-Rezeptor nur bei der Maus vorhanden, wohingegen FcγIIA-, FcγIIC-, sowie FcγIIB-Rezeptoren nur beim Menschen vorkommen. (Bruhns 2012)

Die IgG Subklassen zeigen unterschiedliche Bindungsaffinitäten zu Fcγ-Rezeptoren, was die Signalintensität zur Aktivierung des Rezeptors beeinflusst. IgG1 weist dabei die stärkste Affinität zu den humanen Rezeptoren auf, vor allem am FcγI-Rezeptor. Eine Signalübertragung über andere Fcγ-Rezeptoren als FcγRI kommt vorwiegend durch multivalente IgG-Antigen Immunkomplexe zustande, denn diese Immunkomplexe ergeben eine hohe Avidität in den Fc-FcγR Interaktionen. (Bournazos et al. 2017)

Bis auf den FcγIIB-Rezeptor, welcher eine inhibierende Wirkung nach Bindung von IgG induziert, haben alle humanen und Maus Isotypen der Fcγ-Rezeptoren eine aktivierende

Wirkung (Abb. 1.9). IgGs können damit sowohl einen pro- wie auch antiinflammatorischen Wirkmechanismus bedingen. (Bruhns 2012)

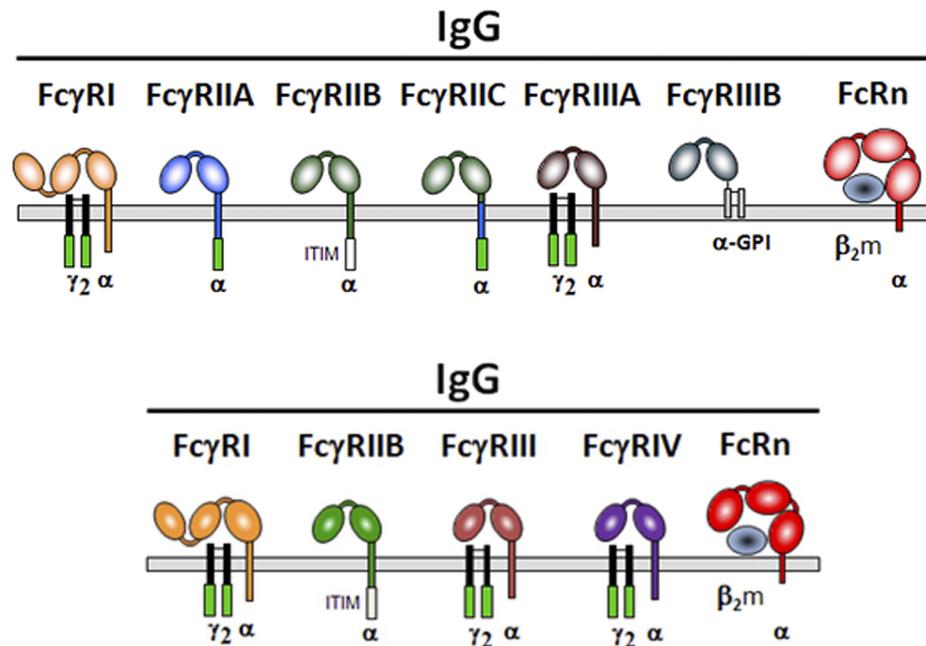


Abb. 1.9: Schematische Darstellung der humanen (oben) und Maus (unten) Fc γ -Rezeptoren (Bruhns 2012)

Die obige Abbildung zeigt die humanen Rezeptoren, die untere die Maus Fc γ -Rezeptoren.

Es wird davon ausgegangen, dass die Fc γ -Rezeptoren eine transmembrane Struktur mit einem zyttoplasmatischen Anteil darstellen. Die Signalvermittlung nach Bindung eines Antikörpers findet an der zyttoplasmatischen Region mittels aktivierenden Domänen (ITAM = *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) oder inhibierenden Domänen (ITIM = *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) statt. Eine Ausnahme stellt der Fc γ -RIIb (human) dar, da dieser keine direkte Verbindung zum Zytoplasma aufweist und die Aktivierung noch unklar ist.

Die Zuckerketten (Abb. 1.10) scheinen dabei eine maßgebliche Rolle in der Aktivierung von Fc-Rezeptoren zu spielen. Die verschiedenen Arten der Glykosylierungen bedingen die Form des Fc-Fragments des Antikörpers, wodurch die Bindungsfähigkeit zu dessen Fc-Rezeptoren beeinflusst und letztendlich die Aktivierung des Rezeptors verändert wird. (Wuhrer et al. 2007, Kaneko et al. 2006)

Es liegt daher die Frage nahe, ob die Zuckerketten von Antikörpern experimentell modifiziert werden können und somit die Aktivierung durch den Antikörper verstärkt oder vermindert werden kann.

Mittels enzymatischer Spaltungen der Oligosaccharide konnten Allhorn et al. (2010) die reduzierten Effektorfunktionen von anti-D der roten Blutkörperchen nachweisen. Diese

These konnten auch Nandakumar et al. (2007) bestätigen, indem Endoglykosidase modifizierte Antikörper *in vivo* eine abgeschwächte Form der Arthritis-Induktion zeigten.

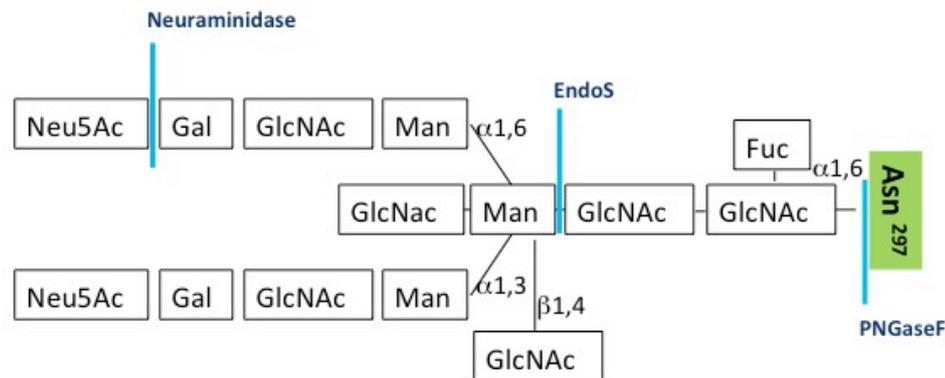


Abb. 1.10: Glykosylierung des Fc-Teils von IgG mit Spaltungsstellen der verwendeten Enzyme

Grundaufbau der Glykosylierung an Asparagin 297.

Die Neuraminidase spaltet die Neuraminsäure endständig ab und PNGaseF die gesamte Zuckerkette.

EndoS spaltet die Oligosaccharide an der Verbindung zwischen Mannose und N-Acetylglucosamin.

Neu5Ac: Neuraminsäure; *Gal*: Galactose; *GlcNAc*: N-Acetylglucosamin; *Man*: Mannose;

Fuc: Fucose; *Asn*: Asparagin

(Bondt et al 2014, Kaneko et al. 2007, Nandakumar et al.2007, Collin et Olsén 2001)

1.3.2 C1q-Komplement Aktivierung

Am Anfang der klassischen Komplement-Kaskade zur Abwehr von Krankheitserregern steht das C1, welches aus zwei Proteinuntereinheiten C1q und C1rC1s-Komplex zusammen gesetzt ist. C1q fungiert als Erkennungsregion und C1rC1 als katalytische Einheit.

Bei Aktivierung des Komplement Systems auf dem klassischen Weg, wird der Fc-Rezeptor an dem Protein C1q gebunden. Die daraus resultierende Konfirmationsänderung des C1q setzt die katalytischen Prozesse des (C1r:C1s)₂-Komplexes in Gang und initiiert damit die Komplementkaskade. (Janeway Immunologie Murphy/Travers/Walport 2009, Basta et al.1991)

Auch hier lässt sich eine veränderte Aktivierung nach Deglykosylierung der Antikörper vermuten. So konnten bereits Leatherbarrow et al. (1985) eine reduzierte C1q Bindungsaffinität, sowie eine verminderte Komplementaktivierung zeigen.

1.4 Zielsetzung

Autoantikörper sind maßgebliche Effektoren bei verschiedenen, entzündlichen Autoimmunerkrankungen des zentralen und peripheren Nervensystems. Die Rolle der Glykosylierungen von Autoantikörpern steht im Fokus der Arbeit, um mehr über das Erkennen von Zielstrukturen der Antikörper und deren Induktion von Effektorfunktionen zu erfahren.

Zur Analyse wurde zum einen mit Neurofascin-Antikörpern und zum anderen mit Aquaporin-4-Antikörper gearbeitet.

Der monoklonale Antikörper gegen Neurofascin, welcher im Tiermodell die experimentell ausgelöste autoimmune Enzephalitis verstärkt und einen Axonschaden induziert, wurde mit verschiedenen Glykosidasen behandelt. Anschließend wurde untersucht, inwieweit die Antigenerkennung durch eine Deglykosylierung des Antikörpers beeinflusst wird und welchen Effekt die Deglykosylierung auf Fc-Rezeptor-vermittelte Stimulation einer monozytären Zelllinie hat.

Der ebenfalls verwendete Autoantikörper gegen Aquaporin-4 findet sich bei NMOSD Patienten.

Um in einem Zell-basierten Assay die Antikörper-Antigen-Erkennung dieser IgGs überprüfen zu können, wurde zunächst eine mit AQP4 stabil transfizierte Zell-Linie etabliert. Die gleichen Glykosidasen wie zuvor bei den NF-Ak dienten zur Präparation der IgG.

Die Ergebnisse sind die Basis für weitere Untersuchungen des Einflusses der Glykosylierungen der Antikörper auf ihre Effektorfunktionen in vitro und in Tiermodellen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patientenmaterial

Die verwendeten Plasmapheresen (PPH) stammen von NMOSD-Patienten. Die Arbeitsgruppe von Prof. Reindl stellte die Proben zur Verfügung (Universitätsklinik für Neurologie, Innsbruck). Die humanen Proben enthalten für die NMOSD typische AQP4-Antikörper, welche mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt wurden (ausführliche Beschreibung in 2.2.2.1). Sowohl die Plasmapherese, wie auch die aufbereiteten Proben wurden bei -80 °C gelagert.

2.1.2 Labormaterial

2.1.2.1 Geräte

Die folgende Tabelle 2.1 führt die verwendeten Geräte mit Name und Hersteller auf.

Tabelle 2.1

Gerät	Name	Hersteller
Blot Kammer		MPI Werkstatt
Thermocycler	Mastercycler gradient	Eppendorf AG
	DNA Engine, Peltier Thermal Cycler	Bio-Rad Life Science
ELISA Reader	VICTOR ² 1420 Multilabel Counter	Perkin Elmer
FACS Gerät	FACS Calibur	Becton Dickinson
FPLC-Anlage		(initial) Pharmacia

Material und Methoden

Geldokumentation	Perfection 4990 Photo	Epson
Gelelektrophorese		MPI Werkstatt
Heizblock	Blockthermostat BT 100	Kleinfeld
Laminar Air Flow Hood	Safe 2020	Thermo Fisher Scientific
Inkubatoren	Hareaus® BBD 6220	Thermo Fisher Scientific
Kühlschrank	4 °C	Liebherr-International AG
	-20 °C	Liebherr-International AG
	-80 °C	Thermo Fisher Scientific
Magnetrührer	RCT basic	IKA®Werke
Mikroskop	Lichtmikroskop Biomed	Leitz
Spectrophotometer	NanoDrop	PEQLAB Biotechnologie
Netzgeräte	EPS 500/400	Amersham Pharmacia
	EPS 3501XL	Amersham Pharmacia
Neubauer- Zählkammer		Carl Roth GmbH
pH-Meter	inoLab® pH 720	WTW
Pipetten	Pipete-Boy	INTEGRA Biosciences
	Multipipette® plus	Eppendorf AG
	Multi-Channel Pipette Research®	Eppendorf AG
	Pipetman®	Gilson
	Pipetten Research®	Eppendorf AG
Plattformschüttler	Unimax 1010	Heidolph Instruments
Protein G Säule		GE Healthcare
Vortex Mixer	MS2 Minishaker	IKA®Werke

	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Waagen	PG5002 Delta Range	Mettler Toledo
	Präzisionswaagen	Kern & Sohn GmbH
Wasseraufbereitung	Milli-Q Advantage	Millipore
Wasserbad	Aqualine	Lauda
Zellzähler		VWR International GmbH
Zentrifugen	Tischzentrifuge 100AC	Carl Roth GmbH
	Tischzentrifuge 5417C	Eppendorf AG
	Tischzentrifuge 5415R	Eppendorf AG
	Ultrazentrifuge L8-50 M/E	Beckman Coulter
	Zellkulturzentrifuge Heraeus® Multifuge 3 S-R	Thermo Fisher Scientific
	Zellkulturzentrifuge Rotina 46R	Hettich

Tabelle 2.1: Verwendete Geräte

2.1.2.2 Chemikalien und Reagenzien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich, Merck, Invitrogen/Gibco®, sowie Thermo Fisher Scientific und Biozym bezogen. Davon abweichende Reagenzien werden separat aufgeführt.

2.1.2.3 Verbrauchsmaterialien

Die Tabelle 2.2 listet die Verbrauchsmaterialien auf, welche im Methodenteil nicht näher betitelt werden.

Tabelle 2.2

Material	Name	Hersteller
Facsröhrchen	Nunc	Thermo Fisher Scientific
Kryoröhrchen	Nunc	Thermo Fisher Scientific
Pipettenspitzen	Combitips Plus®	Eppendorf AG
Mikrotiterplatten	Nunc	Thermo Fisher Scientific
Zellkulturplatten	Falcon™	Becton Dickinson
Stericup	Express™ plus	Merck Millipore
Tubes	Safe-Lock	Eppendorf AG
	Protein loBind®	Eppendorf AG

Tabelle 2.2: Verbrauchsmaterial

Diverse Pippettenspitzen, Reaktionsgefäße und Zentrifugenröhrchen wurden von Becton Dickinson und Eppendorf verwendet u.a. aus Polypropylen, um das Anhaften von Proteinen wie zum Beispiel der Antikörper an den Gefäßwänden zu verringern.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Zelllinien und ihre Kultivierung

HEK 293 (Human Embryonic Kidney - Zellen)

Die adhärent wachsenden HEK 293 Zellen, welche sich gut zur Transfektion und Proteinexpression eignen, wurden im Kulturmedium (s.u.) bei 37 °C 5 % CO₂ kultiviert. Dem Medium der AQP4-Plasmid transfizierten HEK-Zellen wurden 10 µl/ml Blasticidin (GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe) beigegeben, um den Selektionsdruck zu erhalten.

TE671 (*humane Rhabdomyosarkomzellen*)

Ebenfalls adhärent wachsen die TE671 Zellen. Diese wurde sowohl als Wildtyp Zellen (TE-WT), als auch mit Neurofascin (TE-NF) kultiviert. Mit Neurofascin stabil transfizierten TE671 Zellen wuchsen durch Zusatz von 0,75 mg/ml des Antibiotikums Geneticin (G418) (PAA Laboratories, Cölbe) bei 37 °C 5 % CO₂ im Inkubator.

Die Zelladhärenz wurde enzymatisch mit Trypsin-EDTA (Gibco®, Invitrogen) gelöst. Die enzymatische Reaktion zum Detachment wird mit Zugabe von Medium abgestoppt. Die Zellen wurden pelletiert und im frischen Medium (s.u.) resuspendiert.

THP1 (*humane monozytäre akute Leukämiezellen*)

THP1-Zellen sind Suspensionszellen und dem Medium (s.u.) wurde 1 % Pyruvat, 1 % NEAA und 0,4 µl/ml β-Mercaptoethanol zugefügt.

Hybridom (*Fusion von B-Zellen und Myelomzellen*)

Zur MOG- oder NF-Antikörperproduktion wurden Hybridomzellen verwendet. Der Überstand wurde abzentrifugiert und die Antikörper aufgereinigt.

- **Kultivierungsmedium für alle Zelllinien (steril filtriert):**
RPMI 1640 + L-Glutamin (GIBCO®/Invitrogen, Karlsruhe)
10 % FCS (Fetales Kälberserum)(PAN Biotech, Aidenbach)
1 % Penicillin/Streptomycin (GIBCO®/Invitrogen, Karlsruhe)
- **Zellkulturflasche:**
Falcon™ mit Gasaustauschkappe (Beckton Dickinson, Heidelberg)

2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um die Zelllinien langfristig zu lagern, wurden diese im flüssigen Stickstoff kryokonserviert. Die Zellen wurden zunächst aus dem Kulturmedium abzentrifugiert. Jeweils 1x10⁶ Zellen wurden in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in Kryotubes abgefüllt, welche umgehend auf Eis gestellt wurden. Die Kryotubes wurden schrittweise erst bei -80 °C, einen Tag später in flüssigen Stickstoff eingefroren.

Das Einfriermedium bestand aus steril filtriertem 20 % FCS (= Fetal Calf Serum), 70 % RPMI und 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid). Das DMSO, welches eigentlich zelltoxisch ist, wirkt

hierbei als Gefrierschutzmittel. Es minimiert die Kristallbildung u.a. in den Zellzwischenräumen und somit das Absterben beim Einfrieren der Zellen.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryotubes kurz in einem 37 °C warmen Wasserbad erwärmt und direkt anschließend in ein Kulturmedium gegeben, bis die Zellen vollständig aufgetaut sind. Um das DMSO-Medium abzutrennen, wurden die Zellen pelletiert und in neuen Kulturmedium resuspendiert und ausgesät.

2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl und Viabilität

Um die Lebendzellzahl einer Zellpopulation zu bestimmen, wurden diese mit Trypanblau angefärbt. Der Farbstoff kann nur die Zellmembran toter Zellen passieren, so dass die vitalen Zellen mithilfe der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt werden können. Daraus wurde der Mittelwert gebildet, mit dem Verdünnungswert 10 multipliziert und der Korrekturfaktor der Zählkammer von 10^4 einberechnet. Der erhaltene Wert entsprach der Zellzahl pro Milliliter.

- **Trypanblaufärbung (1:10):**
0,4 % Trypan blue solution (Invitrogen, Karlsruhe), in PBS 1:4 verdünnt und steril filtriert

2.2.1.4 Stabile Transfektion eines Plasmids

Die HEK 293 Zellen wurden chemisch mittels FuGENE® 6 Transfection Reagent mit dem Insert (AQP4) versehenen Plasmid pcDNA™ 6.2C-EmGFP-GW/TOPO® (Invitrogen, Karlsruhe) transfiziert. Das darauf enthaltene rekombinante Plasmid AQP4-M23-EmGFP (humanes Aquaporin-4, Isoform M23, Fusionsprotein mit EmGFP) wurde von Prof. Reindls Arbeitsgruppe (Universitätsklinik für Neurologie, Innsbruck) zur Verfügung gestellt.

Auf Multiwell-Zellkulturplatten wurden einen Tag vor der Transfektion 10^5 Zellen pro Well in Kultivierungsmedium ausgesät, um eine Konfluenz von 50-80 % zu erreichen. Die Transfektionslösung wurde den Zellen am darauffolgenden Tag zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 24-48 Stunden erfolgte das Passagieren der Zellen und die Zugabe des Antibiotikums Blastocidin, um eine stabile Transfektion zu gewährleisten.

- **Transfektionslösung:**
 - 1 µg Plasmid DNA
 - 3 nl FuGENE® 6 Transfection Reagent (Roche, Mannheim)
 - 97 µl RPMI 1640 + L-Glutamin (GIBCO®/Invitrogen, Karlsruhe)
- 6-Well-Zellkulturplatte

2.2.1.5 Zellstimulation

Für die Fc-Rezeptor abhängige Stimulation der THP1 Zellen wurden diese zusammen mit den NF-Antikörpern und den mit Neurofascin stabil transfizierten TE Zellen bei 37 °C 5 % CO₂ inkubiert. Dafür wurden 3x10⁵ THP1 Zellen zusammen mit 10⁵ Wildtyp bzw. Neurofascin TE Zellen in Kultivierungsmedium in einer 24-Well-Platte ausgesät. Die deglykosylierten NF-Antikörper wurden entsprechend einer Verdünnungsreihe zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Überstände auf eine IL8-ELISA Platte übertragen und analysiert.

