

Aus dem Physiologischen Institut der Universität München,
Lehrstuhl: Physiologische Genomik

Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Magdalena Götz

Neue Autoantigene bei AChR- und MuSK-seronegativer Myasthenia gravis

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

vorgelegt von

Vivien Maria Westermayer

aus

Lüneburg

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Stephan Kröger

Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Müller-Felber

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

Tag der mündlichen Prüfung: 26.11.2020

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Vivien Maria Westermayer, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Neue Autoantigene bei AChR- und MuSK-seronegativer Myasthenia gravis“ 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 einzeln nachgewiesen habe. Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, am 27.11.2020

Vivien Maria Westermayer

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG.....	6
2	ZIELE DIESER ARBEIT	8
3	EINLEITUNG	9
3.1	MYASTHENIA GRAVIS	9
3.1.1	KLASSIFIKATION	9
3.1.2	KLINIK.....	10
3.1.3	DIAGNOSTIK.....	11
3.1.4	THERAPIE	11
3.1.5	PATHOGENESE.....	12
3.2	LRP4	13
3.2.1	DIE ROLLE VON LRP4 WÄHREND DER BILDUNG DER NEUROMUSKULÄREN ENDPLATTE.....	13
3.2.2	INTERAKTION MIT AGRIN.....	15
4	MATERIAL UND METHODEN.....	16
4.1	MATERIAL.....	16
4.2	METHODEN.....	19
4.2.1	ZELLKULTUR.....	19
4.2.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	19
4.2.3	HISTOLOGISCHE METHODEN	20
4.2.4	STABIL TRANSFIZIERTE ZELLINIE.....	21
4.2.5	BIOCHEMISCHE METHODEN	22
4.2.6	ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY	24
5	ERGEBNISSE	27
5.1	HU₁LRP4 IN pCDNA3.....	27
5.2	STABILE ZELLINIE	29
5.3	ELISA	31
6	DISKUSSION.....	33
6.1	NACHWEIS VON ANTIKÖRPERN GEGEN LRP4 IN PATIENTEN MIT MG.....	33
6.2	ELISA ALS DIAGNOSTISCHE METHODE.....	35
6.3	DIE ROLLE VON LRP4 IN ANDEREN ORGANEN.....	37
6.4	AUSBlick.....	38
7	LITERATUR.....	39
8	DANKSAGUNG.....	42
9	APPENDIX.....	43

1 Zusammenfassung

Myasthenia gravis (MG) ist eine Erkrankung der neuromuskulären Endplatte. Die Übertragung vom Nerven auf den Muskel wird durch Autoantikörper vermindert. Bei 80% der Patienten lassen sich Antikörper gegen den Azetylcholinrezeptor (AChR) und in 10% Antikörper gegen die muskelspezifische Kinase (MuSK) finden. Patienten, die keine Antikörper gegen AChR oder MuSK aufweisen, werden als doppelt-seronegative Patienten bezeichnet. Das „low-density lipoproteinrezeptor-like protein 4“ (LRP4) ist ein Transmembranprotein, welches an der neuromuskulären Endplatte konzentriert ist und zusammen mit Agrin, einem anderen Protein, MuSK aktiviert. Diese Aktivierung ist essentiell für die Entwicklung und Aufrechterhaltung aller postsynaptischen Spezialisierungen an der neuromuskulären Endplatte, inklusive der AChR Aggregate. Damit ist LRP4 ein potentielles Zielprotein für Autoantikörper bei doppel-seronegativen MG-Patienten. Antikörper gegen LRP4 konnten in doppel-seronegativen MG Patienten gefunden werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Seren von doppel-seronegativen Patienten auf das Vorhandensein von LRP4 Autoantikörpern untersucht. Das Ziel bestand darin ein Verfahren zu etablieren, das einen schnellen und sicheren Nachweis dieser Antikörper gegen LRP4 erlaubt. Da der bisherige Nachweis auf sehr komplexen Mikroskopie-basierten Assays in Kombination mit konfokaler Mikroskopie beruhte, die eine Analyse von Seren in größerem Umfang nicht erlaubte, erschien für die routinemäßige Testung vieler Seren die Entwicklung eines anderen Nachweissystems sinnvoll. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, einen Zell-basierten ELISA zu etablieren. Die cDNA von LRP4 wurde in einen Vektor eingefügt, dann erfolgte eine Transfektion von HeLa Zellen mit diesem. Eine stabile Zelllinie, welche LRP4 exprimiert, konnte etabliert werden. Diese bildete die Grundlage für einen ELISA Test, mithilfe dessen die Patientenseren untersucht werden konnten. Bei der Auswertung konnte kein Serum positiv auf das Vorliegen von LRP4 Antikörpern getestet werden. Ein Grund dafür könnte die sehr geringe Konzentration der Antikörper in den Seren sein, die nur 1/10 dessen betragen, was von AChR-seropositiver MG bekannt ist.

In anderen publizierten Arbeiten zu dieser Fragestellung hingegen zeigte sich, dass LRP4-Antikörper mit einer Varianz von 2-50% der doppelt-seronegativen Patienten auftreten.[1-3] In Kap. 5 wird außerdem auf die Rolle von LRP4 in der Knochen- und Nierenentwicklung eingegangen und die Bedeutung von weiterer Forschung zur

Vertiefung des klinischen Verständnisses sowie der Optimierung der Patientenbehandlung aufgezeigt.

2 Ziele dieser Arbeit

Die Ziele der vorliegenden Arbeit waren die cDNA von humanem LRP4 zu isolieren und diese in einen Expressionsvektor zu integrieren. HeLa Zellen sollten dann mit dem Vektor stabil transfiziert werden, um LRP4 auf ihrer Oberfläche zu exprimieren. Dies sollte die Grundlage für einen Immunassay schaffen, mit dem Serumproben von Patienten und Kontrollpersonen auf das Vorliegen von Antikörpern gegen LRP4 getestet werden können.