- **Kultivierungsmedium(steril filtriert):**
 - RPMI 1640 + L-Glutamin
 - 10 % FCS (Fetales Kälberserum)
 - 1 % Penicillin/Streptomycin
 - 1 % Pyruvat
 - 1 % NEAA
 - 0,4 µl/ml β-Mercaptoethanol
- **Antikörper:**
 - Unterschiedlich deglykosyliert (Neuraminidase; EndoS; PNGase) je 1 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,01 µg/ml
- **24-Well-Kulturplatte**

2.2.2 Proteinanalytik

2.2.2.1 Antikörperaufreinigung

Zur Aufreinigung der Antikörper wurde eine Protein G-Affinitätschromatographie angewendet. Dabei bindet der Fc-Teil des IgGs reversibel und spezifisch das Protein G (ein

Bakterienprotein aus der Gattung Streptococcus). Eine Säule fungiert als Träger für das Protein G.

Die Säule wurde nach dem Waschen bzw. Reinigen mit PBS mit dem Probenmaterial beladen. Das Protein G hat nun die Antikörper gebunden und soll nun wieder davon getrennt und aufgefangen werden (= Elution). Vor der Elution mit Glycin wurde die Säule erneut mit PBS gewaschen. Das Eluat wurde in Fraktionen von 1 M Tris (pH = 9) aufgefangen, um den niedrigen pH-Wert des Glycins auszugleichen. Dabei wird ein End-pH-Wert von ca. 7-8 erreicht. Verfolgt wurde die Elution mittels UV-Detektor basierend auf einer Absorptionsmessung bei $\lambda = 277 \text{ nm}$.

- **FPLC-Anlage (Fast protein liquid chromatography):** Flussrate 1 ml/min

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte im Anschluss mittels NanoDrop-Messung bei $\lambda = 280 \text{ nm}$.

2.2.2.2 Antikörperdeglykosylierung

Die Antikörper wurden mit den Enzymen EndoS, PNGaseF und Neuraminidase deglykosyliert.

EndoS (Endo- β -N-Acetylglucosaminidase) wird von dem Bakterium Streptococcus pyogenes gebildet und hydrolysiert die β -1,4-di-N-Acetylchitobiose Bindung der Zuckerketten von humanen IgG.

Das Enzym PNGaseF (Peptid-N-Glykosidase F) stammt von dem Flavobacterium meningosepticum und spaltet die Bindung zwischen Asparagin und N-Acetylglucosamin.

Die Neuraminidase (Endo-N-Acetyl-Neuraminidase (Sialidase)) stammt aus dem Bakterium Clostridium perfringens und spaltet endständige Neuraminsäuren (Sialinsäuren) an der Bindung α 2-3, α 2-6 und α 2-8 von restlichen Zuckerketten ab.

Die Protokolle für den Antikörperverdau wurden empirisch bestimmt.

EndoS (Kooperation mit Matthias Collin, Universität Lund):

- für 1 mg Antikörper wurden 5 – 10 μ l Enzym verwendet

PNGaseF (New England Biolabs®):

- für 1 mg Mausantikörper wurden 22 μ l Enzym verwendet

- für 1 mg Plasmapherese wurden 4 µl Enzym verwendet
- der Puffer G7 wird 1:10 zum Gesamtvolumen zugegeben
- der Puffer NP40 wird 1:10 zum Gesamtvolumen zugegeben

Neuraminidase (New England Biolabs®):

- für 1 mg Mausantikörper wurden 22 µl Enzym verwendet
- für 1 mg Plasmapherese wurden 4 µl Enzym verwendet
- der Puffer G1 wird 1:10 zum Gesamtvolumen zugegeben

Inkubation für 24 Stunden bei 37 °C.

2.2.2.3 Gelelektrophorese und Lektin-Blot

Die Deglykosylierung der Antikörper wurde mittels Gelelektrophorese und Lektin-Blot überprüft.

Die diskontinuierliche SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) dient der Auftrennung des Proteingemisches. Hierbei denaturiert das SDS die Proteine und unterbindet die Ausbildung von Quartärstrukturen. Die Proteine werden auch mit einer negativen Gesamtladung versehen und wandern dadurch ausschließlich anhand ihrer Größe im elektrischen Feld zum Plus-Pol. Die Polyacrylamidmatrix fungiert als Trenngel.

Verwendet wurden die Gele NuPAGE® Novex® 4-12 % Bis-Tris (Invitrogen) und als Größenstandard Full-Range Rainbow Marker (MW 10-250 kDa) (GE Healthcare). Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit einem nicht-reduzierenden Auftragspuffer versehen und 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Gelelektrophorese wurde in einer Gelkammer (Novex®, XCell II™ Blot Module (Invitrogen)) umspült von einem Lauf-Puffer bei einer konstanten Spannung von 200 V ca. 50 min durchgeführt.

- **Auftragspuffer:** NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X) (Invitrogen)
- **Lauf-Puffer:** NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20X) (Invitrogen)

Um im nächsten Schritt die Reste der Zuckerketten der Antikörper selektiv mit Lektinfärbungen analysieren zu können, wurden die Proteine aus dem Gel auf eine Membran mittels Elektroblothing transferiert und darauf fixiert. Dabei wurde das *Semi-dry*-Verfahren

angewandt. Dazu wurde das Gel auf die Membran und zwischen den dreilagigen Filterpapieren platziert und anschließend zwischen die Elektrodenplatten gelegt. Das Blotten erfolgte 60 min bei 150 mA.

- **Membran:** Hybond-P Polyvinylidenfluorid (PVDF) (GE Healthcare)
- **Filterpapier:** Whatman®-Filterpapier (GE Healthcare) getränkt in Transferpuffer
- **Transferpuffer:** NuPAGE® Transfer Buffer (20X) 5 ml, 10 ml 100 % Methanol, 85 ml Aqua dest.
- **Blotgerät:** Trockenblot (MPI Werkstatt)

Über Nacht wurde die Membran mit den entsprechenden Lektinen angefärbt.

- **LCA** (*Lens ulinaris agglutinin*, VECTOR Laboratories):
1:1000 in TBS
nach EndoS und PNGaseF
bindet an D-Glucose und D-Mannose
- **SNA** (*Sambucus nigra lectin*, VECTOR Laboratories):
1:1000 in TBS
nach Neuraminidase
bindet an Galaktose und Neuraminsäuren

Geblockt wurde die Membran mit dem Blocking Reagent für eine Stunde und anschließend wurde zweimal mit TBS und einmal mit TBS mit Mg^{2+} gewaschen. Nach der Aktivierung mit Streptavidin (1:2000 mit TBS; Jackson) wurde die Membran mit der Detektionslösung 1 min inkubiert und direkt anschließend in eine lichtgeschützte Kassette gelegt. Im Dunkelraum (OPTIMAX® X-Ray Processor, Protec) wurden die Röntgenfilme (Amersham Hyperfilm™ ECL, GE Healthcare) nach 1 bis 15 Sekunden Expositionszeit entwickelt.

- **Blocking Reagent:** Western Blocking Reagent
- **Detektionslösung:**
10 ml ECL A-Lösung (0,25 % Luminol, 1 M Tris-HCl pH 8.6)
100 µl ECL B-Lösung (0,11 % para-Hydroxycoumarinsäure, DMSO)
3,1 µl 30 % H_2O_2

Das Gel wurde nach dem Blot mit dem Coomassie®-Brilliant-Blau (0,1 % Coomassie®-Brilliant-Blue, 40 % Methanol, 10 % Essigsäure) 20 Minuten angefärbt und anschließend mit

dem Entfärber (50 % Ethanol, 7 % Essigsäure) solange entfärbt bis nur noch die Banden blau gefärbt zu sehen waren.

2.2.3 Immunologische Methoden

2.2.3.1 ELISA: Quantifizierung von IL8

Um die IL8 Konzentration aus dem Zellstimulationsversuch zu quantifizieren wurden die Überstände abzentrifugiert und auf die ELISA-Platte übertragen. Hierfür wurde das ELISA-DuoSet® human CXCL8/IL8 (#DY208) von R&D Systems verwendet. Nach dem Prinzip eines Sandwich-ELISA wurde eine 96 Well-Mikrotiterplatte über Nacht mit dem *Capture Antibody* (antihumaner IL-8 Maus-antikörper) bei 4 °C ge-coated. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurde die Platte dreimal mit jeweils 200 µl Waschpuffer gewaschen. Das Abblocken erfolgt mit einer Blockierungslösung 300 µl je Well für 1 Stunde bei Raumtemperatur, um die Hintergrundaktivität des ELISA zu minimieren. Die Proben wurden mit 100 µl je Well unverdünnt aufgetragen und als Kontrolle wurde der Standard (rekombinantes humanes IL-8) in einer Verdünnungsreihe verwendet. Der zweistündigen Inkubationszeit folgte die Zugabe des *Detection Antibody* (biotinylierter antihumaner IL-8 Ziegenantikörper) mit erneuter Inkubation von 2 Stunden bei RT. Die Enzymmarkierung der Antikörper erfolgte mit Streptavidin-HRP 20 Minuten dunkel abgedeckt bei RT. Die Substratlösung startete die Enzymreaktion und wurde nach 20 Minuten Inkubation (RT; dunkel abgedeckt) ohne erneuten Waschvorgang mit Schwefelsäure gestoppt. Die Messung der optischen Dichte erfolgte bei 450 nm und wurde durch die Messung bei 540 nm korrigiert.

- **Waschpuffer:** PBS-Tween® 0,05 %, pH 7,2 - 7,4
- **Blockierungslösung:** 1 % BSA in PBS mit 0,05 % NaN₃
- **Reaktionslösung:** 0,1 % BSA in TTBS, pH 7,2 - 7,4, steril filtriert
- **Streptavidin-HRP (Jackson):** Verdünnung 1:200 in Reaktionslösung
- **Substratlösung:** 1:1 (H₂O₂:TMB)
- **Stopplösung:** 2 N H₂SO₄

2.2.3.2 FACS-Analyse

Die FACS-Analyse (*fluorescence activated cell sorter*) dient der Separation von markierten Zellpopulationen und der quantitativen Analyse von Zellen. Die Erfassung von Oberflächenmolekülen der untersuchten Zellen erfolgt durch Fluoreszenzfarbstoff-markierte Antikörper. Das Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung ermöglicht in Einzelzellsuspension die Laserbestrahlung und Detektion der Fluoreszenz. Eine Mehrfarbenfluoreszenzanalyse erlaubt dabei die Messung verschiedener Antikörper-Markierungen. Das Vorwärtsstreulicht des Lasers (FSC = *Forwardscatter*) korreliert mit der Größe bzw. dem Volumen der Zelle. Das senkrecht abgestrahlte Seitwärtsstreulicht (SSC = *Sidescatter*) dient als Maß für die Zellgranularität. Mittels FSC-SSC-Diagramms lassen sich die Zellpopulationen unterscheiden.

Um die Oberflächenantigenbindung deglykosylierter Antikörper zu untersuchen, wurden zunächst 10^5 Zellen pro Well mit dem entsprechenden Oberflächenantigen in FACS-Puffer auf einer 96 Well-Mikrotiterplatte ausgesät und zusammen mit den deglykosylierten Antikörpern 45 Minuten auf Eis inkubiert. Die Sekundärantikörper wurden nach dreimaligem Waschen mit 200 μ l FACS-Puffer zugegeben und erneut 45 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift werden die Zellen mit einem Totfarbstoff angefärbt und direkt in die FACS-Röhrchen überführt. Nach der Messung am FACS-Gerät wurden die FACS-Daten mittels FlowJo (TreeStar, USA) ausgewertet.

- **FACS-Puffer:** 1 % FCS in PBS (steril auf Eis)
- **Totfarbstoff:** Propidiumiodid; TO-PRO®-3 (Invitrogen)

Für das „Sorten“ der stabil transfizierten HEK 293 Zellen wurde nach gleichem Schema ebenfalls die Durchflusszytometrie angewandt. Als Farbstoff diente hier das im transfizierten Plasmid enthaltene GFP (Grün fluoreszierendes Protein).

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 Transformation des Plasmides

Zur Transformation des Plasmids wurde dieses mittels Elektroporation in E.coli Bakterien eingebracht. Dafür wurden die Plasmid-DNA und Bakterien in Elektroporations-Küvetten vermengt, ohne Luft einschließen zu verursachen und für 30 Minuten gekühlt. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes für ca. 4 Sekunden wurde die Zellmembran permeabilisiert und die DNA konnte in die Bakterienzelle eingeschleust werden. Zur Regeneration wurden die Zellen nach Zugabe von LB-Medium für 45 Minuten bei 37 °C in einen Schüttlerinkubator gestellt. Anschließend wurden die Zellen auf einer Agarplatte ausgestrichen und bei 37 °C für eine Nacht inkubiert. Die Klone wurden gepickt und in LB-Medium erneut über Nacht kultiviert.

- **E. coli:** 50 µl One Shot TOP10® Chemically Component (Invitrogen)
- **Plasmid-DNA:** 1 µl Plasmid pcDNA™ 6.2C-EmGFP-GW/TOPO® (Invitrogen, Karlsruhe)
Insert: human Aquaporin-4, Isoform M23, Fusionsproteine mit EmGFP
Leervektor: pcDNA™ 6.2 (Invitrogen, Karlsruhe)
- **Elektroporation:** Küvetten (Bio-Rad), Gerät (Gene-Pulser II, Bio-Rad)
- **LB-Medium (autoklaviert):** 500 µl
1 % Bacto Trypton (Becton Dickinson), 0,5 % Hefeextrakt (Becton Dickinson), 0,5 % NaCl
- **Agar (autoklaviert):** 1,5 % Bacto Agar (Becton Dickinson) mit LB-Medium und 100 µg/ml Ampicillin

2.2.4.2 Präparation von Plasmid-DNA

Die Isolierung der DNA aus den abzentrifugierten Bakterienkolonien erfolgte mittels QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) nach dem QIAprep Miniprep Handbook. Das Protokoll zur Aufreinigung der DNA basiert auf der alkalischen Lyse der Bakterien und das Binden an ein Anionenaustauscherharz.

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch mit dem Nano-Drop gemessen.

2.2.4.3 Analyse der Plasmid-DNA

Die aufgereinigten Plasmide wurden mittels PCR (Polymerase Chain reaction) und Gelelektrophorese auf ihren Inhalt überprüft. Zuvor wurden die Plasmide linearisiert.

Dafür wurden die Plasmide mit einem Enzym und einem Puffer für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert.

- **Plasmid:** 5 µg
- **ScaI:** 5 µl (Enzym zum schneiden von Plasmiden)
- **Puffer:** 5 µl 10fach Puffer FastDigest
- **H₂O:** ad 50 µl

Anschließend wurden die Proben (gelöst in PCR-Puffer), sowie die Leervektoren zunächst im Cycler amplifiziert und im Anschluss auf ein Gel aufgetragen. Zusätzlich wurde ein Ladder, ein Marker für DNA-Größen, verwendet. Nach Anlegen der elektrischen Spannung an die Gelkammer wandern die DNA-Fragmente je nach Größe schneller oder langsamer zum Pluspol, so dass diese in der anschließenden Fotokammer nach der Größe aufgetrennt detektiert werden können.

- **Gel:** 1,5 g Agarose mit 150 ml TAE-Puffer und 15 µl SYBR Safe
- **PCR-Puffer:** 10fach Puffer, d’NTPs, Primermix, Taq Polymerase, H₂O

3 Ergebnisse

Untersucht wurden die Effektorfunktionen und die Rolle der Glykosylierungen von Antikörpern bei demyelinisierenden Erkrankungen des Nervensystems, zunächst an einem monoklonalen Maus-Antikörper gegen Neurofascin und anschließend an humanen Aquaporin-4-Antikörpern aus Plasmapheresen von NMOSD Patienten.

3.1 Modulation und Reaktivität von Neurofascin-Antikörpern

Der verwendete monoklonale Neurofascin A12/18.1 Antikörper wurde von Hybridomzellen produziert und aus den Überständen mittels Protein G-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Dieser Antikörper (IgG2a) bindet sowohl NF155, als auch NF186 und induziert in vivo einen axonalen Schaden. (Mathey et al. 2007) Darüber hinaus verstärkt dieser Antikörper auch Entzündungen im peripheren Nervensystem. (Ng et al. 2012)

3.1.1 Differentielle Deglykosylierung des monoklonalen anti-Neurofascin Antikörpers

Der monoklonale Neurofascin-Antikörper A12/18.1 wurde mit drei verschiedenen Enzymen verdaut, welche Zucker von glykosylierten Proteinen abspalten können.

Die Enzyme Neuraminidase, PNGaseF und EndoS wurden hierbei eingesetzt, um die Glykosylierungen am F_c-Fragments des Antikörpers an verschiedenen Stellen zu schneiden.

Neuraminsäuren sind endständige Zuckerreste und wurden durch die Neuraminidase abgespalten.

Für das Trennen der kompletten an Asparagin²⁹⁷ gebundenen Zuckerkette am innersten N-Acetylglucosamin wurde die PNGaseF verwendet, welche komplexe Oligosaccharide mit hohem Mannoseanteilen vollständig vom Protein hydrolysieren kann.

EndoS schneidet den β -1,4-di-N-Acetylchitobiose Anteil der an Asparagin gebundenen Zucker ab und löst somit die Verbindung zwischen Mannose und GlcNAc.

Die Deglykosylierungen der Antikörper durch die Enzyme Neuraminidase, PNGaseF und EndoS wurden anhand von SDS-PAGE und einem Lektin-Blot überprüft.

Mittels der SDS-PAGE (Abb. 3.1) konnten die Molekulargewichte der deglykoslierten und der unveränderten Antikörper miteinander verglichen werden. Deutlich zeigte sich ein verringertes Molekulargewicht bei den mit PNGaseF und EndoS verdauten AK. Die endständigen Neuraminsäuren fallen nicht so schwer ins Gewicht, aber auch nach Neuraminidase Deglykosylierung schien das Molekulargewicht in der SDS-Page etwas leichter. Die Wirksamkeit der Enzyme wurde somit nachgewiesen.

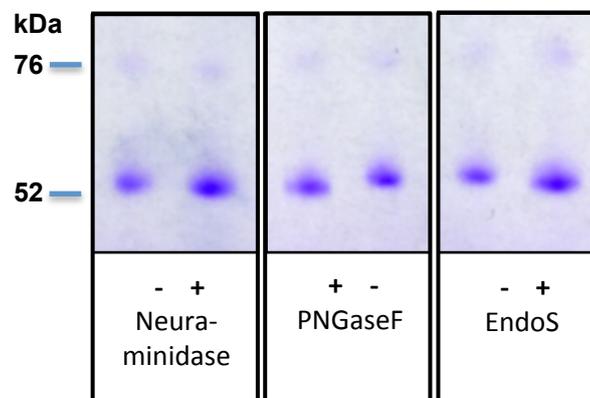


Abb. 3.1: SDS-PAGE Anti-Neurofascin mAb A12/18.1

Anti-Neurofascin mAb A12/18.1 wurden pro Tasche 3µg zusammen mit dem Auftragspuffer zur Gelelektrophorese aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Der Full-Range Rainbow Marker zeigte den Größenstandard an. Nach der Coomassie - Färbung wurde die schwere Kette des Antikörpers sichtbar. Verglichen wurden der unbehandelte NF-Antikörper A12/18.1 mit zuvor Neuraminidase, PNGaseF oder EndoS inkubierten NF-Antikörper. Man erkennt das reduzierte Molekulargewicht der mit PNGaseF oder EndoS behandelten AK.

Der Lektin-Blot wurde ebenfalls als Methode verwendet, um die Deglykosylierungen nachzuweisen. Lektine sind Proteine, die an spezifischen Zuckerresten binden und wodurch das Vorhandensein bestimmter Zuckerstrukturen nachgewiesen werden kann.

Die Neuraminidase spaltet Neuraminsäuren endständig von den Zuckerketten ab. Das Lektin SNA bindet an Neuraminsäuren, so dass nur bei Vorhandensein dieser eine Färbung entsteht.

Bei den unveränderten NF-Antikörpern zeigte der Blot (*Abb. 3.2*) eine Markierung durch die SNA gefärbten endständigen Neuraminsäuren an. Ein noch angedeutetes reduziertes Signal zeigte sich bei den SNA angefärbten mit Neuraminidase deglykosylierten NF-Antikörpern. Anhand des Blots konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion durch das Abschneiden der endständigen Neuraminsäure erfolgreich war. Der Rest des Zuckerbäumchens bleibt stehen, daher ist die minimale Änderung des Molekulargewichtes durch den Verdau im Coomassie-Gel kaum darstellbar.

Die an Asparagin²⁹⁷ gebundene Zuckerkette wird am N-Acetylglucosamin durch PNGaseF hydrolysiert. Das Lektin LCA markiert die in der Glykosylierung enthaltene Mannose, was sich am Signal der unverdauten NF-Antikörper im Blot veranschaulichen lässt. Eine verminderte Signalintensität zeigten die mit LCA angefärbten PNGaseF hydrolysierten NF-Antikörper im Lektin-Blot.

Das Enzym EndoglykosidaseS (EndoS) schneidet die β -1,4-di-N-Acetylchitobiose, so dass im Lektin-Blot die LCA Anfärbung reduziert detektierbar ist. Im Vergleich zu den Antikörpern mit ungeschnittenen Zuckersequenzen bindet das Lektin LCA an der Mannose und färbt diese damit im Blot an.

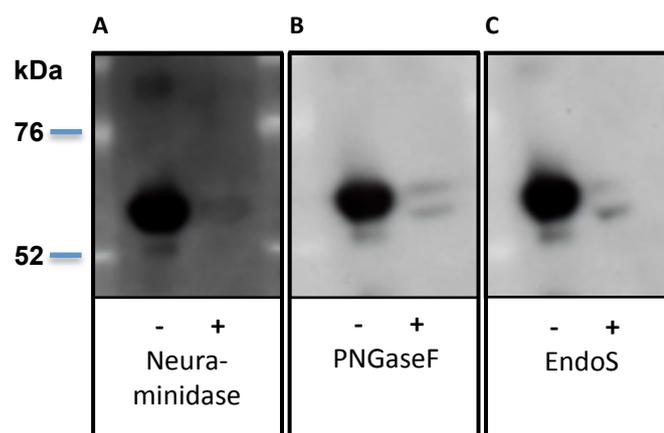


Abb. 3.2: Lektin-Blot Anti-Neurofascin mAb A12/18.1

Der Lektin-Blot der SDS-PAGE für Anti-Neurofascin mAb A12/18.1 wurde bei der Deglykosylierung durch die Neuraminidase mit SNA (1:1000 verdünnt) (*A*) und der Deglykosylierungen durch PNGaseF oder EndoS mit LCA (1:1000 verdünnt) (*B und C*) detektiert. Die unveränderten NF-Antikörper ließen sich dabei gut anfärben. Bei den deglykosylierten NF-Antikörpern war das Signal stark vermindert. Daher ließ sich eine Hydrolyse einzelner Zuckersequenzen durch die Enzyme bestätigen.

Im Lektin-Blot zeigten alle deglykosylierten Antikörper eine abgeschwächte Signalintensität, verglichen mit den unveränderten Antikörpern. In der SDS-PAGE zeigte sich zusätzlich ein Gewichtsunterschied zwischen den nicht verdauten und den mit EndoS und PNGaseF verdauten Neurofascin Antikörpern. Ebenso lässt sich der Effekt bei Neuraminidase deglykosylierten AK im Coomassie-Gel erahnen (*Abb. 3.1*). Hierdurch konnte die hydrolysierende Wirkung aller Enzyme auf die Glykosylierungen der Neurofascin Antikörper gezeigt werden.

Bei jedem neuen Ansatz eines Verdaus wurde der Effekt anhand einer SDS-PAGE und eines Lektin-Blots überprüft. So konnte jedes Mal, bevor die Antikörper weiter verwendet wurden, die Deglykosylierung nachgewiesen werden.

3.1.2 Antigenerkennung deglykosylierter monoklonaler anti-Neurofascin Antikörper

Nach der Deglykosylierung des mAk anti-NF wurde eine etwaige Konformationsänderung des AK und damit verbundene mögliche Beeinträchtigung der Antigenbindung untersucht. Zur Überprüfung wurde die stabil mit NF-186 transfizierte Zelllinie TE671 (TE-NF186) eingesetzt (Ng et al. 2012). Die Zellen tragen auf ihrer Oberfläche das Antigen NF-186, welches der Anti-NF mAk A12/18.1 erkennt.

Hierbei wurde die FACS-Analyse herangezogen, um die Antigenbindung der deglykosylierten und der unveränderten NF-Antikörper zu vergleichen.

Die TE-NF186 Zellen wurden zusammen mit den NF-Antikörpern inkubiert. Zur Detektion wurde ein sekundärer anti-mouse Ig PE verwendet. Als negativ Kontrolle dienten untransfizierte TE671-Wildtyp-Zellen (TE-WT), welche ebenfalls mit den NF-Ak inkubiert wurden. Die Durchflusszytometrie (*Abb. 3.3*) zeigte eine erhöhte Fluoreszenzintensität der TE-NF186 Zellen als die TE-WT Zellen, welche hier zur negativ Kontrolle dienten. Die Fluoreszenzmessung der deglykosylierten AK wies keinen Unterschied zu den nicht deglykosylierten AK auf. Somit hat die Deglykosylierung keinen Einfluss auf die Antigenerkennung der NF-Antikörper. Die Bindungsaffinität der NF-Ak bleibt auch nach der Deglykosylierung erhalten.

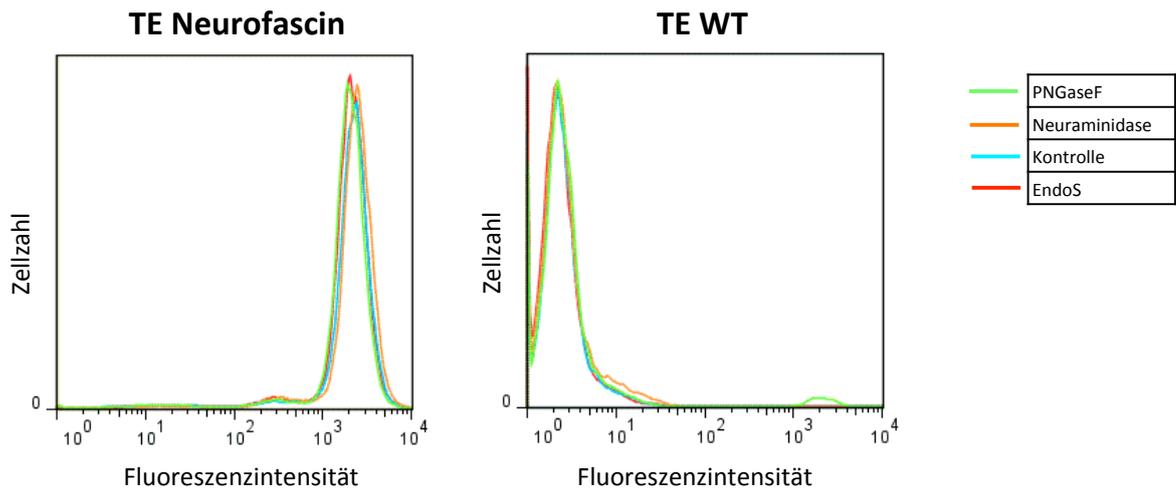


Abb. 3.3: Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie zur Analyse der Antigenbindung des Anti-Neurofascin mAb A12/18.1 nach Deglykosylierung

Die Antigenbindung der Anti-Neurofascin mAb A12/18.1 an NF186 exprimierenden TE671-Zellen zeigt die „TE Neurofascin“ FACS-Analyse. Die Antigenerkennung stellte sich als unbeeinflusst nach Deglykosylierung mit den Enzymen PNGaseF, Neuraminidase und EndoS dar. Die „TE WT“ Analyse fungierte als negativ Kontrolle. Erwartungsgemäß fand zwischen den TE-WT und den Neurofascin-Antikörpern keine Bindung statt. Die Durchflusszytometrie belegte das Erkennen des Antigens der deglykosylierten Antikörper (grüne, orange und rote Linie) in gleicher Weise wie die unbehandelten Antikörper (blaue Linie).

(Mit freundlicher Unterstützung von Petra Sperl, Biologisch technische Assistentin)

3.1.3 Aktivierung von F_c -Rezeptoren nach differentieller Deglykosylierung der monoklonalen anti-Neurofascin Antikörper

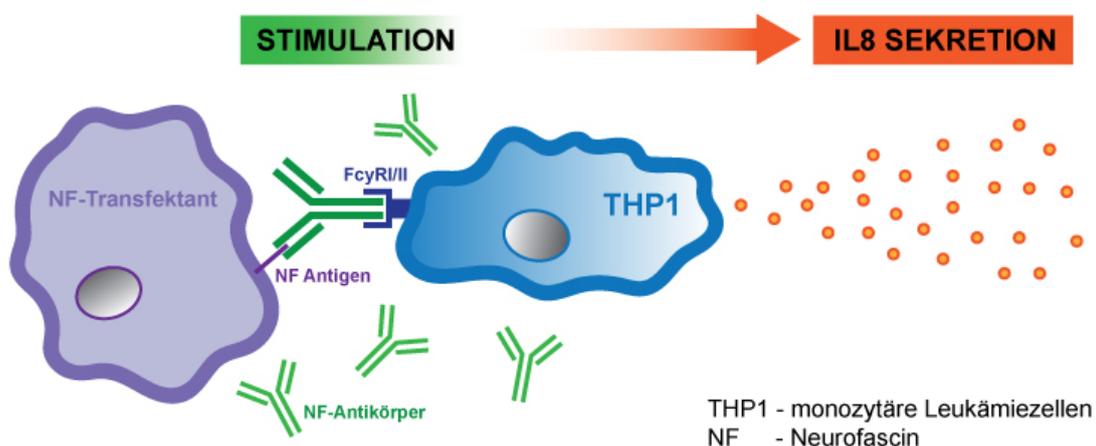
Um nun die Effektorfunktionen deglykosylierter NF-Antikörper zu beurteilen, wurde die Interaktion zwischen den F_c -Rezeptoren und dem F_c -Fragment der NF-Antikörper genauer untersucht.

Am Zielantigen gebundene Antikörper binden F_c -Rezeptoren und aktivieren diese.

Die THP1-Zellen gehören zu den monozytären Zelllinien und exprimieren auf ihrer Oberfläche $Fc\gamma I/II$ -Rezeptoren (Fleit et Kobasiuk 1991), welche die F_c -Domäne von IgG binden und somit die Zellen aktivieren können. Als Antwort auf die Aktivierung durch einen F_c -Rezeptor sekretieren die Zellen u.a. IL8, ein Interleukin zur Chemoattraktion von Immunzellen. (Janeway Immunologie Murphy/Travers/Walport 2009) Das Zielantigen präsentierte sich den Antikörpern an der Oberfläche stabil NF-transfizierter TE671-Zellen.

Die THP1-Zellen fungieren somit als Träger der F_c Rezeptoren (RI/II), welche durch die Ag-gebundenen Antikörper (IgG2) stimuliert werden.

Der Versuchsaufbau (Abb. 3.4) bestand aus THP1-Zellen, den NF-Antikörpern und den TE-NF186 Zellen, welche zusammen in Medium bei 37 °C inkubiert wurden. Im nächsten Schritt wurden die Überstände auf IL8-Produktion im ELISA gemessen. Zunächst musste ein Protokoll mit optimaler Inkubationszeit, Zellzahl und Antikörperkonzentration etabliert werden. Etwaige Störfaktoren wurden in separaten Versuchsreihen ausgeschlossen. Die IL8-Konzentration im Überstand ist somit ein Maß für die Stimulation der THP1-Zellen durch am Fc γ -Rezeptoren gebundene NF-Antikörper. Auf der gleichen Basis wurde die Aktivierung durch deglykosylierte Antikörper gemessen.



(Graphikdesign unterstützt durch E. Palencia)

Abb. 3.4: Stimulationsversuch der THP1-Zellen

An Neurofascin186 (exprimiert auf NF-Transfektanten der TE671 Zellen) gebundene Anti-Neurofascin mAb A12/18.1 stimulierten den Fc γ -Rezeptor der THP1-Zellen zur IL8-Sekretion. Unterschiede der Stimulation durch deglykosylierte Antikörper wurden mittels IL8-Konzentration im ELISA gemessen.

3.1.3.1 Antigen-spezifische und dosisabhängige Induktion von IL8

Bevor der oben beschriebene Versuchsaufbau ausgewertet werden konnte, wurden mögliche Störvariablen untersucht.

Eine Beeinflussung der IL8-Konzentration im Überstand durch eine Stimulation von TE-Zellen wurde in einem separaten Versuch ausgeschlossen. Die verschiedenen Zelllinien

THP1, TE-WT und TE-NF186 wurden je ausschließlich mit dem mAk A12/18.1 inkubiert, um anschließend die IL8 Produktion zu messen. Die TE-Zelllinien wiesen keine Produktion auf. Im Gegensatz dazu zeigten die THP1-Zellen eine Grundsekretion von IL8. (Abb. 3.5)

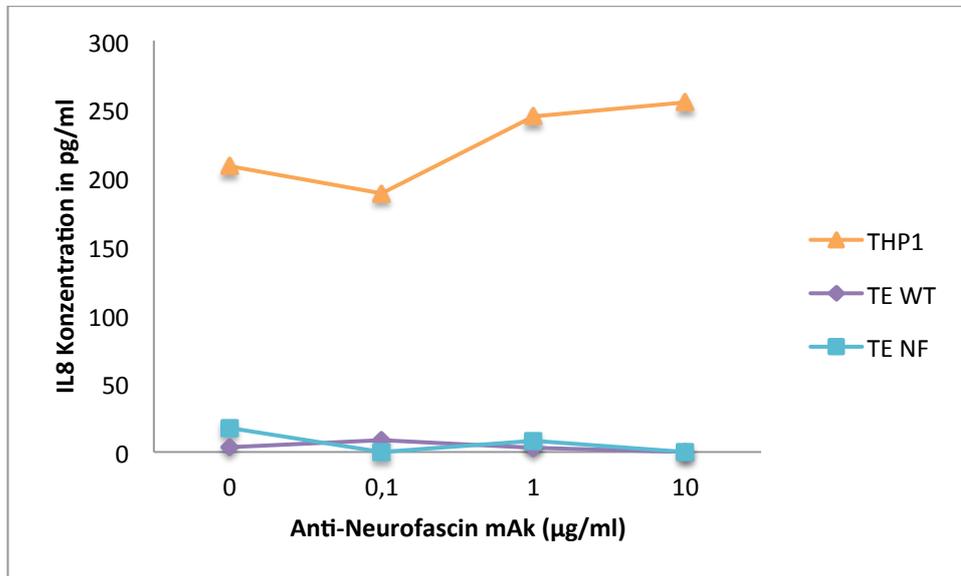


Abb. 3.5: ELISA zum Ausschluss einer IL8 Produktion von TE-Zellen

Nach Inkubation der Zelllinien THP1, TE-WT und TE-NF186 mit dem mAk A12/18.1 in verschiedenen Konzentrationen wurden die Überstände mittels ELISA auf IL8 überprüft. Die THP1-Zellen produzierten eine geringe Menge IL8. Es zeigte sich keine Produktion von Interleukin 8 durch TE-Zelllinien, womit eine Beeinflussung des oben beschriebenen Versuchsaufbaus durch TE-Zellen ausgeschlossen wurde.

Die negativ Kontrolle (Abb. 3.6) des Stimulationsversuches stellte eine Inkubation von THP1-Zellen mit TE-WT-Zellen mit den entsprechenden Antikörpern dar. Die IL8 Konzentration blieb hier erwartungsgemäß unverändert. Es konnte veranschaulicht werden, dass eine Kombination aus THP1-Zellen, TE-NF186-Zellen und anti-Neurofascin AK nötig ist, um eine IL8 Sekretion zu induzieren. Mit einer höheren Dosierung des Antikörpers konnte zudem der Sekretionseffekt verstärkt werden. Die Stimulation der THP1-Zellen zeigte sich somit antigenspezifisch und zudem dosisabhängig.

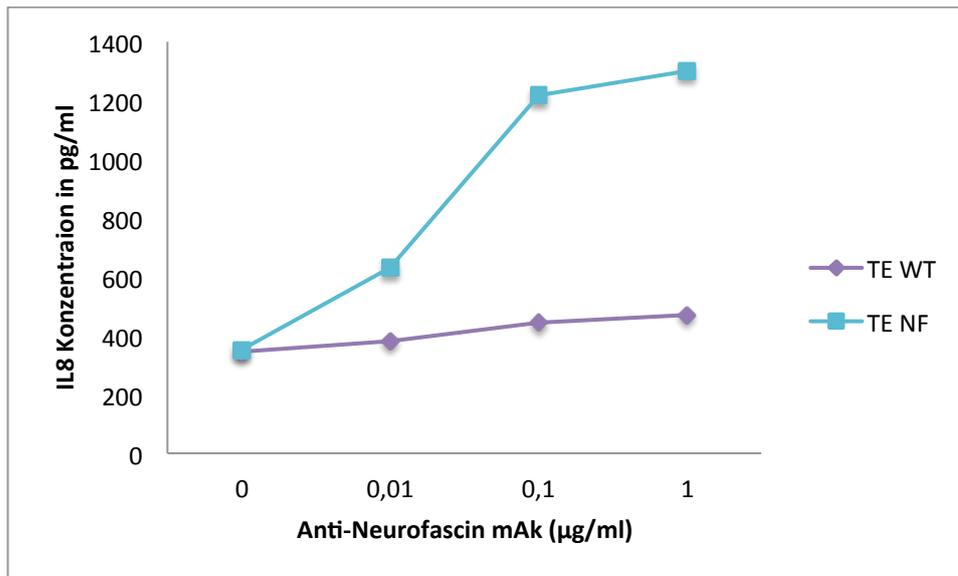


Abb. 3.6: Antigen-spezifische und dosisabhängige Induktion von IL8

Die exemplarische Darstellung eines Stimulationsversuches mit TE-WT-Zellen mit THP1-Zellen und unveränderten Anti-Neurofascin mAb A12/18.1 im Vergleich zur Inkubation mit TE-NF-Zellen zeigte keinen IL8-Konzentrationsanstieg. Die Messung des ELISA wurde bei einer Wellenlänge von 450nm mit einer Korrektur bei 540nm durchgeführt.

3.1.3.2 Stimulationsversuch mit monoklonalen anti-Neurofascin Antikörpern

Der Stimulationsversuch wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen des anti-Neurofascin mAb A12/18.1 von 0 bis 1 µg/ml durchgeführt. (Abb. 3.7)

Der Effekt auf die IL8-Sekretion wurde dabei zwischen den deglykosylierten und den nicht deglykosylierten NF-Antikörpern verglichen.

Bei der Inkubation ohne Antikörper-Zugabe, trat kein Anstieg der IL8-Sekretion auf. Die Zugabe der verschiedenen Antikörper führte im Stimulationsversuch zu unterschiedlicher IL8 Produktion der THP1-Zellen. Dies wird im unten dargestellten Diagramm als Aufzweigung der einzelnen AK bei 0,01 µg/ml deutlich. Eine Erhöhung der IL8-Sekretion war bei allen Antikörpern durch eine erhöhte Konzentration der beigefügten AK zu erreichen. Es stellte sich eine Art Plateau bzw. Annäherung der IL8-Sekretion bei hoher Dosierung der einzelnen AK ein.

Vergleicht man nun die einzelnen Stimulationen durch die verschiedenen Antikörper, lässt sich eine in etwa gleichstarke bzw. etwas stärkere Induktion durch die Neuraminidase deglykosylierten AK erkennen. Die Induktion erscheint als reduziert bei den PNGaseF und EndoS deglykosylierten AK.