3 Einleitung

3.1 Myasthenia gravis

Myasthenia gravis (MG) ist eine Autoimmunerkrankung, bei der Antikörper gegen Proteine der neuromuskulären Endplatte die Signalübertragung von Nerv auf Muskel abschwächen. Charakteristischerweise treten eine belastungsabhängige Muskelschwäche und starke Müdigkeit bei den betroffenen Patienten auf. Die Inzidenz der Erkrankung beträgt nach aktuellem Stand zwischen 1,7-21 pro Millionen Einwohner, die Prävalenz wird mit bis zu 179 pro Millionen Einwohner angegeben.[4] [5]

3.1.1 Klassifikation

Die Erkrankung lässt sich nach Zielprotein der Antikörper, nach klinischem Erscheinungsbild sowie Erkrankungsalter einteilen. Es treten Antikörper gegen den AChR, gegen die MuSK sowie gegen LRP4 und Agrin auf. [6] Klinisch kann zwischen einer okulären und einer generalisierten Form unterschieden werden. Letztere kann wiederum in eine Early-onset MG (EOMG), Late-onset MG (LOMG) bzw. Very late-onset MG eingeteilt werden. Bei der okulären Form herrschen Symptome wie Kau- und Schluckbeschwerden vor, während bei den generalisierten Formen primär Muskelschwächen der proximalen Extremitäten auftreten. Bei der Maximalvariante, der so genannten myasthenen Krise, kann es zu Lähmungen der Atemmuskulatur mit unter Umständen letalem Ausgang kommen. Das Erkrankungsalter der EOMG liegt meist vor dem 50. Lebensjahr; hier findet sich eine Dominanz des weiblichen Geschlechts. Das Erkrankungsalter der LOMG liegt über dem 50. Lebensjahr und der Beginn der Very late-onset MG liegt über dem 60. Lebensjahr, wobei hier eine leichte Dominanz des männlichen Geschlechts festgestellt werden konnte.[5] Insgesamt wird im klinischen Alltag zur Beurteilung des Schweregrades der MG die Klassifikation der Myasthenia Gravis Foundation of America verwendet.[7] Sie stellt eine Modifikation einer Einteilung nach klinischem Schweregrad von K.E. Ossermann aus dem Jahr 1958 dar.[8]

Tabelle 1 Klinische Klassifikation der Myasthenia gravis (modifizierte MGFA Klassifikation 2000)

Klasse	Charakteristika
I	rein okuläre Myasthenie, beschränkt auf äußere Augenmuskel und Lidschluss
II	leicht--bis mäßiggradige generalisierte Myasthenie mit Einbeziehung anderer Muskelgruppen, oft einschließlich der Augenmuskeln
III	mäßiggradige generalisierte Myasthenie, oft einschließlich der Augenmuskeln
IV	schwere generalisierte Myasthenie
V	Intubationsbedürftigkeit mit und ohne Beatmung*
Die Klassen II-IV lassen sich in zwei Subgruppen unterteilen	
A	Betonung der Extremitäten und/oder Gliedergürtel, geringe Beteiligung oropharyngealer Muskelgruppen
B	besondere Beteiligung oropharyngealer und/oder der Atemmuskulatur, geringere oder gleich starke Beteiligung der Extremitäten oder rumpfnahen Muskelgruppen

*Notwendigkeit einer Nasensonde ohne Intubationsbedürftigkeit: Klasse IVb

3.1.2 Klinik

Früh im Krankheitsverlauf treten Doppelbilder sowie eine ein- bzw. beidseitige Ptosis auf. Eine isolierte Symptomatik der Augenmuskeln findet man bei bereits oben genannter okulärer Myasthenie. Im Verlauf kann eine bulbäre Symptomatik mit Sprech-, Kau- und Schluckstörung hinzutreten. Hier zeigt sich durch die gestörte Mimik die so genannte Facies myopathica. Von einer generalisierten Form spricht man bei zusätzlicher Muskelschwäche der proximalen Extremitäten-, der Atem- sowie der Rumpfmuskulatur. Typischerweise zeigt sich eine Zunahme der Symptome nach Anstrengung bzw. im natürlichen Tagesverlauf.[9]

3.1.3 Diagnostik

Wie oben beschrieben lässt sich in der klinischen Untersuchung eine schnelle Ermüdung der betroffenen Muskulatur beobachten. Zur Evaluation der Ptosis eignet sich der Simpson Test. Nach anhaltendem Aufwärtsblick zeigt sich eine Zunahme der Ptosis. Medikamentös ist es möglich mit Hilfe des Tensilon- oder Prostigmin-Tests die Menge an Azetylcholin im synaptischen Spalt kurzfristig zu erhöhen und so eine Symptombesserung zu erzielen. Beide Medikamente hemmen die Azetylcholinesterase, welche den Neurotransmitter Azetylcholin abbaut. So wird die Azetylcholin-Konzentration im synaptischen Spalt erhöht und die Koppelung zwischen präsynaptischem Aktionspotential und Muskelfaserzuckung an der neuromuskulären Endplatte erleichtert. Elektrophysiologisch lässt sich mithilfe eines Elektromyogramms eine Amplitudenabnahme der Aktionspotentiale am Erfolgsmuskel zeigen. Nach Injektion eines Azetylcholinesterasehemmers und damit erreichten Erhöhung der Acetylcholin-Konzentration im synaptischen Spalt zeigt sich eine Normalisierung der Amplitude.

Diagnostisch von großer Bedeutung, vor allem in Bezug auf diese Arbeit, ist der Nachweis der Autoantikörper im Serum der Patienten. Bisher lassen sich im Klinikalltag routinemäßig häufig nur Antikörper gegen den Azetylcholinrezeptor und die MuSK bestimmen.[9]

Anti-AChR Antikörper werden standardmäßig über Radioimmunpräzipitation nachgewiesen. Zell-basierte Assays zeigen hier eine hohe Sensitivität. Assays, welche auf die Verwendung von radioaktiven Substanzen verzichten haben eine geringere Sensitivität gezeigt.[10, 11] In der Diagnostik der anti-MuSK Antikörper haben sich sowohl Radioimmunpräzipitation als auch die Verwendung von einem ELISA etabliert. Auch hier zeigen zellbasierte Assays eine höhere Sensitivität.[12]

3.1.4 Therapie

Es gibt verschiedene Ansätze in der Therapie der MG. Zum einen existiert eine symptomatische Therapie mit Cholinesterasehemmer wie z. B. Pyridostigmin. Hier wird durch eine Hemmung des Abbaus von Azetylcholin deren Konzentration im synaptischen Spalt erhöht und somit die Signalübertragung erhöht. Einen weiteren Therapieansatz bieten Immunsuppressiva. Hierzu zählen sowohl Glukokortikoide wie Methylprednisolon, als auch das Azathioprin, ein Purinanalogon. Die Kombination aus Kortison und Azathioprin wird bei mittelschwerer bis schwerer MG verwendet. Bei

geringer Wirksamkeit oder Unverträglichkeit kann die Therapie um weitere Immunsuppressiva wie Ciclosporin, Methothrexat, Rituximab, Cyclophosphamid oder auch eine Plasmapherese erweitert werden.