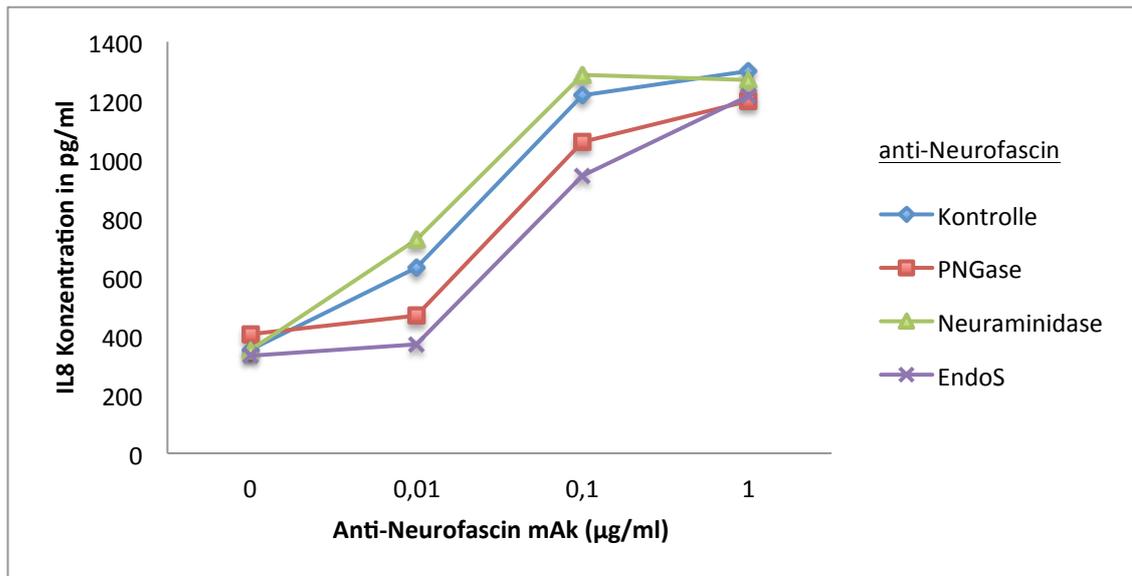


Abb. 3.7: IL8-ELISA nach Stimulationsversuch

Exemplarische Darstellung eines Stimulationsversuches.

Der IL8-ELISA wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einer Korrektur bei 540 nm gemessen. Durch Erstellung einer Standardkurve konnte die Optische Dichte mit IL8-Konzentrationen korreliert werden. Das Diagramm stellt den IL8-Anstieg in Abhängigkeit von der Glykosylierung und der Konzentration des Anti-Neurofascin mAb A12/18.1 dar.

3.1.3.3 Ergebnisse und statistische Analyse

Der Stimulationsversuch wurde mehrfach wiederholt und anschließend auf statistische Signifikanz überprüft. Dabei wurden die Ergebnisse in ein Prozentverhältnis gesetzt (= normalisiert) und anschließend summiert. Als Referenzwert wurden dabei die Ergebnisse der unbehandelten Antikörper bei 100 % (= Kontrolle) festgelegt.

Der Versuchsaufbau wurde zunächst mit den Konzentrationsschritten 0 µg/ml – 0,01 µg/ml – 0,1 µg/ml – 1 µg/ml für den mAb A12/18.1 durchgeführt. Weitere neun Wiederholungen des Versuchs fanden mit kleineren Konzentrationsschritten (0 µg/ml – 0,01 µg/ml – 0,03 µg/ml – 0,1 µg/ml – 0,3 µg/ml – 1 µg/ml) des Anti-Neurofascin Antikörpers statt.

Die folgende Tabelle (Tab. 3.1) zeigt exemplarisch die angewandte Umrechnung der gemessenen IL8-Konzentrationen im ELISA in ein prozentuales Ergebnis für eine bessere Vergleichbarkeit der Resultate.

Tabelle 3.1

Umrechnungstabelle der IL8-Produktion

mAk A12/18.1	Einheit	Kontrolle	PNGaseF	Neuraminidase	EndoS
1 µg/ml	Wert in pg/ml	838	807	794	812
	in % zu Kontrolle	100	96	95	97
0,3 µg/ml	Wert in pg/ml	797	758	838	756
	in % zu Kontrolle	100	95	105	95
0,1 µg/ml	Wert in pg/ml	793	578	888	445
	in % zu Kontrolle	100	73	112	56
0,03 µg/ml	Wert in pg/ml	529	313	647	218
	in % zu Kontrolle	100	59	122	41
0,01 µg/ml	Wert in pg/ml	336	206	355	101
	in % zu Kontrolle	100	61	106	30

Versuch Nr. V: exemplarische Umrechnung

Die Berechnung fand für die Stimulationsversuchs-Ergebnisse durch den anti-Neurofascin mAb A12/18.1 (Konzentrationen von 0,01 bis 1 µg/ml) statt. Dabei wurden die Messwerte des IL8-ELISA (pg/ml) in prozentuale Verhältnisse umgerechnet. Die Messwerte der Versuche mit den unveränderten AK (= Kontrolle) wurden als Richtwert mit 100 % festgesetzt. Im Bezug hierauf wurden die Resultate der deglykosylierten AK berechnet.

Die folgenden Auflistungen (Tab. 3.2) zeigen die bereits umgerechneten bzw. normalisierten Werte der IL8-Konzentrationsmessungen in Abhängigkeit des Referenzwertes (Kontrolle $\hat{=}$ 100 %). In der Zusammenstellung sind alle Resultate in Prozentangaben für die Stimulationsversuche von 0,01 µg/ml bis 1 µg/ml der mAk A12/18.1 aufgeführt. Die Spalten untergliedern die Versuche der einzelnen Antikörper. Ein Vergleich ist somit von den verschiedenen Antikörpern, wie auch zwischen den Versuchsreihen, möglich.

Tabelle 3.2

Zusammenfassung der Stimulationsversuchsreihen mit anti-Neurofascin AK

a) IL8 Produktion bei 0,01 µg/ml mAk A12/18.1

Versuch Nr.:	Kontrolle	PNGaseF	Neuraminidase	EndoS
I	100	74	115	59
II	100	84	129	92
III	100	70	74	90
IV	100	92	122	105
V	100	61	106	30
VI	100	56	107	56
VII	100	42	86	56
VIII	100	52	116	62
IX	100	65	104	88
X	100	65	92	75
}/10 =>	100	66	105	71

Zusammenfassung für 0,01 µg/ml mAk A12/18.1

Angaben der Werte in %

$p = 0,0001$ statistisch signifikant nach Friedman-Test

b) IL8 Produktion bei 0,03 µg/ml mAk A12/18.1

Versuche Nr.:	Kontrolle	PNGaseF	Neuraminidase	EndoS
II	100	86	108	86
III	100	73	76	72
IV	100	72	93	82
V	100	59	122	41
VI	100	65	173	99
VII	100	63	138	100
VIII	100	56	121	80
IX	100	44	112	78
X	100	44	104	82
}/9 =>	100	62	116	80

Zusammenfassung für 0,03 µg/ml mAk A12/18.1

Angaben der Werte in %

$p = 0,00001$ statistisch signifikant nach Friedman-Test

c) IL8 Produktion bei 0,1 µg/ml mAk A12/18.1

Versuch Nr.:	Kontrolle	PNGaseF	Neuraminidase	EndoS
I	100	87	106	78
II	100	92	94	90
III	100	95	83	85
IV	100	103	104	91
V	100	73	112	56
VI	100	78	96	79
VII	100	89	116	83
VIII	100	62	132	110
IX	100	66	102	78
X	100	59	108	100
}/10 =>	100	80	116	85

Zusammenfassung für 0,1 µg/ml mAk A12/18.1

Angaben der Werte in %

$p = 0,002$ statistisch signifikant nach Friedman-Test

d) IL8 Produktion bei 0,3 µg/ml mAk A12/18.1

Versuche Nr.:	Kontrolle	PNGaseF	Neuraminidase	EndoS
II	100	99	101	105
III	100	103	80	88
IV	100	184	81	96
V	100	95	105	95
VI	100	75	87	94
VII	100	74	113	89
VIII	100	95	141	97
IX	100	114	100	109
X	100	105	108	106
}/9 =>	100	88	102	98

Zusammenfassung für 0,3 µg/ml mAk A12/18.1

Angaben der Werte in %

$p = 0,06$ statistisch nicht signifikant nach Friedman-Test

e) IL8 Produktion bei 1 µg/ml mAk A12/18.1

Versuch Nr.:	Kontrolle	PNGaseF	Neuraminidase	EndoS
I	100	92	98	94
II	100	100	100	101
III	100	105	90	99
IV	100	92	113	148
V	100	96	95	97
VI	100	83	102	81
VII	100	55	64	84
VIII	100	61	77	69
IX	100	99	100	117
X	100	101	89	112
}/10 =>	100	88	93	100

Zusammenfassung für 1 µg/ml mAk A12/18.1

Angaben der Werte in %

$p = 0,15$ statistisch nicht signifikant nach Friedman-Test

Prozentuale Darstellung der Stimulationseffekte der einzelnen Antikörper für die Konzentrationen 0,01 µg/ml bis 1 µg/ml in den Tabellen 3.2 a) - e). Die Tabellen veranschaulichen die bereits umgerechneten IL8 Konzentrationen in Prozentwerte. Die Tabellen fassen die Versuchsreihen zusammen und zeigen die zum Bezugswert (Kontrolle = 100 %) ins Verhältnis gesetzten Resultate der mit PNGaseF, Neuraminidase oder EndoS behandelten Antikörper. Die einzelnen Tabellen zeigen auch die Durchschnittswerte für die unterschiedlichen AK in den jeweiligen Konzentrationen.

Mithilfe der Zusammenfassung ließen sich die Resultate besser miteinander vergleichen. Es konnte eine Aussage der einzelnen Versuchsreihen über das Stimulationsausmaß der deglykosylierten AK im Bezug auf die Kontrolle (unbehandelte Antikörper) getroffen werden.

Betrachtete man die Durchschnittswerte für die einzelnen Konzentrationen, ließen sich Tendenzen der IL8-Stimulationen der verschiedenen AK erkennen.

Für die Konzentration 0,01 µg/ml bis 0,3 µg/ml zeigte sich ein gesteigerter Stimulationseffekt durch Neuraminidase verdaute AK im Vergleich zu den Kontroll-AK, wohingegen die EndoS und PNGaseF verdauten AK einen reduzierten Stimulationseffekt aufwiesen.

Bei den Versuchen für 1 µg/ml induzierten die Neuraminidase und PNGaseF verdauten Antikörper einen geringeren Effekt als die EndoS verdauten und Kontroll Antikörper. Allerdings lagen die Prozentwerte bei dieser Konzentration insgesamt sehr nah beieinander.

Um die Signifikanz der Ergebnisse der deglykosylierten AK im Vergleich zur den Kontroll-AK zu überprüfen, wurden die Ergebnisse auf statistische Signifikanz untersucht.

Die Nullhypothese, dass die 4 Stichproben aus der gleichen Grundmenge stammen, wurde anhand des Friedman-Tests überprüft. Der p-Wert lag bei niedrigen Konzentrationen (0,01 – 0,03 µg/ml) der AK unter dem unadjustierten Signifikanzniveau von $p < 0,05$ und zeigte somit einen deutlichen Effekt. Die Nullhypothese konnte somit verworfen und ein signifikanter Unterschied zwischen den Proben angenommen werden.

Im Posthoc-Test nach Nemenyi wurde ermittelt, welche Gruppen bei den Konzentrationen von 0,01 µg/ml und 0,03 µg/ml sich zueinander statistisch signifikant unterscheiden. Für die Konzentration 0,01 µg/ml konnten die Gruppen Kontrolle zu PNGase, PNGase zu Neuraminidase und Neuraminidase zu EndoS zueinander statistisch signifikant unterschieden werden. Bei der Konzentration 0,03 µg/ml (Abb. 3.8) zeigten sich alle Gruppen zueinander signifikant unterscheidbar im Quade Posthoc-Test, außer die Gruppen Kontrolle zu Neuraminidase. Die Auswertung im Posthoc-Test nach Nemenyi war signifikant für Kontrolle zu PNGaseF, PNGaseF zu Neuraminidase und Neuraminidase zu EndoS.

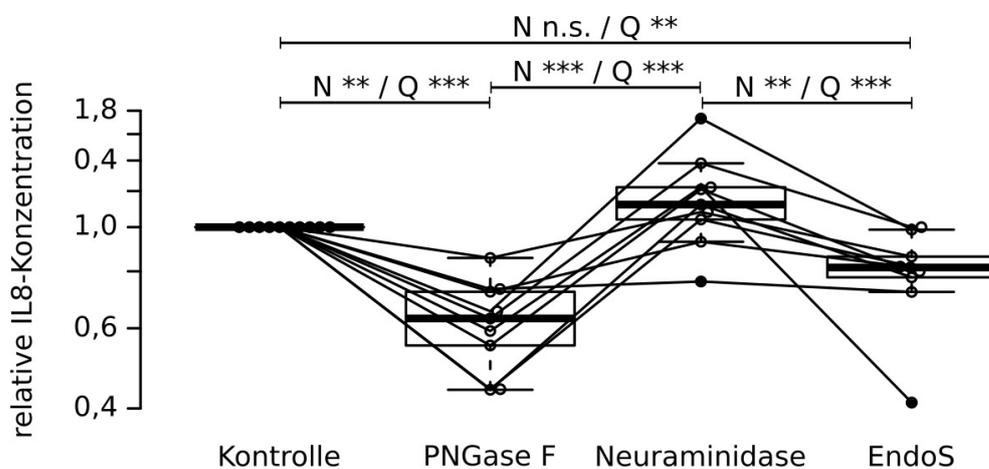


Abb. 3.8: Exemplarische Darstellung (0,03 µg/ml, normalisierte Werte) der statistischen Auswertung

Die statistische Analyse der prozentualen (= normalisierte) IL8-Sekretion der einzelnen Antikörper ergab im Friedman-Test ($p = 0,00001$) einen statistisch signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) der Proben. Die Auswertung fand für die Versuchsergebnisse bei 0,03 µg/ml Anti-Neurofascin mAb A12/18.1 statt. Im Posthoc-Test nach Quade (Q) zeigte sich für alle Gruppen zueinander eine statistische Signifikanz mit Ausnahme von Kontrolle zu Neuraminidase. Der Nemenyi (N) Posthoc-Test ergab keine Signifikanz bei der Gruppe Kontrolle zu der Gruppe EndoS bzw. Kontrolle zu Neuraminidase. Für die Auswertung im Nemenyi ergab sich für die Gruppen Kontrolle zu PNGaseF, PNGaseF zu Neuraminidase und Neuraminidase zu EndoS eine Signifikanz. (** entspricht einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,01$; *** einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,001$)

Insgesamt zeigt diese Analyse, dass unterschiedliche Stimulationseffekte durch modifizierte Antikörper induziert werden. Die gemessene IL8 Sekretion unterschied sich bei den einzelnen AK. Dieser Effekt ist bei Konzentrationen zwischen 0,01 µg/ml bis 0,3 µg/ml gut erkennbar und statistisch signifikant.

3.1.3.4 Gesamtauswertung

Die Neuraminidase deglykosylierten NF-Ak führten im Vergleich zu den unbehandelten Antikörpern zu einer ähnlichen bzw. etwas vermehrten IL8-Ausschüttung. Im Gegensatz dazu war die Sekretion von IL8 bei PNGaseF und EndoS behandelten AK vermindert.

Ein Einfluss durch eine Eigenproduktion von IL8 der TE-Zelllinien konnte ausgeschlossen werden. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Stimulation der THP1-Zellen zum einen antigenspezifisch getriggert wird und zum anderen abhängig von der Antikörperdosierung ist.

Die Resultate bei 0,03 µg/ml für die mit Neuraminidase deglykosylierten AK mit 116 % in der Stimulation, sowie 62 % bei den PNGaseF und 80 % mit den EndoS deglykoslierten AK, weisen auf einen unterschiedlich stark ausgeprägten Stimulationseffekt der einzelnen AK hin. Der Fokus liegt vor allem auf den Stimulationsversuchen zwischen 0,01 µg/ml und 0,3 µg/ml, bei welchen sich diese Tendenz deutlich erkennen lässt.

Die unterschiedlichen AK aktivieren die Fc γ -Rezeptoren in verstärkter oder reduzierter Form und führen zur dementsprechenden IL8-Konzentration. Die Fc γ -ständige Glykosylierung des Antikörpers nimmt somit Einfluss auf die Aktivierungsintensität des Fc γ -Fragments am Fc γ -Rezeptor und letztendlich auf die Effektorfunktion. (Abb. 3.9)

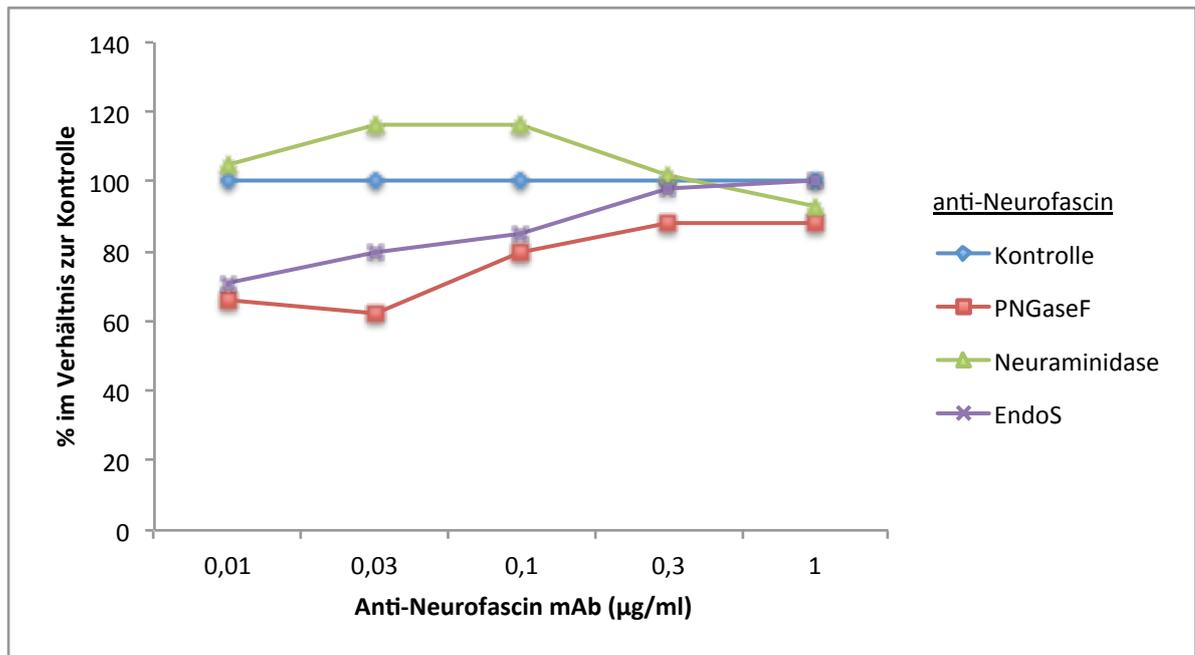


Abb. 3.9: Gesamtauswertung aller Stimmulationsversuche im Verhältnis zum Kontroll-AK

Zusammenfassung der umgerechneten Ergebnisse der Stimmulationsversuche im Verhältnis zur Kontrolle, den unveränderten Neurofascin-Antikörpern. Es wurden die summierten Werte für die Konzentrationen von 0,01 µg/ml bis 1 µg/ml der deglykosylierten AK (PNGaseF, Neuraminidase, EndoS) und des unbehandelten Anti-Neurofascin mAb A12/18.1 verwendet. Vor allem im Bereich von 0,03 bis 0,1 µg/ml zeigt sich der verstärkte Stimmulationseffekt der Neuraminidase deglykosylierten NF-Ak im Vergleich zur Kontrolle und die verminderte Stimmulation durch die PNGaseF und EndoS veränderten NF-Ak.

3.1.4 C1q-Bindung deglykosylierter Neurofascin-Antikörper

Der F_c -Teil von AK kann nicht nur $Fc\gamma$ -Rezeptoren binden und aktivieren, sondern auch C1q, ein Faktor zur Aktivierung des Komplementsystems im Zuge einer Immunantwort. Bindet der AK ein Oberflächenantigen spezifisch, kann am F_c -Fragment C1q aktiviert werden. Diese Aktivierungsmöglichkeit wurde ebenfalls bei den deglykosylierten Antikörpern untersucht. Hierzu wurde ein ELISA verwendet, der die Bindung zwischen Antikörper und C1q detektiert. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von F. Nimmerjahn wurde dieser ELISA durchgeführt. Hierzu wurde mit NF-Ak (deglykosyliert und unbehandelt) die ELISA-Platte gecoatet und im Anschluss C1q zugegeben. Die Bindung zwischen AK und C1q wurde mittels Zugabe von HRP-konjugiertem anti-human C1q AK dargestellt. (Kao et al. 2015) Der ELISA stellt somit die Bindung des F_c -Teils des AK zum Komplement C1q dar. Moduliert würde diese Bindung werden nach Erkennen des entsprechenden Antigens.