Bei Patienten mit AChR-positiver MG kann eine Thymektomie als operativer Therapieansatz erwogen werden.[13] Bisher fehlten allerdings randomisierte kontrollierten Studien zur Effektivität der Thymektomie[14]. Weiterhin sollten Medikamente vermieden werden, welche zu einer Verschlechterung der myasthenen Symptomatik führen. Hierzu zählen z.B. Antibiotika, Muskelrelaxantien, Benzodiazepine, Beta-Blocker oder Neuroleptika. [15-17]

Es zeigt sich zudem ein unterschiedliches Ansprechen der AChR-positiven MG und der MuSK-positiven MG auf einzelne Therapieoptionen. Patienten mit MuSK-seropositiver MG sprechen generell gut auf eine Hochdosis Prednisolon-Therapie oder auf Plasmapherese an. Bei therapierefraktären Verläufen sollte eine immunsuppressive Therapie mit Rituximab erwogen werden. Generell zeigen Azetylcholinesteraseinhibitoren keine zufriedenstellende Wirkung auf die MuSK-positive MG und sollten vermieden werden. Da sich außerdem normalerweise keine Pathologien des Thymus bei MuSK-positiven Patienten zeigen, scheint eine Thymektomie bei diesen Patienten nicht sinnvoll.[18]

3.1.5 Pathogenese

3.1.5.1 Autoantikörper

Bei etwa 80-85% der MG-Patienten lassen sich Autoantikörper gegen den AChR nachweisen.[19, 20] Die Autoantikörper gegen den AChR sind hauptsächlich der Gruppe IgG1 und IgG3 zuzuordnen.[21] Der adulte AChR ist ein ionotroper Neurotransmitterrezeptor und besteht aus fünf Untereinheiten (2α , β , δ , ϵ) mit jeweils vier Transmembrandomänen (M1– M4). Alle fünf M2 Domänen bilden den Ionenkanal. Binden die zwei Azetylcholinmoleküle an die α -Untereinheiten, so führt dies zu einem überschwelligem Rezeptorpotential (Endplattenpotential), welches ein Aktionspotential in der Skelettmuskelfaser auslöst. Die Öffnung von Dihydropyridinrezeptor und nachfolgend Ryanodinrezeptor sorgen für einen Kalziumeinstrom aus dem sarkoplasmatischen Retikulum, welches zur Kontraktion der Sarkomere führt. [4] Anti-AChR-Antikörper blockieren die Bindung des ACh an den Rezeptor[22] und fördern

wahrscheinlich die Internalisierung und Degradation der AChR.[23] Weiterhin aktivieren AChR-Antikörper die Komplement Kaskade und die Formation des Membranangriffskomplexes (MAC) am neuromuskulären Übergang. Eine Verbesserung von myasthenen Symptomen durch Inhibierung des Komplement-Systems konnte im experimentellen autoimmunen Myasthenia gravis-Modell (EAMG) gezeigt werden. [24] Der Verlust von AChR lässt sich durch eine Amplitudenabnahme im neurophysiologisch messbaren Endplattenpotential des betroffenen Muskels darstellen.[25]

Bei ungefähr 20% der Patienten mit MG lassen sich keine Autoantikörper gegen den AChR nachweisen. In diesen sogenannten seronegativen MG-Fällen finden sich bei 70% der Patienten jedoch Antikörper gegen MuSK. MuSK ist eine Tyrosinkinase, die an der neuromuskulären Endplatte konzentriert ist. Ihre Funktion ist die Aggregation des AChR im Bereich des Nerv-Muskel-Kontaktes. Diese Aggregation ist notwendig für die synaptische Transmission an der Neuromuskulären Endplatte.[26]

Bei den restlichen 30% der seronegativen Patienten lassen sich weder Antikörper gegen den AChR noch gegen die MuSK nachweisen. Diese Gruppe von Patienten wurde im Rahmen dieser Arbeit auf das Vorliegen von Antikörpern gegen LRP4 untersucht.

3.2 LRP4

LRP4 gehört zur Familie der Low-density Lipoprotein Rezeptoren (LDLR), einer Gruppe von Zelloberflächenrezeptoren. LRP4 ist auch bekannt als MEGF7 (multiple epidermal growth factor-like domains 7). Dieser Rezeptor besteht aus einer großen extrazellulären N-terminalen Region, einer einzelnen transmembranen Domäne und einer kurzen intrazellulären C-terminalen Region.[27] Er setzt sich aus 1906 Aminosäuren zusammen. 90% des Proteins sind extrazellulär, nur etwa 8% befinden sich intrazellulär. Neben der für diese Arbeit entscheidenden Rolle von LRP4 während der Entwicklung und Erhaltung der neuromuskulären Endplatte hat LRP4 auch wichtige Funktionen während der Entwicklung und Funktionalität vom ZNS, von Knochen, Lunge, Niere und ektodermalen Organen wie z.B. Bart- und Nasenhaare, Zähne oder der Areola.[28]

3.2.1 Die Rolle von LRP4 während der Bildung der neuromuskulären Endplatte

Eine Voraussetzung für die Bildung einer funktionierenden neuromuskulären Endplatte in einem sich entwickelnden Organismus ist die Bildung von postsynaptischen

Spezialisierungen. Dazu gehören die Aggregation von Azetylcholinrezeptoren und circa 30 anderer Proteine an der postsynaptischen Membran. MuSK sowie das Proteoglykan Agrin und LRP4 sind die entscheidenden Regulatoren dieser Akkumulation, Stabilisation und Differenzierung der postsynaptischen Spezialisierungen.[29] Das Signal zur Aggregation der AChR und anderer Moleküle in der postsynaptischen Membran ist die Bindung von Agrin an seinen Rezeptor bestehend aus MuSK und LRP4. Agrin wird vom Motoneuron synthetisiert und nach seiner biologischen Aktivität benannt (Agrin von griechisch „agreirein“ zusammenbringen).[30] Motoneurone sezernieren das lösliche Proteoglykan Agrin und deponieren es in der Basallamina, die den synaptischen Spalt ausfüllt. Die Interaktion von basalmembran-gebundenem Agrin mit seinem Rezeptor LRP4 aktiviert MuSK, die eine intrazelluläre Signalkaskade auslöst, welche zur Bildung aller postsynaptischen Spezialisierungen, inklusive der Bildung der AChR Aggregate, führt.[31, 32] Passiert diese Aggregation des AChR durch MuSK und LRP4 nicht, wie zum Beispiel im Fall von LRP4 bzw. MuSK-defizienten Mäusen, so breiten sich die Axone der Motorneurone übermäßig entlang des gesamten Muskels aus und es bilden sich keine funktionierenden Synapsen, was zum Tod der LRP4- und MuSK-defizienten Mäuse führt.[29, 33] Darüber hinaus konnte eine bisher nicht bekannte Mutation im LRP4-Gen nachgewiesen werden. Diese Mutation im LRP4 Gen konnte bei kongenitalem myasthenem Syndrom, einer genetischen Erkrankung mit Beginn meist im frühen Kindesalter, nachgewiesen werden.[34] Bei Analyse der interkostalen Muskulatur der betroffenen Patientin zeigten sich vor allem eine abnormal kleine muskuläre Endplatte mit verminderter Reaktivität auf ACh, einer Verminderung der Einfaltungen der postsynaptischen Membran mit auffallend wenigen Nervenendungen. Funktionell zeigte sich pathologisches Muskelpotential mit verminderter Amplitude und einem Dekrement. Diese Ergebnisse unterstützen die bedeutende Rolle von LRP4 während der Bildung und Aufrechterhaltung der neuromuskulären Endplatte.[34]