Der unbehandelte Neurofascin-Antikörper, welcher als Referenz diente, zeigte eine hohe Interaktion mit dem C1q-Komplement. Bei den PNGaseF und EndoS deglykosylierten AK verminderte sich deutlich die Bindungsfähigkeit im Vergleich zum unveränderten NF-Ak, wohingegen diese bei den Neuraminidase behandelten AK nur minimal erhöht bzw. gleichstark war. (Abb. 3.10) Dies lässt auch hier darauf schließen, dass Glykosylierungen eine Konformationsänderung der Antikörper hervorrufen und so die Fähigkeit, die entsprechenden Zielstrukturen zu binden, verändern, was letztendlich zu einer reduzierten oder erhöhten Effektorfunktion führt.

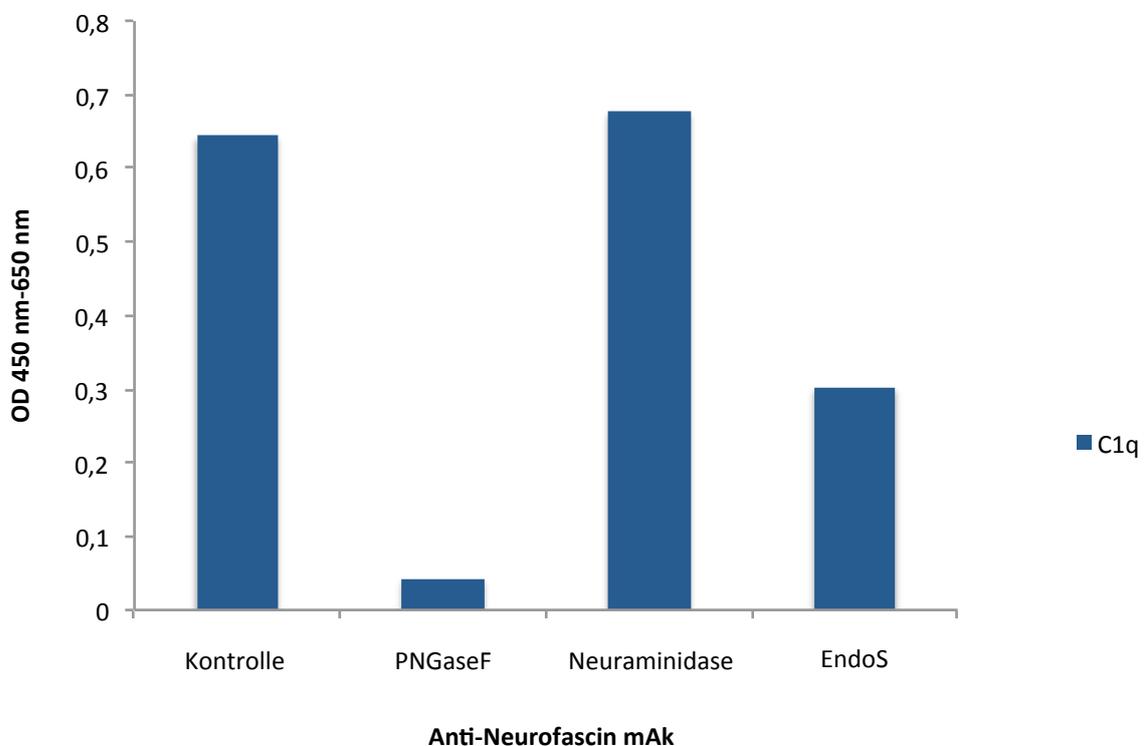


Abb. 3.10: C1q-ELISA

Die unbehandelten und deglykosylierten NF-Antikörper wurden auf die C1q-Bindung hin überprüft. Die gemessene OD (Optische Dichte) ist ein Maß für die Bindungsintensität zwischen den Anti-Neurofascin mAb A12/18.1 und C1q. Je höher die OD, desto mehr Interaktion bestand zwischen C1q und den AK. Es zeigte sich eine hohe Aktivität bei den Neuraminidase verdauten AK und den unbehandelten AK, sowie eine niedrige Aktivität bei den PNGaseF und EndoS behandelten AK.

(Analyse in Zusammenarbeit mit F. Nimmerjahn: C1q-ELISA, wie oben beschrieben, wurde vom Labor von F. Nimmerjahn durchgeführt mit den zuvor übermittelten, unbehandelten und deglykosylierten AK-Proben)

3.2 Modulation und Reaktivität von Aquaporin-4-Antikörpern von Patienten mit NMOSD

Nach erfolgreicher Deglykosylierung monoklonaler Mausantikörper, sollte nun eine mögliche Deglykosylierung polyklonaler humaner Antikörper untersucht werden.

Hierzu wurden Patientenserum herangezogen und untersucht.

Bei akuten Schüben von Neuromyelitis-optica-Patienten kann eine therapeutische Plasmapherese, welche Blutplasma mit all seinen Bestandteilen aus dem Vollblut herausgefiltert, hilfreich sein. Die Reinigung aus dem Blut der Bestandteile, wie pathogene Antikörper, kann eine Schubintensität lindern. Die Plasmaproben der NMOSD-Patienten ermöglichten die Untersuchung von polyklonalen humanen Antikörpern.

Um spezifisch IgG aus den Proben zu isolieren, wurden diese mithilfe von einer Protein G-Säule aufgereinigt.

3.2.1 Differentielle Deglykosylierung von Aquaporin-4-Antikörper aus NMOSD-Plasmapheresen

Bei dem aufgereinigten polyklonalen ImmunglobulinG-Gemisch handelt es sich u.a. um Aquaporin-4-Antikörper, welche spezifisch bei NMOSD-Patienten nachweisbar sind.

Nach der IgG-Aufreinigung wurden die Proben weiter aufbereitet wie auch schon die NF-Antikörper. Die zur Deglykosylierung verwendeten Enzyme waren Neuraminidase, PNGaseF und EndoS. Die Enzyme schneiden die Zuckerenden wie oben beschrieben. Die Konzentrationsbestimmungen erfolgten ebenfalls empirisch und die Detektion der Deglykosylierung wurde durch einen Lektin-Blot mit SDS-PAGE gezeigt.

Wie auch bei den NF-Ak wurde zunächst eine SDS-PAGE (*Abb. 3.11*) zum Nachweis der Deglykosylierungen der humanen IgG (darunter AQP4-Ak) angewandt.

Ein minimaler molekularer Gewichtsunterschied zwischen den verdauten und unverdauten AK konnte hierdurch gezeigt werden. Dabei waren die mit EndoS und PNGaseF deglykosylierten Antikörper ca. 3kD leichter als die nicht deglykosylierten, was ein Nachweis für die erfolgreiche Deglykosylierung der IgG darstellte. Der Verdau der terminalen Sialinsäure mit Neuraminidase führt nur zu einer geringen Reduktion des

Molekulargewichts, die im Coomassie-Gel nicht sichtbar war. Der Abbau der Neuraminsäure-Reste wurde aber im Lektin-Blot mit SNA nachgewiesen. (Abb. 3.12)

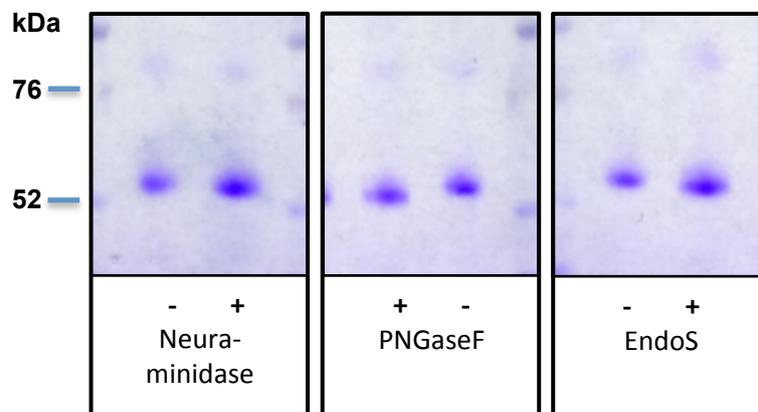


Abb. 3.11: SDS-PAGE aufgereinigter deglykosylierter Plasmapheresen (u.a. Anti-Aquaporin-4 Antikörper)

Für die Gelelektrophorese wurden die aufgereinigten Plasmapheresen (u.a. Anti-AQP4-Ak) zusammen mit dem Auftragspuffer in die Taschen aufgetragen. Zur Markierung des Größenstandards wurde der Full-Range Rainbow Marker verwendet. Die Coomassie-Färbung demaskierte die Antikörper in einem Bereich zwischen 52 und 76 kDa. Im Vergleich zu den unveränderten Antikörper zeigten die mit zuvor Neuraminidase, PNGaseF oder EndoS inkubierten Antikörper eine Größendivergenz.

Die mit Neuraminidase behandelten IgG waren im Lektin-Blot nicht mit SNA, welches an der Neuraminsäure bindet, anfärbbar. Das Signal der unbehandelten AK war mit SNA gut detektierbar. Eine enzymatische Abspaltung der Neuraminsäuren durch Neuraminidase konnte dadurch gezeigt werden. (Abb. 3.12)

Nach der Hydrolyse der an Asparagin²⁹⁷ gebundenen Zuckerkette durch PNGaseF wurde im Blot kein Signal durch LCA erkennbar. Im Vergleich dazu war das Signal der unbehandelten IgG gut erkennbar. Das LCA markiert die Mannose in den Zuckerketten, welche bei den PNGaseF behandelten AK fehlt. Eine komplette Deglykosylierung der Zuckerkette hat somit stattgefunden.

Im Gegensatz zu den unverdauten AK zeigte der Lektin-Blot ein reduziertes Signal durch LCA-Anfärbung bei den EndoS-deglykosylierten AK. Damit konnte die Zuckerabspaltung durch EndoS an den IgG veranschaulicht werden, da der LCA anfärbbare mannosehaltige Teil der IgG-Glykosylierung abgespalten wurde.

Die hydrolytische Wirkung konnte somit bei allen Enzymen im Lektin-Blot durch die reduzierten Signalintensitäten nachgewiesen werden. (Abb. 3.12)

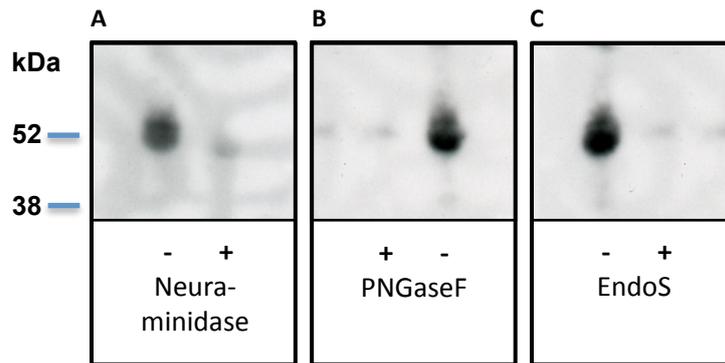


Abb. 3.12: Lektin-Blot aufgereinigter deglykosylierter Plasmapheresen (u.a. Anti-Aquaporin-4 Antikörper)

Im Lektin-Blot der SDS-PAGE für die aufgereinigten Plasmapheresen (u.a. Anti-AQP4-Ak) wurden die Deglykosylierungen der Neuraminidase durch Anfärben mit SNA (*A*) und der PNGaseF bzw. des EndoS (*B und C*) durch Anfärben mit LCA dargestellt. Die unveränderten Antikörper ließen sich dabei gut anfärben. Bei den deglykosylierten Antikörpern ist das Anfärben mit Lektinen nicht möglich. Daher lässt sich auf eine Hydrolyse einzelner Zuckersequenzen durch die Enzyme schließen.

Sowohl die SDS-PAGE als auch der Lektin-Blot zeigen die Veränderungen der Glykosylierungen der humanen Immunglobuline G (mit unter Anti-AQP4-Ak).

Die Enzyme EndoS, PNGaseF und Neuraminidase haben somit an verschiedenen Stellen die Zuckerketten der AK geschnitten.

Für jede neuangesetzte Deglykosylierung der Plasmapheresen wurde im Anschluss eine SDS-PAGE und ein Lektin-Blot durchgeführt, um die Wirksamkeit der Enzyme nachzuweisen.

3.2.2 Etablierung einer mit Aquaporin-4 stabil transfizierten Zelllinie

Für die Untersuchung der Antigenerkennung von deglykosylierten und unbehandelten Aquaporin-4-Antikörpern musste das Zielantigen Aquaporin-4 zunächst in eine Zelllinie stabil transfiziert werden, welche diese Zielstruktur dann auf ihren Oberflächen exprimieren.

Als Trägerzelle für das Antigen Aquaporin-4 wurden HEK 293-Zellen ausgesucht. Es erfolgte eine Transfektion mit einem rekombinanten Plasmid (erhalten von Prof. Reindls

Arbeitsgruppe), welches aus dem Vektor pcDNA™ 6.2C-EmGFP-GW/TOPO® (Abb. 3.13) und dem humanen Aquaporin-4 fusioniert wurde. (Mader et al. 2010)

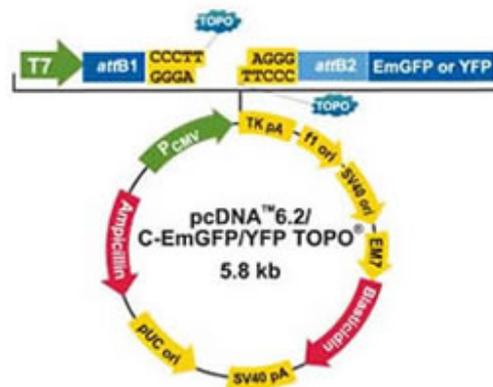


Abb. 3.13: Vektor pcDNA™ 6.2C-EmGFP-GW/TOPO® (Invitrogen)

In dem dargestellten Vektor wurde mit AQP4 inseriert, um das rekombinante Plasmid AQP4-M23-EmGFP (humanes Aquaporin-4, Isoform M23, Fusionsprotein mit EmFGP) zu bilden. Darauf enthalten ist ebenfalls eine Resistenz gegen Blastizidin.

Mit Hilfe von Elektroporation wurde das Plasmid AQP4-M23-EmGFP (humanes Aquaporin-4, Isoform M23, Fusionsprotein mit EmFGP) zunächst in Bakterien eingeschleust und in Medium kultiviert, um das Plasmid zu vermehren. Mithilfe des QIAGEN-Plasmid-Kits konnte die Plasmid-DNA aus den Bakterienkulturen anschließend isoliert und aufgereinigt werden. Eine PCR-Analyse überprüfte die DNA der aufgereinigten Plasmide (AQP4-M23-EmGFP im Vergleich zu einem Leervektor).

Die Transfektion des Plasmids AQP4-M23-EmGFP in die HEK 293-Zellen erfolgte chemisch mittels FuGENE® 6. Die Zellen erhielten mit dem Plasmid zusätzlich eine Resistenz gegen das Antibiotikum Blastizidin. Um eine stabile Transfektion zu erreichen, wurden die Kulturmedien mit Blastizidin angereichert. Zellen ohne das Plasmid sind in dem Medium nicht überlebensfähig, so dass das aufgenommene Plasmid als Überlebensgarant in der Zelle verbleibt und nicht wieder ausgeschleust wird.

In der FACS-Analyse (Abb. 3.14) konnte die erfolgreiche Transfektion anhand der GFP-Markierung des Plasmids bestätigt werden.

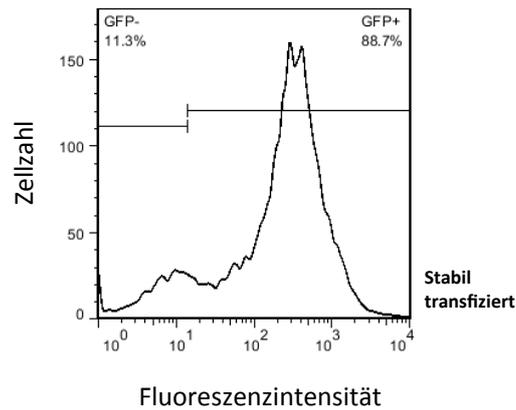


Abb. 3.14: FACS-Analyse transfundierter HEK 293-Zellen

Die FACS-Analyse zeigt die stabil mit dem Plasmid AQP4-M23-EmGFP transfundierten HEK 293-Zellen anhand des Farbstoffes GFP im Plasmid. Die transfundierten Zellen können so von Zellen ohne GFP Expression unterschieden werden.

3.2.3 Erkennung von Aquaporin-4 der differentiell deglykosylierten AKs aus den NMOSD-Plasmapheresen

Zunächst wurde die Bindungsaffinität der NMOSD-Plasmapheresen gegenüber dem stabil transfundierten Antigen AQP4 auf den HEK 293-Zellen zu überprüfen. Die folgenden FACS-Analysen beziehen sich auf die enthaltenen AQP4-Ak in der PPH.

Die spezifische Antigenbindung der PPH an den HEK 293 AQP4-Zellen konnte anhand der erhöhten Fluoreszenzintensität nachgewiesen werden. Eine spezifische Bindung der PPH an den HEK 293-Zellen fand nicht statt. Zudem wurde das AQP4 freie Kontrollserum (HC38) weder von den HEK 293 noch von den transfundierten Zellen gebunden. (Abb. 3.15)

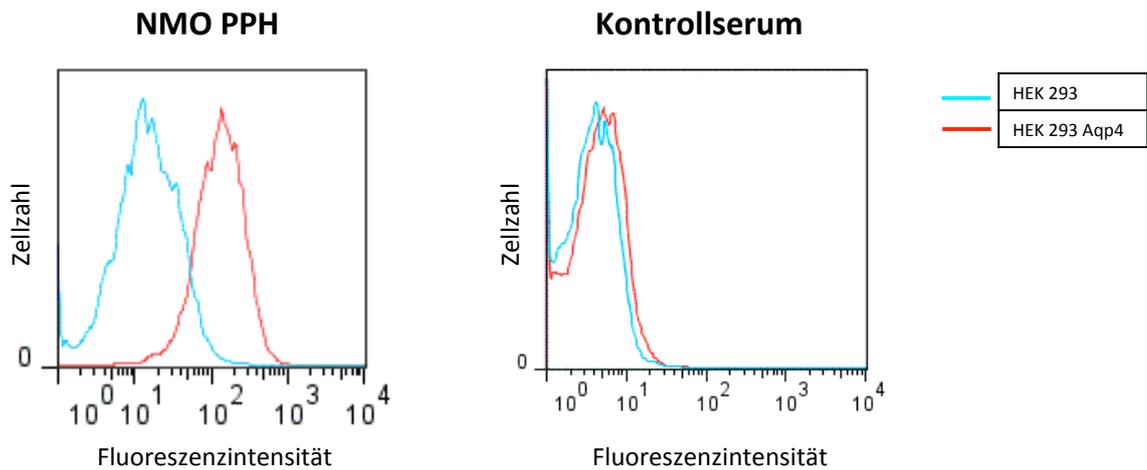


Abb. 3.15: FACS-Analyse zum Nachweis der Antigenerkennung der HEK 293 AQP4-Zellen

Die HEK 293 AQP4-Zellen, sowie den nicht transfizierten HEK 293-Zellen, wurden zusammen mit einer NMOSD-Plasmapherese und einem Kontrollserum (HC38) inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde der antihuman IgG Dylight 649 (Jackson Immuno Research) verwendet. Nur die NMOSD-PPH zusammen mit den AQP4 positiven Zellen führt zu einem Fluoreszenzanstieg. Es findet nur hier eine spezifische AQP4 Ak-Ag-Bindung statt.

Für die Überprüfung der Antikörper-Antigen-Reaktion der deglykosylierten AQP4-Antikörper der Plasmapheresen von NMOSD-Patienten, wurden die PPHs zusammen mit den AQP4 transfizierten HEK 293 Zellen inkubiert. Zur Markierung wurde der Sekundärantikörper antihuman IgG Dylight 649 (Jackson Immuno Research) verwendet. Als Positivkontrolle diente die nicht deglykosylierte Plasmapherese. Das Serum eines nicht NMOSD-Patienten (Serum HC38) wurde als Negativkontrolle verwendet.

Die Fluoreszenzintensität in der Durchflusszytometrie (Abb. 3.16) der NMOSD-PPH stellte sich als erhöht im Vergleich zu der Negativkontrolle des Serums dar. Dies bedeutet, die in der Plasmapherese enthaltenen AQP4-Ak binden das Ag der transfizierten Zellen.

Die deglykosylierten NMOSD-PPH zeigten zudem keinen Unterschied in der Fluoreszenzmessung zu den nicht modifizierten NMOSD-PPH auf. Die Antigene werden von den AQP4-Ak vor wie nach dem Deglykosylieren gleich gut gebunden. Die Antigenerkennung bleibt nach Deglykosylierung somit unverändert.