LRP4 spielt darüber hinaus eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der neuromuskulären Endplatte auch nach deren Bildung. *Barik et al* zeigte in adulten LRP4 Knock-out Mausmodellen, dass der Verlust von LRP4 zu myasthenen Symptomen führt.[35] Die neuromuskuläre Endplatte verlor ihre charakteristische Struktur, die Dichte an AChR war signifikant gemindert und die innervierenden Axone zeigten weniger Vesikel und aktive Zonen zur Signalübertragung. Weiterhin zeigte sich ein Verlust von neuronalem Agrin, was suggeriert, dass LRP4 das Vorhandensein von Agrin an der neuromuskulären Endplatte reguliert.[35] Eine aktive Immunisierung von Mäusen mit

LRP4 erzeugte die Entwicklung einer MG mit ähnlichen klinischen Merkmalen wie bei einer MuSK-positiven MG.[36] Weiterhin zeigte sich in mit rekombinantem LRP4 immunisierten Mäusen in *Ulusoy et al* zusätzlichen zu der Bildung von LRP4-Antikörpern auch Ablagerungen vom Komplementfaktor C3 und damit eine mutmaßliche Aktivierung des Komplement-Systems durch LRP4-Antikörper.[37]

3.2.2 Interaktion mit Agrin

Bevor LRP4 identifiziert und charakterisiert wurde, war bereits bekannt, dass sowohl Agrin als auch MuSK für die Bildung der Neuromuskulären Endplatte essentiell sind. In mutanten Mäusen, welche Agrin oder MuSK nicht exprimieren, konnte keine Bildung einer neuromuskulären Endplatte beobachtet werden.[38, 39] Die Tiere sind immobil, besitzen keine Nerv-assoziierten AChR Aggregate und sterben während der Geburt an respiratorischer Insuffizienz. In LRP4-mutanten Mäusen zeigte sich ähnlich wie in MuSK- und Agrin-mutanten Mäusen eine defizitäre Ausbildung der neuromuskulären Endplatte.[40, 41] Jeweils zwei Proteine LRP4 und MuSK bilden einen tetrameren Rezeptorkomplex. Ohne Agrin bleibt ein heterodimärer Komplex von LRP4 und MuSK in der Muskelfasermembran, welcher die basale Aktivität der MuSK aufrechterhält.[40-42]

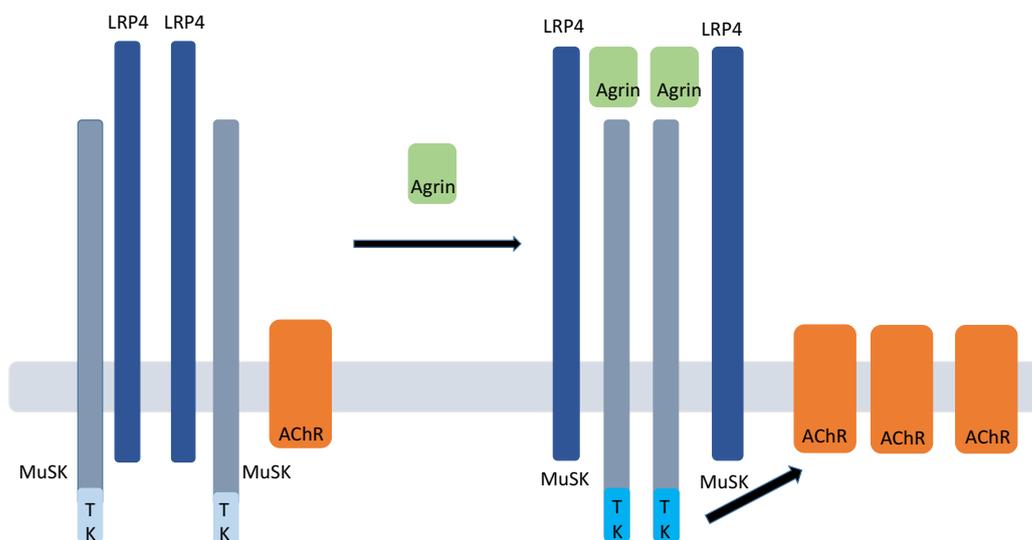


Abbildung 1: Agrin-LRP4-MuSK Komplex

LRP4 interagiert mit Agrin. Dies führt zur Aktivierung der Tyrosinkinase MuSK. Hierdurch kommt es zur u.a. zur Bildung von AChR Aggregaten. [43]

4 Material und Methoden

4.1 Material

Tabelle 2: Material

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Deckgläser	Carl Roth GmbH + Co
Handschuhe GentleSkin ®	Meditrade
Objektträger	Carl Roth GmbH + Co
Parafilm „M“	Bemis
Pipetten „pipet lite“	Rainin
Protino® Ni-TED 1000	Macherey-Nagel
Cellstar® Pipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Greiner bio-one
Pipettenspitzen	Sarstedt
Pipettenspitzen mit Filter	Starlab
Immun-Blot® PVDF Membran	BioRad
Roti® Liquid barrier marker	Carl Roth GmbH +Co
Röhrchen (15ml, 50ml)	Greiner bio-one
Zellkultur FLaschen	Greiner bio-one
Zellkultur Multiwell Platten	Greiner bio-one
Petrischalen	Greiner bio-one
Zippy® Plasmid Miniprep Kit	Zymo Research
NucleoBond Xtra Maxi EF	Machery-Nagel GmbH
Amersham TM ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare
Restriktionsenzyme (ApaLI, EcoRI HF, NEB4)	New England Biolabs
Gel Loading Dye Blue	BioLabs
NEBuffer 4	BioLabs
Safeseale Reagiergefäße (0,5ml, 1,5ml, 2ml)	Sarstedt
ELISA Platten	Greiner Bio-one
1kb DNA Ladder	New England BioLabs
Rotilabo® Blottingpapier	Carl Roth GmbH + Co. KG

Amersham Hyperfilm™ ECL high performance chemiluminescence film	GE Healthcare
Rapid Fixer Fixierlösung Western Blot	Ilford
Multigrade Entwicklungslösung Western Blot	Ilford
Rage Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas

Chemikalien	Hersteller
Agarose	Bio-Rad
Bacto Trypton	Carl Roth GmbH + Co. KG
BSA	Carl Roth GmbH + Co. KG
DAPI	Sigma-Aldrich
DMEM	PAA
EDTA	Carl Roth GmbH + Co. KG
Protease Inhibitor Tabletten (EDTA-frei)	Roche
Ethanol	Merck
FKS (Fetales Kälberserum)	Biochrom
Gel Loading Dye Blue 6x	New England Biolabs
Methanol	AppliChem
Mowiol	Carl Roth GmbH + Co. KG
Salzsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG
SDS	Carl Roth GmbH + Co. KG
Streptomycin	PAA
TEMED	Carl Roth GmbH + Co. KG
Tris HCL	Carl Roth GmbH + Co. KG
TRIS	Carl Roth GmbH + Co. KG
Trypton X-100	Sigma-Aldrich
Trypsin	Gibco

Vektor	Hersteller
pcDNA3	Invitrogen

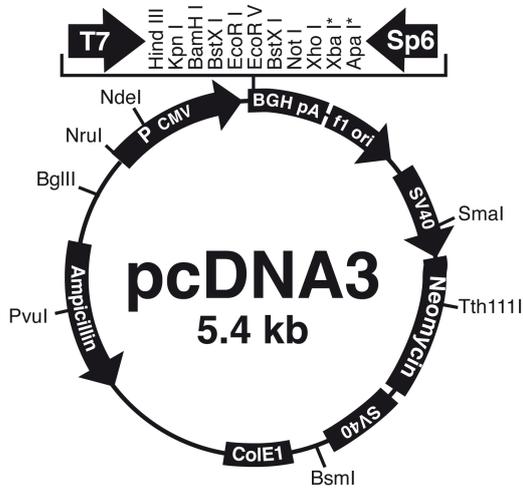


Abbildung 2: pcDNA 3

Antikörper	Hersteller
Anti-human LRP4, Spezies: Kaninchen, Konzentration: 0,15 mg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Anti-Kaninchen IgG H+L Alexa 594, Spezies: Ziege	Invitrogen
Anti-Kaninchen IgG HRP, Spezies: Ziege	Invitrogen

Geräte	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese-Kammer	Invitrogen
Bakterienkultur-Brutschrank	Memmert
Fluoreszenzmikroskop Olympus-U-RFL-T	Olympus
Inverses Mikroskop Axiovert 40 CFL	Zeiss
Kryostat Leica CM 3050 S	Leica
Mikrozentrifuge 5424	Eppendorf
Thermomixer comfort	Eppendorf
Tischzentrifuge Rotofix 32A	Hettich

Vortexer	Heidolph
Wasserbad	GFL
Zellkultur-Brutschrank	Binder

Software	Hersteller
Photoshop CS5 Extended	Adobe
Word 2008 und 2011 for Mac	Microsoft®
Excel 2008 und 2011 for Mac	Microsoft®
ApE v1.17	M. Wayne Davis
Endnote X6 und X8	Thomson Reuters
NCBI BLAST	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Zen 2009 Light Edition	Carl Zeiss Microscope GmbH

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultur

HeLa Zellen wurden bei 37°C in einem Brutschrank kultiviert. Hierfür wurden Zellkulturflaschen (25cm²) und DMEM Medium plus 10% fetales Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin-Streptomycin verwendet. Je nach Wachstumsrate wurden die Zellen alle 2-4 Tage umgesetzt und verdünnt in neue Zellkulturflaschen überführt. Zur Umsetzung wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde mit 0,25% Trypsin inkubiert, wodurch sich die Zellen vom Boden ablösten. Anschließend wurde neues DMEM Medium hinzugefügt. Von dieser Zellsuspension wurden ca. 10% der Zellen in eine neue Zellkulturflasche mit neuem Medium überführt.

4.2.2 Molekularbiologische Methoden

In den Vektor pcDNA3 wurde die cDNA huLRP4 hinein kloniert. Die Größe des Vektors pcDNA3 beträgt 5,4 Kilobasen. Die Größe der cDNA huLRP4ext beträgt 7,9 Kilobasen. Die cDNA huLRP4ext wurde im Rahmen eines vorhergehenden Projektes in der Arbeitsgruppe gewonnen und ebenfalls mit EcoRI-HF verdaut. Der Vektor wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRI-HF verdaut. Die Schnittstelle von EcoRI befindet sich im Vektor

pcDNA3 dort, wo das Insert cDNA huLRP4 eingefügt werden sollte. Hierzu wurde ein Ansatz gemäß den Herstellerangaben des Restriktionsenzym angefertigt. Inkubiert wurde 60 Minuten bei 37°C. Um die Aktivität des Restriktionsenzym zu stoppen wurde der Ansatz 20 Minuten lang bei 65°C inkubiert. Um eine Re-Legierung der Sticky Ends des Vektors zu vermeiden wurde der verdaute Vektor mit Antarktischer Phosphatase nach Angaben des Herstellers 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Hitzeinaktivierung erfolgte für fünf Minuten bei 65°C. Die Ligation von cDNA huLRP4voll (Insert) und pcDNA3 (Vektor) erfolgte mit T4 DNA Ligase nach Angaben des Herstellers. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 60 Minuten. Die Plasmid-DNA wurde kompetenten TOP10 E.coli Zellen hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte 15 Minuten auf Eis, dann 90 Sekunden bei 42°C und wieder 5 Minuten auf Eis. Nun wurde jeweils 250 µl LB-Medium (Luria Bertani, Bakterienkulturmedium) zugefügt und 45 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden danach auf Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Minipräparation wird genutzt, um kleine Mengen Plasmid-DNA zur Analyse zu gewinnen. Danach erfolgte die Inkubation von gepickten Bakterienkolonien in LB-Medium. Für die Minipräparation diente das Protokoll des Herstellers (Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit) als Vorlage. Um ausreichende Mengen an Plasmid-DNA für die Transfektion von Zellen zu gewinnen, wurde nach Analyse der Plasmid-DNA eine Maxipräparation mithilfe des NucleoBond® Xtra Maxi EF-Kit nach Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Die mit Hilfe der Minipräparation gewonnene DNA wurde mit dem Restriktionsenzym ApaLI nach Angaben des Herstellers verdaut. Bei 37°C wurde 60 Minuten lang inkubiert. Zur Auswertung des Verdaus wurde eine Gelelektrophorese realisiert. Hierbei wandern die DNA-Fragmente, die durch den Verdau entstanden sind, der Größe nach durch das Gel. Dieses erlaubt die Abschätzung der Plasmid-Größe bzw. die Analyse der Vollständigkeit der Plasmid-DNA. Die Gelelektrophorese wurde bei 100V für 45 Minuten ausgeführt. Zur Kontrolle wurde die DNA huLRP4ext in pcDNA3 durch Eurofins MWG GmbH kommerziell sequenziert.