Der Versuch wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen der NMOSD-PPH durchgeführt (0,1 µg/ml bis 100 µg/ml), wobei die Fluoreszenzintensität der Plasmapheresen im Vergleich zur Negativkontrolle mit zunehmender Konzentration deutlicher darzustellen war.

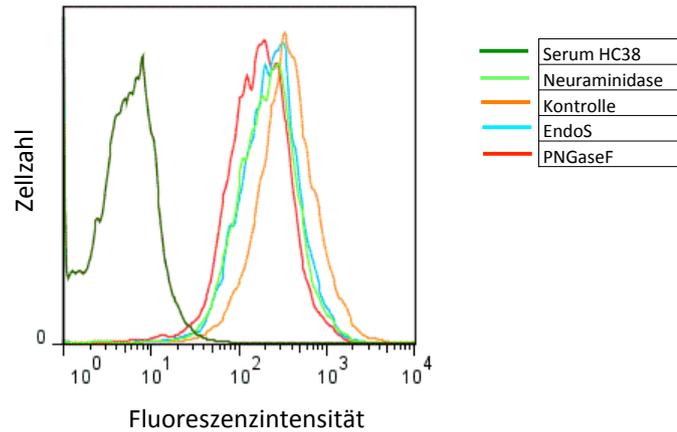


Abb. 3.16: FACS-Analyse zur Antigenbindung der Plasmapheresen

In der FACS-Analyse wurde die Antigenbindung deglykosylierter IgG der Plasmapheresen überprüft. Die AQP4-positiv transfizierte HEK 293-Zellen dienen als Oberflächenträger des Antigens. Die Plasmapheresen beinhalten den AQP4 Antikörper. Die deglykosylierten Antikörper zeigen die gleiche Antigenbindung, wie die nicht deglykosylierten AK. Die Bindungsaffinität zwischen Ag und AK bleibt unbeeinflusst bei der Deglykosylierung. Die Negativkontrolle (Serum HC38) zeigte wie erwartet keine Bindung am AQP4-Ag. Die Konzentration der NMOSD-PPH betrug hier 10 µg/ml.

Aus der FACS-Analyse können somit zwei Rückschlüsse gezogen werden. Zum einen binden die AQP4-Ak aus den NMOSD-PPH das AQP4 der stabil transfizierten Zellen. Und zum anderen haben die Deglykosylierungen der aufgereinigten NMOSD-PPH keinen Einfluss auf die Antigenbindung des Antikörpers.

Aufgrund der guten Bindungsaffinität konnten in weiteren Ansätzen die stabil transfizierten AQP4 Zellen zur Quantifizierung der AQP4-Ak aus den NMOSD-PPH in der experimentellen Arbeit von E. Edwards (ehemals E. Kachaturian) verwendet werden.

4 Diskussion

Die genaue Ursache der chronisch entzündlichen Erkrankungen des ZNS ist noch immer nicht vollständig geklärt, von autoimmunologischen Prozessen ist allerdings auszugehen.

Pathophysiologisch entstehen Läsionen in der weißen Substanz des ZNS durch entzündliche Genese, was zu einer Demyelinisierung und schließlich zum axonalen Schaden der Nervenzellen führt. (Lucchinetti 2000) Es ist davon auszugehen, dass es sich um ein komplexes immunologisches Geschehen handelt, bei welchen viele Komponenten wie B- und T-Zellen, Makrophagen oder Komplementaktivierung eine Rolle spielen. (Dornmair et al. 2009, Krumbholz 2006, 2012) Hierbei ließen sich zudem in den letzten Jahren Autoantigene, Proteinbestandteile der Myelinschicht der Oligodendrozyten als Angriffspunkte des Autoimmunologischen Geschehens detektieren. Zu diesen Zielstrukturen zählen u.a. MOG (Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein), welches an der Außenseite von Oligodendrozyten oder MBP (basisches Myelinprotein), welches im Inneren des Myelins zu finden ist. Ebenso Neurofascin, ein Protein an den Ranvierschen Schnürringen stellt eine mögliche Zielstruktur für Autoantikörper dar. (Derfuss et al. 2010, Ng et al. 2012, Mayer et al. 2012) Speziell bei der NMOSD konnte Aquaporin-4, ein astrozytischer Wasserkanal als Autoantigen identifiziert werden. (Lennon et al. 2004, Wingerchuk et al. 2007, Takahashi et al. 2007)

Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass Antikörper gegen MOG, die aus dem Blut von Patienten gereinigt wurden, im Tiermodell eine durch T-Zellen induzierte Pathologie verstärken (Spadaro et al.). Das spricht dafür, dass die MOG-Ak auch beim Patienten eine pathogene Wirkung haben.

Dies wird auch deutlich, da durch therapeutische Plasmapheresen bei einem großen Anteil von Patienten die klinischen Symptome eines Schubes verringert werden können, indem hier Bestandteile wie Autoantikörper aus dem Blut herausgewaschen werden. (Keegan et al. 2005)

Autoantikörpern scheint im Krankheitsprozess somit eine wesentliche Rolle zugeschrieben werden zu können. In dieser Arbeit richtete sich damit der Fokus auf Autoantikörper wie anti-Neurofascin und anti-Aquaporin-4, um Effektorfunktionen näher zu beleuchten.

4.1 Enzymatische Deglykosylierung von Autoimmunantikörpern

Die Glykosylierungen von Antikörper sind schon länger bekannt zur Stabilisierung der Antikörperstruktur. Dadurch wird sicher gestellt, dass Epitope richtig erkannt und damit Effektorfunktionen reguliert werden. (Arnold et al. 2007, Selman et al. 2011) Konformationsänderungen des Antikörpers können somit über die Veränderung der Glykosylierungen erreicht werden, was wiederum eine differente Bindungsaffinität zum Fc-Rezeptor und der letztendlichen Antikörperaktivität nach sich zieht. (Nimmerjahn et al. 2008)

Die Glykosylierungen sind an Asparagin 297 einer Aminosäure des Fc-Teils der Antikörper gebunden. (Arnold et al. 2007, Nimmerjahn et al. 2008) Diese Zuckerketten können an verschiedenen Stellen hydrolysiert werden. Albert et al. (2008) haben gezeigt wie EndoS die Zuckerketten von aufgereinigten IgG aus Humanen- oder Hasen-Seren hydrolysiert und die immunologischen Abläufe stören kann. Auch Allhorn et al. (2010) ist es gelungen bei Autoimmunhämolytischer Anämie, verursacht durch Autoantikörper gegen Rote Blutkörperchen zu zeigen, wie EndoS als immunmodulierendes Enzym wirken kann, Effektorfunktionen wie Phagozytose oder Komplementaktivierung beeinflusst und speziell an IgG Zuckerketten abspaltet.

Diese Ergebnisse wurden als Anhaltspunkte zur Überprüfung der These angenommen, ob eine Modifikation auch bei den aufgereinigten monoklonalen Neurofascin Antikörpern A12/18.1 aus Hybridomzellen, sowie im weiteren Verlauf bei den aus humanen NMOSD-Plasmapheresen aufgereinigten polyklonalen Aquaporin-4-Antikörpern durchführbar ist. Im Lektin-Blot und der SDS Page wurde für beide Antikörper eine reproduzierbare Deglykosylierung gezeigt. Im Coomassie-Gel wurde der Nachweis einer Deglykosylierung mit EndoS und PNGaseF durch die verminderten Molekulargewichte der Antikörper nachgewiesen. Aufgrund der Randständigkeit der Neuraminsäuren an den Zuckerketten der IgG bedingt sich hier ein nur minimaler Gewichtsunterschied nach Neuraminidase Deglykosylierung, der sich im Coomassie-Gel lediglich erahnen lässt. Der Lektin-Blot zeigt bei allen Antikörpern und Enzymen ein reduziertes Signal im Vergleich zu den undeglykosylierten Antikörpern.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit Nandakumar et al. (2007), zeigt sich auch hier für die Kollagen Typ II spezifischen AK ein ähnlicher Gewichtunterschied in der SDS-Page nach EndoS Deglykosylierung und reduzierter Signalintensität im Lektin-Blot.

Collin et al. (2008) zeigten mittels Lektin-Blot bei steigender Konzentration des Enzyms EndoS eine abnehmende Signalintensität, was für das graduelle Schneiden von Zuckerketten der Schwere IgG Kette spricht.

Insgesamt lässt sich zeigen, dass eine Deglykosylierung der verschiedenen IgG möglich ist. Zudem ist dies an unterschiedlichen Schnittstellen durch verschiedene Enzyme gelungen, eine spezifische Deglykosylierung ist somit möglich. Es lag nun Nahe, die Bindungsfähigkeit des Fab-Fragments der Antikörper zu überprüfen, ob hier Einfluss durch die Deglykosylierung genommen wird und eine Konformationsänderung stattfindet.

4.2 Unveränderte Antigen-Antikörper-Reaktion nach differentieller Deglykosylierung

Nach der erfolgreichen Deglykosylierung der Antikörper wurde überprüft, inwiefern diese funktionsfähig bleiben und Antigene erkennen bzw. binden. Ist es hier zu einer Konformationsänderung des Fab-Fragments des Antikörpers gekommen?

Die Antigenbindung des NF-spezifischen mAbs wurde separat mittels stabil NF-186 transfizierter Zellen im Vergleich zu untransfizierten Wildtyp-Zellen untersucht. In der Durchflusszytometrie wurde gezeigt, dass die Antikörper keine Antigenbindung zu den Wildtyp-Zellen aufbauen und somit spezifisch das NF-186 der transfizierten Zellen erkennen. In der Fluoreszenzmessung zeigte sich die gleiche Intensität der deglykosylierten Antikörper, wie bei den nicht enzymatisch behandelten Antikörpern. Somit lässt sich der Rückschluss ziehen, dass die verwendeten Enzyme keinen Einfluss nehmen auf die Konformation des Fab-Fragments und deren Antigenerkennung bzw. Antigenbindungsfähigkeit.

Für die Antigenüberprüfung der AQP4-Ak wurden Trägerzellen mit Aquaporin-4 transfiziert. Die hierfür verwendeten HEK 293 Zellen exprimierten nach Transfektion eines rekombinanten Plasmids (Fusion aus Vektor und humanen AQP4) stabil das Antigen auf ihrer Oberfläche, so dass diese Zellen zur FACS-Analyse herangezogen wurden. Die spezifische Antigenerkennung wurde zum einen gezeigt, durch die erhöhte Fluoreszenzintensität bei AQP4 enthaltenen NMOSD-PPH mit stabil transfizierten AQP4 Trägerzellen im Vergleich zu den untransfizierten HEK 293-Zellen. Zum anderen wurde eine

Antigenerkennung eines Kontrollserums mittels FACS-Analyse ausgeschlossen, weder mit den HEK 293-Zellen noch den AQP4 HEK 293-Zellen ergab sich eine Bindung.

Vergleicht man nun die deglykosylierten AK mit den unveränderten NMOSD-PPH und einem AQP4 freiem Kontrollserum, zeigt sich eine unveränderte Bindungsaffinität der aufgereinigten NMOSD-PPH unabhängig von dem Enzymverdau und keine Bindung des Kontrollserums an den Antigenen der AQP4 Trägerzellen.

Die AQP4-Ak erkennen somit spezifisch das Antigen und die Affinität bleibt unbeeinflusst durch die Deglykosylierungen.

Nandakumar et al. (2007) konnten in vivo zeigen, dass kein Unterschied in der Antigenbindung von EndoS behandelten zu nicht enzymatisch behandelten AK besteht. Dafür wurden Kollagen Typ II spezifische AK in Mäuse injiziert und im Anschluss die unveränderte Bindungsfähigkeit an den Gelenkknorpeln dargestellt.

Die mit EndoS geschnittenen anti-D-Ak wiesen bei Allhorn et al. (2010) ebenfalls keine unterschiedliche Bindung der roten Blutkörperchen auf. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass dies für alle IgG Subtypen 1-4 möglich ist (Allhorn et al. 2008)

Insgesamt lässt sich zeigen, dass durch die Deglykosylierungen am Fc Teil durch die einzelnen Enzyme an verschiedenen IgG keine Antigenbindungseinschränkung besteht und der Fab Teil der Immunglobuline unberührt bleibt und sich die Konformation nicht ändert. Die Ergebnisse legten dies zudem nicht nur für EndoS dar, sondern auch für die Enzyme PNGaseF und Neuraminidase.

4.3 IgG-Glykosylierungen beeinflussen Effektorfunktionen der Antikörper

Über die Interaktion mit Fc-Rezeptoren können Antikörper immunregulatorisch interagieren. Fc-Rezeptoren sind Membranrezeptoren auf myeloiden Zellen des Immunsystems wie Makrophagen oder B-Zellen. Die Rezeptoren triggern eine immunologische Antwort wie Phagozytose oder Freisetzung von Entzündungsmediatoren. Je nach Rezeptortyp wird eine proinflammatorische oder inhibitorische Reaktion ausgelöst. (Nimmerjahn et al. 2008, Janeway Immunologie Murphy/Travers/Walport 2009)

Macht man sich nun die Eigenschaften von Fc-Rezeptoren zu nutze, kann man die Aktivierungsmöglichkeiten der deglykosylierten IgG untersuchen und ob durch die verschiedenen Schnittstellen der Enzyme an den Zuckerketten unterschiedliche Konformationsveränderungen und damit Bindungsaffinitäten induzierbar sind.

Für eine zelluläre Reaktion bei Aktivierung der Fc-Rezeptoren benötigt es verschiedene Komponenten. Dafür bedarf es einen bestimmten Konformationszustand der Antikörper, um die Rezeptoren adäquat aktivieren zu können. Dieser Zustand wird erreicht, wenn der Antikörper das entsprechende Antigen gebunden hat. (Janeway Immunologie Murphy/Travers/Walport 2009) Die einzelnen Komponenten Antigen, Antikörper und Fc-Rezeptoren wurden in einem Versuchsaufbau zusammengefügt, um das Maß der Fc-Rezeptor-Aktivierung, einer Effektorfunktion durch Antikörper, zu eruieren. Als Antigen wurde Neurofascin verwendet, welches auf der Oberfläche von transfizierten Zellen exprimiert wurde (TE-NF186-Zellen). Wie bereits nachgewiesen können, die NF-Ak (anti-NF A12/18.1) diese erkennen und binden unabhängig von der Glykosylierung bzw. des Konformationszustandes des Fc-Fragments. Als Träger von FcγI/II-Rezeptoren (Fleit et Kobasiuk 1991) eigneten sich THP1 Zellen, monozytäre Leukämiezellen. Bei Stimulation dieser Rezeptoren wird IL8 (Janeway Immunologie Murphy/Travers/Walport 2009) ausgeschüttet, welches wiederum im ELISA quantifiziert werden konnte. Die Funktionsfähigkeit des Versuchsaufbaus wurde überprüft mittels Inkubation von THP1-Zellen zusammen mit NF-Antikörpern und TE-NF-Zellen bzw. TE-Wildtypzellen. Hier kam es nur bei Verwendung der Antigenpräsentierenden TE-NF-Zellen zu einer ansteigenden IL8 Ausschüttung bei entsprechender Erhöhung der NF-Ak Konzentration. Eine IL8 Produktion als Störvariable von TE-Zellen wurde ausgeschlossen. Der Stimulationsaufbau zeigt damit eine antigenspezifische und dosisabhängige IL8 Induktion der FcγI/II-Rezeptoren tragenden THP1-Zellen. Bei den Stimulationsversuchen mit den verschieden hydrolysierten NF mAk A12/18.1 zeigten sich unterschiedlich hohe IL8 Konzentrationen. Bei Stimulation durch Neuraminidase deglykosylierten NF-Antikörpern wurde eine etwas stärkere IL8-Ausschüttung erreicht wie durch den unbehandelten AK. Im Gegensatz dazu erzielten PNGaseF und EndoS deglykoslierten NF-Ak eher geringere IL8 Konzentrationen. Zudem ist dieser Effekt mit steigender Antikörper-Konzentration verstärkt darstellbar. Reproduzierbar und signifikant ist diese unterschiedliche Fc-Rezeptor-Aktivierung vor allem in einem Bereich von 0,01 µg/ml bis 0,3 µg/ml der AK-Konzentrationen gezeigt worden. Bei hohen AK-Konzentrationen konnte dieser Effekt nicht

mehr deutlich dargestellt werden, da dies bei allen Antikörpern zu einer starken Stimulation mit IL8-Ausschüttung führte.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Resultaten von Allhorn et al. (2010), die einen ähnlichen Versuchsaufbau zur IL8 Stimulation von THP1-Zellen bzw. Monozyten verwendeten, zeigte sich auch hier nach EndoS Behandlung der anti-D-Ak ein reduzierter Effekt in der IL8 Sekretion. Nandakumar et al. (2007) wiesen dies ebenso für Arthritis-Antikörper nach Deglykosylierung mit EndoS nach. Die AK induzierten hier eine mildere Arthritis in Mäusen. Die Antigenbindung blieb bei diesen Versuchen ebenfalls unverändert. Die Konformationsänderung des Fc-Teils der AK resultierte in einer geringeren Fc-Rezeptorbindung.

Die Fc-Rezeptor-Aktivierung scheint damit abhängig vom Konformationszustand des Antikörpers zu sein, welcher wiederum durch die Zuckerketten bestimmt wird. Unterschiedliche Konfigurationen der Zuckerketten, verändert durch Enzyme, führen zu unterschiedlich starken Effektorfunktionen.

Antikörper können nicht nur an membranös gebundene Fc-Rezeptoren binden, sondern können auch über das Fc-Fragment weitere Kaskaden wie das Komplementsystem der humoralen Immunantwort in Gang setzen. Die Kaskade des klassischen Weges der Komplementaktivierung wird hier über das Andocken von IgG an C1q in Gang gesetzt. (Janeway Immunologie Murphy/Travers/Walport 2009) In Zusammenarbeit mit der Gruppe von F. Nimmerjahn war es möglich, die Bindung von den zuvor deglykosylierten NF-Ak an Komplementfaktoren zu untersuchen. Hier ergaben sich im ELISA, welcher die Bindungsaffinität zwischen AK und dem Komplementfaktor C1q darstellt, vergleichbare Ergebnisse wie im Simulationsversuch. Die mit Neuraminidase zuvor behandelten Anti-Neurofascin AK wiesen eine ähnlich stärkere bzw. etwas verstärkte Bindungsintensität im Vergleich zu den unbehandelten AK auf. Für EndoS deglykosylierte NF-Ak konnte eine reduzierte Bindung dargestellt werden. Vor allem bei den PNGaseF verdauten NF-Ak zeigte sich eine stark verminderte Bindungsintensität zum Komplementfaktor im Gegensatz zu den im Normalzustand belassenen NF-Ak.

Verglichen mit anderen Arbeiten spricht dies ebenfalls dafür, dass es eine Konformationsveränderung geben muss, je nach Glykosylierung des Fc-Fragments.

Leatherbarrow et al. (1984) haben herausgefunden, dass monoklonale Maus anti-DNP IgG2a zwar C1q im aglykosylierten Zustand binden konnten, die Dissoziationskonstante und die Aktivierung von C1 aber deutlich reduziert war.

Bei Allhorn et al. (2007) war die Bindung der EndoS deglykosylierten anti-D Antikörper an C1q und somit die Komplementaktivierung durch IgG ebenfalls stark reduziert.

Die Glykosylierung der Antikörper am Fc-Fragment nimmt somit Einfluss auf den Konformationszustand, welcher maßgeblich für die Bindungsfähigkeit und schließlich für die Effektorfunktion der AK verantwortlich ist. Sowohl Fc-Rezeptor Aktivierungen, wie auch Bindungen am Komplementfaktor können durch Deglykosylierungen verstärkt oder reduziert werden. Es lies sich nachweisen, dass durch eine Neuraminidase Behandlung eher ein stärkerer Effekt und durch PNGaseF, sowie EndoS ein verminderter Effekt bei IgG Funktionen zu erwarten ist.