4.2.3 Histologische Methoden

Die transiente Transfektion wurde realisiert, um in immunhistologischen Färbungen die Expression von humanem LRP4 in transfizierten HeLa Zellen nachzuweisen. Hierfür wurde das Transfektionsreagenz Lipofectamin® 2000 verwendet. Es erfolgte die

Überführung der Zellen auf 24-Well Platten, danach die Transfektion gemäß dem Protokoll des Herstellers.

Für die immunhistologische Färbung erfolgte die Überführung von HeLa Zellen in DMEM Medium (500µl/Vertiefung) auf beschichtete PDL-Gläser in 24-Well-Platten und die transiente Transfektion mit dem Vektor huLRP4 in pcDNA3. Anschließend wurden die Zellen mit 100µl/Vertiefung Formaldehyd (3,7%) 10 Minuten lang fixiert. Es erfolgte zunächst das Blocken der Zellen mit Kulturmedium, dann mit Blockpuffer, jeweils 10 Minuten lang. Daraufhin wurden die Zellen 10 Minuten lang mit Waschpuffer gewaschen. Jeweils 300µl/Vertiefung des verdünnten Erstantikörpers (anti-human LRP4 hergestellt in Kaninchen) wurden zu den Zellen hinzugefügt und für 60 Minuten auf einer Wippe bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte eine dreimalige Waschung der Zellen mit Waschpuffer jeweils fünf Minuten lang. Als nächstes wurden die Zellen mit 300µl/ Zweitantikörper (anti-Kaninchen IgG Alexa 594) in einer Verdünnung von 1:1000 60 Minuten lang bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Die Zellen wurden drei Mal jeweils fünf Minuten lang gewaschen.

Eine DAPI-Lösung erlaubte die Färbung der Zellkerne, indem 200µl/Well in einer Verdünnung 1:10 000 hinzugefügt und lang 10 Minuten inkubiert wurde. Nach erneuter Waschung der Zellen mit Waschpuffer für zwei Minuten folgte die Eindeckung mit jeweils einem Tropfen Moviol auf Objektträger.

4.2.4 Stabil transfizierte Zelllinie

Um die Bedingungen für die Testung der Patientenseren bzw. den ELISA so stabil wie möglich zu gestalten, wurde versucht eine stabil transfizierte Zelllinie herzustellen, die humanes LRP4 exprimiert. Die Verwenung von HeLa Zellen erfolgte, da sie schnell wachsen und ein großer Erfahrungsschatz zu diesen Zellen besteht.[44]

Für die Herstellung der stabil mit LRP4-transfizierten Zelllinie wurden HeLa Zellen auf eine 6-Well Platte ausgesät (60 000/Well). Die Zellen wurden mit Superfect® nach Angaben des Herstellers transfiziert. Die Zellen von drei Wells der Platte wurden transfiziert, die restlichen drei dienten als Negativkontrolle. Die Plasmid-DNA besitzt neben einer Ampicillin-Resistenz auch eine Geneticin (G418)-Resistenz, was die Selektion in eukaryoten Zellen erlaubt. Nach zwei Tagen begann die Behandlung der HeLa Zellen mit Geneticin (G418) in den Konzentrationen 400, 600 und 800 µg/ml. Die schnellste Selektion erfolgte bei 800µg/ml G418 nach einer Woche. Die mit Geneticin behandelten

Zellen wurden zunächst auf eine Petrischale mit 16cm² überführt. Nach drei bis vier Wochen konnten die Foci ausgemacht werden. Diese konnten nun einzeln mit 0,25% Trypsin abgelöst und auf eine 96-Well Platte übertragen werden. Es erfolgten Verdünnungsreihen jeder Kolonie auf der 96-Well Platte. Insgesamt wurden auf diese Weise 20 Zellklone isoliert.

Um die Expression von humanem LRP4 immunhistochemisch zu kontrollieren, wurde jeweils ein Teil der Klone auf eine 24-Well Platte übertragen und separat untersucht. Um den Selektionsdruck und damit die Expression von humanem LRP4 in den Zellen aufrecht zu erhalten, wurden die Zellen weiterhin mit 800µg/ml Medium G418 (Neomycin) behandelt. Nach 3-4 Wochen konnte auf den 96-Well Platten eine Koloniebildung erkannt werden (mindestens 25% des Wells waren besiedelt). Zeigte sich in der Immunhistochemie das Vorhandensein von humanem LRP4 auf den Zellen, wurden diese Klone nun auf 24-Well Platten, später auf 6-Well Platten bzw. in T25-Zellkulturflaschen übertragen.

4.2.5 Biochemische Methoden

4.2.5.1 Zelllysate

Um die von den Zellen exprimierten Proteine im Western Blot zu detektieren, wurden Zelllysate von allen zu testenden Zelllinien hergestellt. Das Medium der Zellkulturflasche wurde entfernt und zunächst zwei Mal mit kaltem PBS gewaschen. Um die Zellen zu lösen wird 350µl RIPA Puffer (enthält SDS und Proteaseinhibitoren) auf die Zellen gegeben. Diese wurden mit einem Zellschaber abgelöst und in ein Eppendorfgesäß pipettiert. Die Proben wurden fünf Mal jeweils 20 Sekunden lang sonifiziert und dann 30 Minuten lang bei 13 000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand bildete das Proteinlysate für die Analyse im Western Blot. Durch die Gelelektrophorese wurden die Proteine der Zelllysate nach ihrem Molekulargewicht im Elektrophorese Gel aufgetrennt. Durch SDS wurden die Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts negativ geladen und wanderten in einem elektrischen Feld zur Anode. Die Proben wurden in einem Sammelgel zur lokalen Konzentrierung der Proteine in Banden gegeben und liefen dann durch das Trenngel, in welchem sie nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt wurden. Die Gele setzten sich folgendermaßen zusammen:

Sammelgel 5%: 3,4 ml H₂O
 0,625 ml 0,5M Tris-HCL pH 6,8
 0,025 ml 20% SDS
 0,85 ml Acrylamid
 0,05 ml 10% APS
 0,005 ml TEMED

Trenngel 10%: 3,17 ml H₂O
 2,0 ml 1,5M Tris-HCL pH 8,8
 0,04 ml 20% SDS
 2,67 ml Acrylamid
 0,08 ml 10% APS
 0,003 ml TEMED

Nach der Herstellung der Lösungen wurde zuerst das Trenngel gegossen und mit Isopropanol beschichtet. Das Gel wurde 30 Minuten getrocknet und mit Wasser gewaschen, um das Isopropanol wieder zu entfernen. Dann wurde das Sammelgel in die Form gegossen. Durch das Einsetzen von Kämmen werden Geltaschen zum Laden der Proteinlysate geschaffen. Nach dem Trocknen können die Gele bei 4°C gelagert werden. Die einzelnen Proben wurden 1:3 mit 6xSDS-Puffer versetzt und fünf Minuten lang bei 95°C im Heizblock aufgeköcht. Auf diesem Weg lagert sich das SDS an die Proteine an, es entstehen negativ geladene Sulfid-Gruppen und die Proteine wandern durch das Anlegen eines elektrischen Feldes zur Anode. Eine Gelkammer wurde mit den gegossenen Gelen beladen und mit Transferpuffer aufgekössen. Nun wurden die Proteinlysate in die Taschen pipettiert. Ein Marker zur späteren Bestimmung des Molekulargewichts der aufgetrennten Proteine wurde ebenfalls in eine Tasche pipettiert. Die Spannung wurde zuerst bei 80V angelegt, bis die Proben durch das Sammelgel gelaufen waren. Nach ca. 15 Minuten wurde die Spannung auf 120V erhöht. Das elektrische Feld wurde aufrechterhalten bis die Proben das gesamte Gel durchwandert hatten. Dieser Vorgang dauerte ein bis zwei Stunden.

4.2.5.2 Western Blotting

Für den Western Blot wurde zunächst eine PVDF Membran pro Gel zugeschnitten und zuerst in Methanol, dann in Transferpuffer unter konstanter Bewegung inkubiert. Das Gel wurde ebenfalls in Transferpuffer so inkubiert. Zum Blotten wurden Gel und Membran mit Filterpapier bei 15V und 0,64A für 45 Minuten in einem Blotter geblottet. Die Membran wurde anschließend 10 Minuten lang in 3xTBS-T gewaschen. Die Membran wurde dann mit Blockpuffer (5% Magermilch in TBS-T) eine Stunde lang geblockt. Nun erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (anti-huLRP4, 1:1000 verdünnt in 10ml TBS-T + 5ml Milch 1,5% Fettanteil). Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden erfolgte eine 30-minütige Waschung der Membran mit TBS-T. Daraufhin folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (anti-Kaninchen IgG HRP-gekoppelt, 1:10 000 verdünnt in Blockpuffer). Die Membran wurde danach erneut 10 Minuten lang mit TBS-T gewaschen. Die Übertragung der Fluoreszenz auf Fotopapier erfolgte mit Hilfe des ECL-Kit GE-Healthcare und wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

4.2.6 Enzyme linked Immunosorbent Assay

Für den Enzyme linked immunosorbent Assay (ELISA) wurden Platten mit 96 Vertiefungen benutzt. Als Grundlage für den ELISA diente die Zelllinie HeLa 6g (Stabile HeLa Zelllinie, die huLRP4 exprimiert). Als Negativ-Kontrolle wurden zum einen in jedem ELISA nicht transfizierte HeLa Zellen verwendet. Zum anderen wurden Seren von gesunden Probanden getestet. Für die Positivkontrolle wurde ein anti-LRP4 Antikörper in bekannter Konzentration verwendet. Der konkrete Aufbau des ELISA ist in Abb. 3 dargestellt. Mit diesem Aufbau konnten auf jeder 96-Well Platte vier Patientenserum gleichzeitig getestet werden.

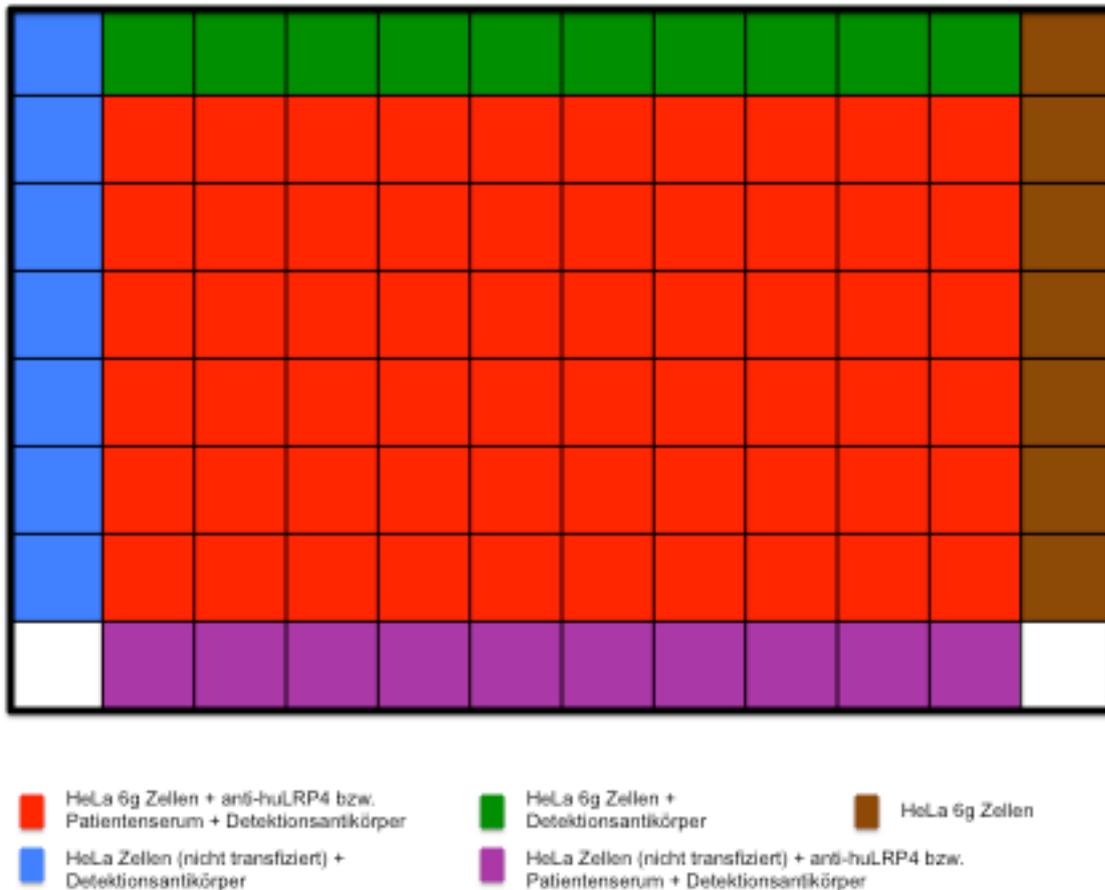


Abbildung 3: Aufteilung einer 96-Well ELISA Platte für den Nachweis von LRP4-Antikörpern

Am Tag vor dem ELISA wurden 10×10^3 Zellen pro Vertiefung ausgesät. Die Platten wurden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen 10 Minuten mit 3,7% Formaldehyd fixiert. Anschließend wurde drei Mal für jeweils fünf Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Nun wurden die Platten für eine Stunde mit Blockpuffer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blocken.