5 Zusammenfassung

Der Nachweis von Autoantikörpern bei Patienten mit entzündlichen Erkrankungen des Nervensystems ist von großer diagnostischer Bedeutung. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass zumindest einige dieser Autoantikörper auch pathogene Bedeutung haben. An diesen pathogenen Effekten können Bindungen an Fc-Rezeptoren und Komplement-Aktivierungen beteiligt sein. Diese Effektorfunktionen werden durch den Isotyp der Antikörper und auch durch unterschiedliche Glykosylierungen des Fc-Teils bestimmt. IgG hat eine bekannte N-Glykosylierungsstelle an Asparagin 297. Die angehängten Zuckerketten an dieser Stelle können unterschiedlich modifiziert sein. Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit dem Einfluss dieser Fc-Glykosylierungen auf Autoantikörper, die an der Krankheitsentwicklung von entzündlichen Erkrankungen des Nervensystems beteiligt sein können. Dazu wurden zum einen monoklonale Neurofascin A12/18.1 Antikörper und zum anderen Plasmapheresenmaterial von Patienten mit Neuromyelitis optica verwendet, die Antikörper gegen Aquaporin-4 aufweisen. Neurofascin kommt in zwei Isoformen vor, NF155 in den Paranoden im Myelin und NF186, in den Ranvierschen Schnürringen. Neurofascin ist im zentralen und peripheren Nervensystem in gleicher Weise zu finden. Der hier verwendete mAk gegen Neurofascin induziert im Tiermodell einen axonalen Schaden im zentralen Nervensystem und verstärkt eine Entzündung im peripheren Nervensystem. Während die Beteiligung von Autoantikörpern gegen Neurofascin bei menschlichen Erkrankungen des zentralen Nervensystems noch unklar ist, konnten Kollegen in meinem Labor parallel zu dieser Arbeit Neurofascin Autoantikörper bei einem Teil der Patienten mit Entzündungen des peripheren Nervensystems nachweisen.

Der monoklonale Neurofascin-Antikörper A12/18.1 wurde in meiner Arbeit mit drei verschiedenen Glykosidasen (PNGaseF, EndoS und Neuraminidase) verdaut. Die PNGaseF schneidet direkt am Asparagin und führt dadurch zu einer kompletten Deglykosylierung. Die IgG-spezifische Glykosidase EndoS schneidet zwischen Mannose und GlcNAc und führt so zu einer weitgehenden Deglykosylierung. Neuraminidase schneidet nur die terminalen N-Acetylneuraminsäure ab. Diese differentiellen Deglykosylierungen wurden mittels SDS-PAGE und Lektin-Blot untersucht. Ein reduziertes Molekulargewicht vor allem für EndoS und PNGaseF verdaute NF-Ak war in der SDS-PAGE im Gegensatz zu den unbehandelten AK ersichtlich. Der Lektin-Blot zeigte bei allen deglykosylierten Antikörpern eine abgeschwächte Signalintensität im Vergleich zu den unveränderten Antikörpern.

Der deglykosylierende Effekt der Enzyme konnte somit nachgewiesen werden. Die Antigen-Erkennung dieser verschieden deglykosylierten mAKs wurde nicht beeinträchtigt, wie aus einer FACS-Analyse mit Neurofascin transfizierten Zellen (TE-NF186) hervorgeht.

Für die Untersuchung der Fc-Rezeptor-Aktivierung durch deglykosylierte NF-Ak wurde ein Stimulationsversuch etabliert. Hierbei wurden die Effektorfunktion der verschieden verdauten AK anhand von IL8-Sekretionen von THP1-Zellen, einer monozytären Zelllinie, gemessen. Dabei dienten die TE-NF186-Zellen als Träger für das Zielantigen Neurofascin. Die AK aktivierten nach Bindung des Antigens die Fc-Rezeptoren der THP1-Zellen, was zur Sekretion von IL8 führte. Dabei zeigte sich eine verminderte IL8 Ausschüttung bei EndoS und PNGaseF verdauten AK im Gegensatz zu den unverdauten AK. Der Effekt bei den Neuraminidase deglykosylierten AK war etwas höher, verglichen mit den unbehandelten AK. Ein Einfluss durch Eigenproduktion der TE-Zellen wurde zuvor ausgeschlossen und die IL8-Sekretion als antigenspezifisch und dosisabhängig nachgewiesen. Eine statistische Signifikanz für die unterschiedlichen Stimulationseffekte konnte für die Konzentrationen 0,01 µg/ml bis 0,3 µg/ml der verschieden glykosylierten Neurofascin Antikörper belegt werden.

Eine weitere Effektorfunktion von Antikörpern, getriggert durch die Bindung am Fc-Teil, ist die Komplementaktivierung. Diese konnte, durch die Zusammenarbeit mit dem Labor von Falk Nimmerjahn (Universität Erlangen-Nürnberg), mit Hilfe von einem C1q-ELISA veranschaulicht werden. Der ELISA zeigte vergleichbare Ergebnisse wie die Stimulationsversuche. Nach PNGaseF oder EndoS Einsatz führten NF-Ak zu einer verminderten C1q-Komplementbindung. Auch diese zeigt sich somit je nach Deglykosylierung beeinflusst.

Weiter wurde in dieser Arbeit begonnen, die Effekte einer differentiellen Deglykosylierung von Antikörpern gegen Aqp4 zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden HEK293-Zellen stabil mit Aqp4 versehenen Plasmid transfiziert. Validiert wurde die Transfektion durch die Untersuchung der Bindung zwischen Aqp4-Ak enthaltenen Patientenmaterial (Plasmapheresen von NMOSD Patienten) und den HEK293-Zellen. Anschließend wurde Plasmapheresematerial von Patienten mit anti-Aqp4 differentiell deglykosyliert wie dies für den mAk gegen NF etabliert wurde. Diese differentielle Deglykosylierung wurde wieder anhand von SDS-PAGE und Lektin-blot bestätigt.

Zusammenfassend, diese Doktorarbeit zeigt, wie die differentielle Deglykosylierung die Effektorfunktionen, FcR-Aktivierung und C1q Bindung, eines mAKs gegen Neurofascin

beeinflusst und legt die Grundlage für weitere Untersuchungen des Effekts der Glykosylierung von Antikörpern gegen Aquaporin-4.

6 Literaturverzeichnis

- Albert, H., M. Collin, D. Dudziak, J. V. Ravetch and F. Nimmerjahn. "In Vivo Enzymatic Modulation of Igg Glycosylation Inhibits Autoimmune Disease in an Igg Subclass-Dependent Manner." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, no. 39 (2008): 15005-9.
- Allhorn, M., J. G. Briceno, L. Baudino, C. Lood, M. L. Olsson, S. Izui and M. Collin. "The Igg-Specific Endoglycosidase Endos Inhibits Both Cellular and Complement-Mediated Autoimmune Hemolysis." *Blood* 115, no. 24 (2010): 5080-8.
- Allhorn, M., A. I. Olin, F. Nimmerjahn and M. Collin. "Human Igg/Fc Gamma R Interactions Are Modulated by Streptococcal Igg Glycan Hydrolysis." *PLoS One* 3, no. 1 (2008): e1413.
- Alonso, A. and M. A. Hernan. "Temporal Trends in the Incidence of Multiple Sclerosis: A Systematic Review." *Neurology* 71, no. 2 (2008): 129-35.
- Arnold, J. N., M. R. Wormald, R. B. Sim, P. M. Rudd and R. A. Dwek. "The Impact of Glycosylation on the Biological Function and Structure of Human Immunoglobulins." *Annu Rev Immunol* 25, (2007): 21-50.
- Ascherio, A. and K. L. Munger. "Environmental Risk Factors for Multiple Sclerosis. Part I: The Role of Infection." *Ann Neurol* 61, no. 4 (2007): 288-99.
- Ascherio, A. and K. L. Munger. "Environmental Risk Factors for Multiple Sclerosis. Part II: Noninfectious Factors." *Ann Neurol* 61, no. 6 (2007): 504-13.
- Banks, W. A. "The Blood-Brain Barrier in Neuroimmunology: Tales of Separation and Assimilation." *Brain Behav Immun* 44, (2015): 1-8.
- Basta, M., L. F. Fries and M. M. Frank. "High Doses of Intravenous Immunoglobulin Do Not Affect the Recognition Phase of the Classical Complement Pathway." *Blood* 78, no. 3 (1991): 700-2.

- Bondt, A., Y. Rombouts, M. H. Selman, P. J. Hensbergen, K. R. Reiding, J. M. Hazes, R. J. Dolhain and M. Wuhrer. "Immunoglobulin G (Igg) Fab Glycosylation Analysis Using a New Mass Spectrometric High-Throughput Profiling Method Reveals Pregnancy-Associated Changes." *Mol Cell Proteomics* 13, no. 11 (2014): 3029-39.
- Bournazos, S., T. T. Wang, R. Dahan, J. Maamary and J. V. Ravetch. "Signaling by Antibodies: Recent Progress." *Annu Rev Immunol* 35, (2017): 285-311.
- Bruck, W., B. Popescu, C. F. Lucchinetti, S. Markovic-Plese, R. Gold, D. R. Thal and I. Metz. "Neuromyelitis Optica Lesions May Inform Multiple Sclerosis Heterogeneity Debate." *Ann Neurol* 72, no. 3 (2012): 385-94.
- Bruhns, P. "Properties of Mouse and Human Igg Receptors and Their Contribution to Disease Models." *Blood* 119, no. 24 (2012): 5640-9.
- Carson, M. J., J. M. Doose, B. Melchior, C. D. Schmid and C. C. Ploix. "Cns Immune Privilege: Hiding in Plain Sight." *Immunol Rev* 213, (2006): 48-65.
- Collin, M. and A. Olsen. "Endos, a Novel Secreted Protein from Streptococcus Pyogenes with Endoglycosidase Activity on Human Igg." *EMBO J* 20, no. 12 (2001): 3046-55.
- Collin, M., O. Shannon and L. Bjorck. "Igg Glycan Hydrolysis by a Bacterial Enzyme as a Therapy against Autoimmune Conditions." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, no. 11 (2008): 4265-70.
- Compston, A. and A. Coles. "Multiple Sclerosis." *Lancet* 372, no. 9648 (2008): 1502-17.
- Correale, J. and M. de los Milagros Bassani Molinas. "Oligoclonal Bands and Antibody Responses in Multiple Sclerosis." *J Neurol* 249, no. 4 (2002): 375-89.
- Crane, J. M., C. Lam, A. Rossi, T. Gupta, J. L. Bennett and A. S. Verkman. "Binding Affinity and Specificity of Neuromyelitis Optica Autoantibodies to Aquaporin-4 M1/M23 Isoforms and Orthogonal Arrays." *J Biol Chem* 286, no. 18 (2011): 16516-24.

- Crane, J. M. and A. S. Verkman. "Determinants of Aquaporin-4 Assembly in Orthogonal Arrays Revealed by Live-Cell Single-Molecule Fluorescence Imaging." *J Cell Sci* 122, no. Pt 6 (2009): 813-21.
- Derfuss, T., C. Linington, R. Hohlfeld and E. Meinl. "Axo-Glial Antigens as Targets in Multiple Sclerosis: Implications for Axonal and Grey Matter Injury." *J Mol Med (Berl)* 88, no. 8 (2010): 753-61.
- Dornmair, K., E. Meinl and R. Hohlfeld. "Novel Approaches for Identifying Target Antigens of Autoreactive Human B and T Cells." *Semin Immunopathol* 31, no. 4 (2009): 467-77.
- Etemadifar, M., Z. Nasr, B. Khalili, M. Taherioun and R. Vosoughi. "Epidemiology of Neuromyelitis Optica in the World: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Mult Scler Int* 2015, (2015): 174720.
- Fleit, H. B. and C. D. Kobasiuk. "The Human Monocyte-Like Cell Line Thp-1 Expresses Fc Gamma Ri and Fc Gamma Rii." *J Leukoc Biol* 49, no. 6 (1991): 556-65.
- Goetz, C. G. "Chapter 15: Jean-Martin Charcot and the Anatomico-Clinical Method of Neurology." *Handb Clin Neurol* 95, (2010): 203-12.
- Grigorian, A., H. Mkhikian, C. F. Li, B. L. Newton, R. W. Zhou and M. Demetriou. "Pathogenesis of Multiple Sclerosis Via Environmental and Genetic Dysregulation of N-Glycosylation." *Semin Immunopathol* 34, no. 3 (2012): 415-24.
- Hauser, S. L., E. Waubant, D. L. Arnold, T. Vollmer, J. Antel, R. J. Fox, A. Bar-Or, M. Panzara, N. Sarkar, S. Agarwal, A. Langer-Gould, C. H. Smith and Hermes Trial Group. "B-Cell Depletion with Rituximab in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis." *N Engl J Med* 358, no. 7 (2008): 676-88.
- Hemmer, B., J. J. Archelos and H. P. Hartung. "New Concepts in the Immunopathogenesis of Multiple Sclerosis." *Nat Rev Neurosci* 3, no. 4 (2002): 291-301.

Hohlfeld, R., K. Dornmair, E. Meinl and H. Wekerle. "The Search for the Target Antigens of Multiple Sclerosis, Part 1: Autoreactive Cd4+ T Lymphocytes as Pathogenic Effectors and Therapeutic Targets." *Lancet Neurol* 15, no. 2 (2016): 198-209.
(A)

Hohlfeld, R., K. Dornmair, E. Meinl and H. Wekerle. "The Search for the Target Antigens of Multiple Sclerosis, Part 2: Cd8+ T Cells, B Cells, and Antibodies in the Focus of Reverse-Translational Research." *Lancet Neurol* 15, no. 3 (2016): 317-31.
(B)

Huhn, C., M. H. Selman, L. R. Ruhaak, A. M. Deelder and M. Wuhrer. "Igg Glycosylation Analysis." *Proteomics* 9, no. 4 (2009): 882-913.

Kaneko, Y., F. Nimmerjahn and J. V. Ravetch. "Anti-Inflammatory Activity of Immunoglobulin G Resulting from Fc Sialylation." *Science* 313, no. 5787 (2006): 670-3.

Kao, D., H. Danzer, M. Collin, A. Gross, J. Eichler, J. Stambuk, G. Lauc, A. Lux and F. Nimmerjahn. "A Monosaccharide Residue Is Sufficient to Maintain Mouse and Human Igg Subclass Activity and Directs Igg Effector Functions to Cellular Fc Receptors." *Cell Rep* 13, no. 11 (2015): 2376-2385.

Kappos, L., E. W. Radue, P. O'Connor, C. Polman, R. Hohlfeld, P. Calabresi, K. Selmaj, C. Agoropoulou, M. Leyk, L. Zhang-Auberson, P. Burtin and Freedoms Study Group. "A Placebo-Controlled Trial of Oral Fingolimod in Relapsing Multiple Sclerosis." *N Engl J Med* 362, no. 5 (2010): 387-401.

Keegan, M., F. Konig, R. McClelland, W. Bruck, Y. Morales, A. Bitsch, H. Panitch, H. Lassmann, B. Weinshenker, M. Rodriguez, J. Parisi and C. F. Lucchinetti. "Relation between Humoral Pathological Changes in Multiple Sclerosis and Response to Therapeutic Plasma Exchange." *Lancet* 366, no. 9485 (2005): 579-82.

Krumbholz, M., T. Derfuss, R. Hohlfeld and E. Meinl. "B Cells and Antibodies in Multiple Sclerosis Pathogenesis and Therapy." *Nat Rev Neurol* 8, no. 11 (2012): 613-23.

- Krumbholz, M., D. Theil, S. Cepok, B. Hemmer, P. Kivisakk, R. M. Ransohoff, M. Hofbauer, C. Farina, T. Derfuss, C. Hartle, J. Newcombe, R. Hohlfeld and E. Meinl. "Chemokines in Multiple Sclerosis: Cxcl12 and Cxcl13 up-Regulation Is Differentially Linked to Cns Immune Cell Recruitment." *Brain* 129, no. Pt 1 (2006): 200-11.
- Kumar, D. R., F. Aslinia, S. H. Yale and J. J. Mazza. "Jean-Martin Charcot: The Father of Neurology." *Clin Med Res* 9, no. 1 (2011): 46-9.
- Kutzelnigg, A., J. C. Faber-Rod, J. Bauer, C. F. Lucchinetti, P. S. Sorensen, H. Laursen, C. Stadelmann, W. Bruck, H. Rauschka, M. Schmidbauer and H. Lassmann. "Widespread Demyelination in the Cerebellar Cortex in Multiple Sclerosis." *Brain Pathol* 17, no. 1 (2007): 38-44.
- Langer-Gould, A., S. M. Brara, B. E. Beaber and J. L. Zhang. "The Incidence of Clinically Isolated Syndrome in a Multi-Ethnic Cohort." *J Neurol* 261, no. 7 (2014): 1349-55.
- Lassmann, H. "Pathogenic Mechanisms Associated with Different Clinical Courses of Multiple Sclerosis." *Front Immunol* 9, (2018): 3116.
- Leatherbarrow, R. J., T. W. Rademacher, R. A. Dwek, J. M. Woof, A. Clark, D. R. Burton, N. Richardson and A. Feinstein. "Effector Functions of a Monoclonal Aglycosylated Mouse Igg2a: Binding and Activation of Complement Component C1 and Interaction with Human Monocyte Fc Receptor." *Mol Immunol* 22, no. 4 (1985): 407-15.
- Lennon, V. A., D. M. Wingerchuk, T. J. Kryzer, S. J. Pittock, C. F. Lucchinetti, K. Fujihara, I. Nakashima and B. G. Weinshenker. "A Serum Autoantibody Marker of Neuromyelitis Optica: Distinction from Multiple Sclerosis." *Lancet* 364, no. 9451 (2004): 2106-12.
- Linington, C., M. Bradl, H. Lassmann, C. Brunner and K. Vass. "Augmentation of Demyelination in Rat Acute Allergic Encephalomyelitis by Circulating Mouse Monoclonal Antibodies Directed against a Myelin/Oligodendrocyte Glycoprotein." *Am J Pathol* 130, no. 3 (1988): 443-54.

- Lisi, S., M. Sisto, D. D. Lofrumento, S. D'Amore and M. D'Amore. "Advances in the Understanding of the Fc Gamma Receptors-Mediated Autoantibodies Uptake." *Clin Exp Med* 11, no. 1 (2011): 1-10.
- Losy, J., P. D. Mehta and H. M. Wisniewski. "Identification of Igg Subclasses' Oligoclonal Bands in Multiple Sclerosis Csf." *Acta Neurol Scand* 82, no. 1 (1990): 4-8.
- Lublin, F. D. "New Multiple Sclerosis Phenotypic Classification." *Eur Neurol* 72 Suppl 1, (2014): 1-5.
- Lublin, F. D., S. C. Reingold, J. A. Cohen, G. R. Cutter, P. S. Sorensen, A. J. Thompson, J. S. Wolinsky, L. J. Balcer, B. Banwell, F. Barkhof, B. Bebo, Jr., P. A. Calabresi, M. Clanet, G. Comi, R. J. Fox, M. S. Freedman, A. D. Goodman, M. Inglese, L. Kappos, B. C. Kieseier, J. A. Lincoln, C. Lubetzki, A. E. Miller, X. Montalban, P. W. O'Connor, J. Petkau, C. Pozzilli, R. A. Rudick, M. P. Sormani, O. Stuve, E. Waubant and C. H. Polman. "Defining the Clinical Course of Multiple Sclerosis: The 2013 Revisions." *Neurology* 83, no. 3 (2014): 278-86.
- Lucchinetti, C., W. Bruck, J. Parisi, B. Scheithauer, M. Rodriguez and H. Lassmann. "Heterogeneity of Multiple Sclerosis Lesions: Implications for the Pathogenesis of Demyelination." *Ann Neurol* 47, no. 6 (2000): 707-17.
- Lucchinetti, C. F., Y. Guo, B. F. Popescu, K. Fujihara, Y. Itoyama and T. Misu. "The Pathology of an Autoimmune Astrocytopathy: Lessons Learned from Neuromyelitis Optica." *Brain Pathol* 24, no. 1 (2014): 83-97.
- Mader, S., V. Gredler, K. Schanda, K. Rostasy, I. Dujmovic, K. Pfaller, A. Lutterotti, S. Jarius, F. Di Pauli, B. Kuenz, R. Ehling, H. Hegen, F. Deisenhammer, F. Aboul-Enein, M. K. Storch, P. Koson, J. Drulovic, W. Kristoferitsch, T. Berger and M. Reindl. "Complement Activating Antibodies to Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein in Neuromyelitis Optica and Related Disorders." *J Neuroinflammation* 8, (2011): 184.
- Mader, S., A. Lutterotti, F. Di Pauli, B. Kuenz, K. Schanda, F. Aboul-Enein, M. Khalil, M. K. Storch, S. Jarius, W. Kristoferitsch, T. Berger and M. Reindl. "Patterns of Antibody

- Binding to Aquaporin-4 Isoforms in Neuromyelitis Optica." *PLoS One* 5, no. 5 (2010): e10455.
- Malik, M. T., B. C. Healy, L. A. Benson, P. Kivisakk, A. Musallam, H. L. Weiner and T. Chitnis. "Factors Associated with Recovery from Acute Optic Neuritis in Patients with Multiple Sclerosis." *Neurology* 82, no. 24 (2014): 2173-9.
- Manso, C., L. Querol, C. Lleixa, M. Poncelet, M. Mekaouche, J. M. Vallat, I. Illa and J. J. Devaux. "Anti-Neurofascin-155 IgG4 Antibodies Prevent Paranodal Complex Formation in Vivo." *J Clin Invest* 130, (2019): 2222-2236.
- Mathey, E. K., T. Derfuss, M. K. Storch, K. R. Williams, K. Hales, D. R. Woolley, A. Al-Hayani, S. N. Davies, M. N. Rasband, T. Olsson, A. Moldenhauer, S. Velhin, R. Hohlfeld, E. Meinl and C. Linington. "Neurofascin as a Novel Target for Autoantibody-Mediated Axonal Injury." *J Exp Med* 204, no. 10 (2007): 2363-72.
- Mayer, M. C., R. Hohlfeld and E. Meinl. "Viability of Autoantibody-Targets: How to Tackle Pathogenetic Heterogeneity as an Obstacle for Treatment of Multiple Sclerosis." *J Neurol Sci* 319, no. 1-2 (2012): 2-7.
- Mayer, M. C. and E. Meinl. "Glycoproteins as Targets of Autoantibodies in Cns Inflammation: Mog and More." *Ther Adv Neurol Disord* 5, no. 3 (2012): 147-59.
- Meinl, E. "Untapped Targets in Multiple Sclerosis." *J Neurol Sci* 311 Suppl 1, (2011): S12-5.
- Meinl, Edgar, Tobias Derfuss and Chris Linington. "Identifying Targets for Autoantibodies in Cns Inflammation: Strategies and Achievements." *Clinical and Experimental Neuroimmunology* 1, no. 2 (2010): 47-60.
- Morrow, M. J. and D. Wingerchuk. "Neuromyelitis Optica." *J Neuroophthalmol* 32, no. 2 (2012): 154-66.

- Nandakumar, K. S., M. Collin, A. Olsen, F. Nimmerjahn, A. M. Blom, J. V. Ravetch and R. Holmdahl. "Endoglycosidase Treatment Abrogates Igg Arthritogenicity: Importance of Igg Glycosylation in Arthritis." *Eur J Immunol* 37, no. 10 (2007): 2973-82.
- Ng, J. K., J. Malotka, N. Kawakami, T. Derfuss, M. Khademi, T. Olsson, C. Linington, M. Odaka, B. Tackenberg, H. Pruss, J. M. Schwab, L. Harms, H. Harms, C. Sommer, M. N. Rasband, Y. Eshed-Eisenbach, E. Peles, R. Hohlfeld, N. Yuki, K. Dornmair and E. Meinl. "Neurofascin as a Target for Autoantibodies in Peripheral Neuropathies." *Neurology* 79, no. 23 (2012): 2241-8.
- Nimmerjahn, F. and J. V. Ravetch. "Anti-Inflammatory Actions of Intravenous Immunoglobulin." *Annu Rev Immunol* 26, (2008): 513-33.
- Nimmerjahn, F. and J. V. Ravetch. "Fcgamma Receptors as Regulators of Immune Responses." *Nat Rev Immunol* 8, no. 1 (2008): 34-47.
- Noseworthy, J. H., C. Lucchinetti, M. Rodriguez and B. G. Weinshenker. "Multiple Sclerosis." *N Engl J Med* 343, no. 13 (2000): 938-52.
- Optic Neuritis Study, Group. "Multiple Sclerosis Risk after Optic Neuritis: Final Optic Neuritis Treatment Trial Follow-Up." *Arch Neurol* 65, no. 6 (2008): 727-32.
- Papadopoulos, M. C., J. L. Bennett and A. S. Verkman. "Treatment of Neuromyelitis Optica: State-of-the-Art and Emerging Therapies." *Nat Rev Neurol* 10, no. 9 (2014): 493-506.
- Pearce, J. M. "Historical Descriptions of Multiple Sclerosis." *Eur Neurol* 54, no. 1 (2005): 49-53.
- Pellkofer, H. L., M. Krumbholz, A. Berthele, B. Hemmer, L. A. Gerdes, J. Havla, R. Bittner, M. Canis, E. Meinl, R. Hohlfeld and T. Kuempfel. "Long-Term Follow-up of Patients with Neuromyelitis Optica after Repeated Therapy with Rituximab." *Neurology* 76, no. 15 (2011): 1310-5.

- Pohl, D., I. Hennemuth, R. von Kries and F. Hanefeld. "Paediatric Multiple Sclerosis and Acute Disseminated Encephalomyelitis in Germany: Results of a Nationwide Survey." *Eur J Pediatr* 166, no. 5 (2007): 405-12.
- Polman, C. H., P. W. O'Connor, E. Havrdova, M. Hutchinson, L. Kappos, D. H. Miller, J. T. Phillips, F. D. Lublin, G. Giovannoni, A. Wajgt, M. Toal, F. Lynn, M. A. Panzara, A. W. Sandrock and Affirm Investigators. "A Randomized, Placebo-Controlled Trial of Natalizumab for Relapsing Multiple Sclerosis." *N Engl J Med* 354, no. 9 (2006): 899-910.
- Polman, C. H., S. C. Reingold, B. Banwell, M. Clanet, J. A. Cohen, M. Filippi, K. Fujihara, E. Havrdova, M. Hutchinson, L. Kappos, F. D. Lublin, X. Montalban, P. O'Connor, M. Sandberg-Wollheim, A. J. Thompson, E. Waubant, B. Weinshenker and J. S. Wolinsky. "Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald Criteria." *Ann Neurol* 69, no. 2 (2011): 292-302.
- Popescu, B. F. and C. F. Lucchinetti. "Pathology of Demyelinating Diseases." *Annu Rev Pathol* 7, (2012): 185-217.
- Popescu, B. F., I. Pirko and C. F. Lucchinetti. "Pathology of Multiple Sclerosis: Where Do We Stand?" *Continuum (Minneapolis)* 19, no. 4 Multiple Sclerosis (2013): 901-21.
- Probstel, A. K., K. Dornmair, R. Bittner, P. Sperl, D. Jenne, S. Magalhaes, A. Villalobos, C. Breithaupt, R. Weissert, U. Jacob, M. Krumbholz, T. Kuempfel, A. Blaschek, W. Stark, J. Gartner, D. Pohl, K. Rostasy, F. Weber, I. Forne, M. Khademi, T. Olsson, F. Brilot, E. Tantsis, R. C. Dale, H. Wekerle, R. Hohlfeld, B. Banwell, A. Bar-Or, E. Meinl and T. Derfuss. "Antibodies to Mog Are Transient in Childhood Acute Disseminated Encephalomyelitis." *Neurology* 77, no. 6 (2011): 580-8.
- Reiber, H. "Cerebrospinal Fluid--Physiology, Analysis and Interpretation of Protein Patterns for Diagnosis of Neurological Diseases." *Mult Scler* 4, no. 3 (1998): 99-107.
- Reiber, H., S. Ungefehr and C. Jacobi. "The Intrathecal, Polyspecific and Oligoclonal Immune Response in Multiple Sclerosis." *Mult Scler* 4, no. 3 (1998): 111-7.

- Reich, D. S., C. F. Lucchinetti and P. A. Calabresi. "Multiple Sclerosis." *N Engl J Med* 378, no. 2 (2018): 169-180.
- Reindl, M. and P. Waters. "Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Antibodies in Neurological Disease." *Nat Rev Neurol* 15, no. 2 (2019): 89-102.
- Ruprecht, K., B. Wildemann and S. Jarius. "Low Intrathecal Antibody Production Despite High Seroprevalence of Epstein-Barr Virus in Multiple Sclerosis: A Review of the Literature." *J Neurol* 265, no. 2 (2018): 239-252.
- Selman, M. H., R. J. Derks, A. Bondt, M. Palmblad, B. Schoenmaker, C. A. Koeleman, F. E. van de Geijn, R. J. Dolhain, A. M. Deelder and M. Wuhrer. "Fc Specific Igg Glycosylation Profiling by Robust Nano-Reverse Phase Hplc-Ms Using a Sheath-Flow Esi Sprayer Interface." *J Proteomics* 75, no. 4 (2012): 1318-29.
- Spadaro, M., S. Winklmeier, E. Beltran, C. Macrini, R. Hoftberger, E. Schuh, F. S. Thaler, L. A. Gerdes, S. Laurent, R. Gerhards, S. Brandle, K. Dornmair, C. Breithaupt, M. Krumbholz, M. Moser, G. Krishnamoorthy, F. Kamp, D. Jenne, R. Hohlfeld, T. Kumpfel, H. Lassmann, N. Kawakami and E. Meinl. "Pathogenicity of Human Antibodies against Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein." *Ann Neurol* 84, no. 2 (2018): 315-328.
- Takahashi, T., K. Fujihara, I. Nakashima, T. Misu, I. Miyazawa, M. Nakamura, S. Watanabe, Y. Shiga, C. Kanaoka, J. Fujimori, S. Sato and Y. Itoyama. "Anti-Aquaporin-4 Antibody Is Involved in the Pathogenesis of Nmo: A Study on Antibody Titre." *Brain* 130, no. Pt 5 (2007): 1235-43.
- Thompson, A. J., B. L. Banwell, F. Barkhof, W. M. Carroll, T. Coetzee, G. Comi, J. Correale, F. Fazekas, M. Filippi, M. S. Freedman, K. Fujihara, S. L. Galetta, H. P. Hartung, L. Kappos, F. D. Lublin, R. A. Marrie, A. E. Miller, D. H. Miller, X. Montalban, E. M. Mowry, P. S. Sorensen, M. Tintore, A. L. Traboulsee, M. Trojano, B. M. J. Uitdehaag, S. Vukusic, E. Waubant, B. G. Weinshenker, S. C. Reingold and J. A. Cohen. "Diagnosis of Multiple Sclerosis: 2017 Revisions of the Mcdonald Criteria." *Lancet Neurol* 17, no. 2 (2018): 162-173.

- Tzartos, J. S., G. Khan, A. Vossenkamper, M. Cruz-Sadaba, S. Lonardi, E. Sefia, A. Meager, A. Elia, J. M. Middeldorp, M. Clemens, P. J. Farrell, G. Giovannoni and U. C. Meier. "Association of Innate Immune Activation with Latent Epstein-Barr Virus in Active Ms Lesions." *Neurology* 78, no. 1 (2012): 15-23.
- Vural, A., K. Doppler and E. Meinl. "Autoantibodies against the Node of Ranvier in Seropositive Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy: Diagnostic, Pathogenic, and Therapeutic Relevance." *Front Immunol* 9, (2018): 1029.
- Waldman, Amy, Angelo Ghezzi, Amit Bar-Or, Yann Mikaeloff, Marc Tardieu and Brenda Banwell. "Multiple Sclerosis in Children: An Update on Clinical Diagnosis, Therapeutic Strategies, and Research." *The Lancet Neurology* 13, no. 9 (2014): 936-948.
- Wekerle, H. "Lessons from Multiple Sclerosis: Models, Concepts, Observations." *Ann Rheum Dis* 67 Suppl 3, (2008): iii56-60.
- Wingerchuk, D. M. "Neuromyelitis Optica: Potential Roles for Intravenous Immunoglobulin." *J Clin Immunol* 33 Suppl 1, (2013): S33-7.
- Wingerchuk, D. M., B. Banwell, J. L. Bennett, P. Cabre, W. Carroll, T. Chitnis, J. de Seze, K. Fujihara, B. Greenberg, A. Jacob, S. Jarius, M. Lana-Peixoto, M. Levy, J. H. Simon, S. Tenenbaum, A. L. Traboulsee, P. Waters, K. E. Wellik, B. G. Weinshenker and N. M. O. Diagnosis International Panel for. "International Consensus Diagnostic Criteria for Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders." *Neurology* 85, no. 2 (2015): 177-89.
- Wingerchuk, D. M., V. A. Lennon, S. J. Pittock, C. F. Lucchinetti and B. G. Weinshenker. "Revised Diagnostic Criteria for Neuromyelitis Optica." *Neurology* 66, no. 10 (2006): 1485-9.
- Wingerchuk, Dean M., Vanda A. Lennon, Claudia F. Lucchinetti, Sean J. Pittock and Brian G. Weinshenker. "The Spectrum of Neuromyelitis Optica." *The Lancet Neurology* 6, no. 9 (2007): 805-815.

Wuhrer, M., J. C. Stam, F. E. van de Geijn, C. A. Koeleman, C. T. Verrips, R. J. Dolhain, C. H. Hokke and A. M. Deelder. "Glycosylation Profiling of Immunoglobulin G (Igg) Subclasses from Human Serum." *Proteomics* 7, no. 22 (2007): 4070-81.

Young, N. P., B. G. Weinshenker, J. E. Parisi, B. Scheithauer, C. Giannini, S. F. Roemer, K. M. Thomsen, J. N. Mandrekar, B. J. Erickson and C. F. Lucchinetti. "Perivenous Demyelination: Association with Clinically Defined Acute Disseminated Encephalomyelitis and Comparison with Pathologically Confirmed Multiple Sclerosis." *Brain* 133, no. Pt 2 (2010): 333-48.

Bücher

Multiple Sklerose

Rudolf M. Schmidt und Frank A. Hoffmann

Elsevier, Urban & Fischer

5. Auflage 2012

Kurzlehrbuch Neurologie

Andreas Bender, Jan Rémi, Berend Feddersen, Gunther Fesl

Elsevier, Urban & Fischer

2. Auflage 2015

Janeway Immunologie

Kenneth M. Murphy, Paul Travers, Mark Walport

Springer Spektrum

7. Auflage 2009

Lehrbuch Neurologie

Matthias Sitzer, Fuat Aksu

Elsevier, Urban & Fischer

1. Auflage 2011

Websites

www.dmsg.de

www.gbe-bund.de

Leitlinien

AWMF-Leitlinie Optikusneuritis, 2018

AWMF-Leitlinie Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose, 2014

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1.1: Diagnosekriterien der Multiplen Sklerose	3
Abbildung 1.2: Regionenbezogene MS-Häufigkeit	5
Abbildung 1.3: Pathophysiologie der MS.....	7
Abbildung 1.4: Histologisches Schnittpräparat von MS-Läsionen	8
Abbildung 1.5: Antigene der Oligodentrozyten	10
Abbildung 1.6: Aufbau Aquaporin-4	11
Abbildung 1.7: Reiber-Diagramm.....	12
Abbildung 1.8: Aufbau von IgG mit Glykosylierung.....	13
Abbildung 1.9: Schematische Darstellung der humanen und Maus Fcy-Rezeptoren	16
Abbildung 1.10: Glykosylierung des Fc-Teils von IgG mit Spaltungsstellen der verwendeten Enzyme	17
Abbildung 3.1: SDS-PAGE Anti-Neurofascin mAb A12/18.1	34
Abbildung 3.2: Lektin-Blot Anti-Neurofascin mAb A12/18.1.....	35
Abbildung 3.3: Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie zur Analyse der Antigenbindung des Anti-Neurofascin mAk A12/18.1 nach Deglykosylierung.....	37
Abbildung 3.4: Stimulationsversuch der THP1-Zellen	38

Abbildung 3.5: ELISA zum Ausschluss einer IL8 Produktion von TE-Zellen	39
Abbildung 3.6: Antigen-spezifische und dosisabhängige Induktion von IL8	40
Abbildung 3.7: IL8-ELISA nach Stimulationsversuch	41
Abbildung 3.8: Exemplarische Darstellung (0,03 µg/ml, normalisierte Werte) der statistischen Auswertung.....	46
Abbildung 3.9: Gesamtauswertung aller Stimulationsversuche im Verhältnis zum Kontroll-AK	48
Abbildung 3.10: C1q-ELISA.....	49
Abbildung 3.11: SDS-PAGE aufgereinigter deglykosylierter Plasmapheresen (u.a. Anti-Aquaporin-4 Antikörper)	51
Abbildung 3.12: Lektin-Blot aufgereinigter deglykosylierter Plasmapheresen (u.a. Anti-Aquaporin-4 Antikörper)	52
Abbildung 3.13: Vektor pcDNA™ 6.2C-EmGFP-GW/TOPO® (Invitrogen)	53
Abbildung 3.14: FACS-Analyse transfizierter HEK 293-Zellen.....	54
Abbildung 3.15: FACS-Analyse zum Nachweis der Antigenerkennung der HEK 293 AQP4-Zellen.....	55
Abbildung 3.16: FACS-Analyse zur Antigenbindung der Plasmapheresen.....	56

Tabelle 1.1: Übersicht der Fcγ-Rezeptoren bei Mensch und Maus.....	15
Tabelle 2.1: Verwendete Geräte	19
Tabelle 2.2: Verbrauchsmaterial	22
Tabelle 3.1: Umrechnungstabelle der IL8-Produktion.....	42
Tabelle 3.2: a) IL8 Produktion bei 0,01 µg/ml mAk A12/18.1	43
b) IL8 Produktion bei 0,03 µg/ml mAk A12/18.1	43
c) IL8 Produktion bei 0,1 µg/ml mAk A12/18.1.....	44
d) IL8 Produktion bei 0,3 µg/ml mAk A12/18.1	44
e) IL8 Produktion bei 1 µg/ml mAk A12/18.1.....	45

8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADEM	acute disseminated encephalomyelitis
AK/Ak	Antikörper
Ag	Antigen
AQP4	Aquaporin-4
BSA	bovine serum albumin
CIDP	Chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie
CIS	clinically isolated syndrom
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAE	experimental autoimmune encephalomyelitis
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintertraacetat
FACS	fluorescence activated cell sorter
FCS	Fetal Calf Serum
FPLC	fast protein liquid chromatography

Abkürzungsverzeichnis

FSC	Forwardscatter
h	human
HEK(293)	Human Embryonic Kidney - Zellen
HLA	Human-Leucocyte-Antigen
HRP	Horseradishperoxidase
Ig	Immunglobulin
mAb	monoclonal Antibody (monoklonaler Antikörper)
MBP	Myelinprotein
M/Met (1/23)	Methionin
MOG	Oligodendrozyten-Glykoprotein
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
N	Nemenyi
NF	Neurofascin
NMO	Neuromyelitis optica
OD	Optische Dichte
OKB	Oligoklonale Banden

Abkürzungsverzeichnis

PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
Q	Quade
R	Rezeptor
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
RT	Raumtemperatur
SDS	<u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate
SSC	Sidescatter
Tab.	Tabelle
TE(671)	humane Rhabdomyosarkomzellen
THP1	humane monozytäre akute Leukämiezellen
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

9 Kongressbeiträge

Abstract:

Different effects of long-term treatment with rituximab on autoantibodies to aquaporin-4 in neuromyelitis optica

E. Kachaturian¹, I. Baumann¹, H. Pellkofer¹, E. Schuh¹, T. Kümpfel¹, M. Reindl², R. Hohlfeld¹, E. Meinl^{1}, M. Krumbholz^{1*}*

¹ Institute of Clinical Neuroimmunology, Ludwig Maximilian University Munich; ² Clinical Department of Neurology, Innsbruck Medical University; * Equal contribution

11th B Cell Forum der Deutschen Gesellschaft für Immunologie

(25. – 27. Februar 2013, Schluchsee)

Abstract:

Inter-individual heterogeneity of effects of long-term treatment with rituximab on autoantibodies to aquaporin-4 in neuromyelitis optica

E. Kachaturian^{1}, H. Pellkofer^{1,2*}, I. Baumann^{1,3}, M. Reindl⁴, R. Hohlfeld¹, E. Meinl¹, T. Kümpfel^{1*}, M. Krumbholz^{1*}*

¹ Institut für klinische Neuroimmunologie, LMU, München; ² Klinik für Neurologie, Universitätsmedizin Göttingen; ³ Dr. von Haunersches Kinderspital, LMU, München; ⁴ Universitätsklinik für Neurologie, Innsbruck
* Contributed equally

87. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie

(15. – 19. September 2014, München)

Eidesstattliche Versicherung

Gemäß der Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der LMU München

Baumann Ilona

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Glykosylierungen von Autoantikörpern bei entzündlichen Erkrankungen des Nervensystems

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle der einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegt Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 25.02.2020

Ilona Baumann