Als Positivkontrolle für das Vorhandensein von anti-LRP4-Antikörpern wurde der anti-huLRP4-Antikörper in Blockpuffer verdünnt auf die obersten Vertiefungen gegeben und bis zum Ende der Platte weiter verdünnt (1:2, 1:4, 1:8 usw.). Zur Testung der Patientenseren wurde das Serum in Blockpuffer ebenfalls als Verdünnungsreihe zu den Zellen gegeben. Inkubiert wurde jeweils eine Stunde lang. Die Platten wurden erneut drei Mal jeweils eine Minute lang gewaschen. Als nächstes erfolgte die Inkubation mit einem HRP-gekoppelten Zweitantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln. Für die Positivkontrolle mit dem anti-huLRP4-Antikörper diente ein anti-Kaninchen-IgG-HRP-gekoppelter Antikörper, für die Testung der Patientenseren wurde ein anti-human-

IgG-HRP-gekoppelter Antikörper verwendet. Anschließend wurden die Platten zwei Mal mit Waschpuffer und drei Mal mit PBS gewaschen. Die Waschung diente der Entfernung von Triton im Waschpuffer, welches mit der Peroxidaseaktivität des Antikörpers interferieren könnte. Nun wurde eine TMB-Lösung auf die Zellen gegeben und 23 Minuten lang in Dunkelheit inkubiert. TMB ist das Substrat der Meerrettichperoxidase und aktiviert diese. Um die Reaktion der Meerrettichperoxidase zu stoppen, wurde die gleiche Menge HCL hinzugefügt. Die Extinktion der einzelnen Vertiefungen konnte bei 450nm im ELISA Reader bestimmt werden.

5 Ergebnisse

5.1 huLRP4 in pcDNA3

Um zu untersuchen, ob die cDNA für huLRP4voll erfolgreich in den Vektor pcDNA3 kloniert werden konnte, wurde ein Restriktionsverdau des Plasmids mit dem Enzym ApaI durchgeführt. Das Restriktionsenzym ApaI schneidet den fertiggestellten Vektor (pcDNA3 plus cDNA für huLRP4) an folgenden Positionen von Basenpaaren: 968BP, 6190BP, 6864BP, 11793BP und 12030BP. (s. Abbildung unten) Demnach werden nach dem Restriktionsverdau Banden mit den Größen 5,2kb, 4,9kb, 1,2kb, 0,9kb sowie 0,7kb erwartet. In Abbildung 5 zeigen sich die erwarteten Banden von „huLRP4voll in pcDNA3 nach ApaI“. Somit zeigte sich, dass die cDNA für huLRP4voll erfolgreich in den Vektor pcDNA3 kloniert wurde.

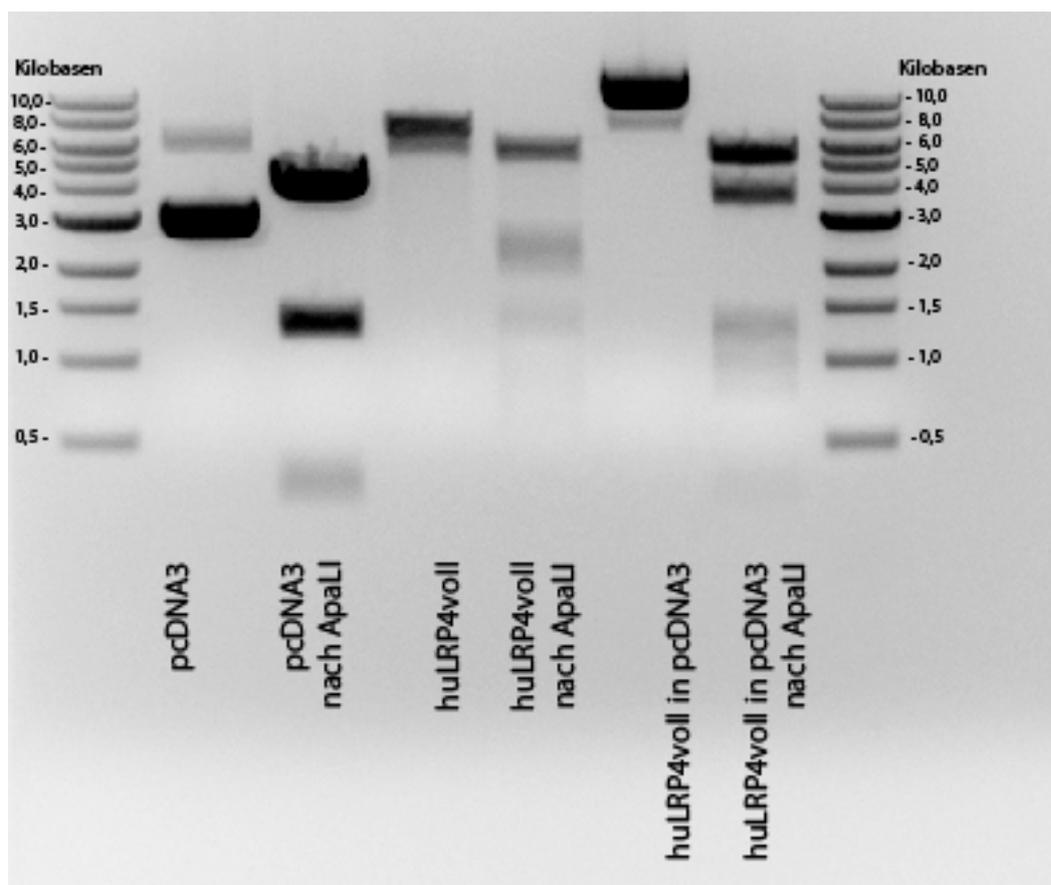


Abbildung 4: Restriktionsverdau des Vektors huLRP4voll in pcDNA3 mit ApaI

pcDNA3 (Vektor), cDNA huLRP4voll (Insert) und huLRP4voll in pcDNA3 (klonierter Vektor) wurden mit ApaI restriktionsverdaut, um das Vorhandensein und die korrekte Ausrichtung des Inserts im Vektor zu überprüfen. Als Kontrolle wurden alle Proben unverdaut aufgetragen.

Weiterhin konnten durch die Sequenzierung der Plasmid-DNA durch Eurofins MWG GmbH Punktmutationen ausgeschlossen werden.

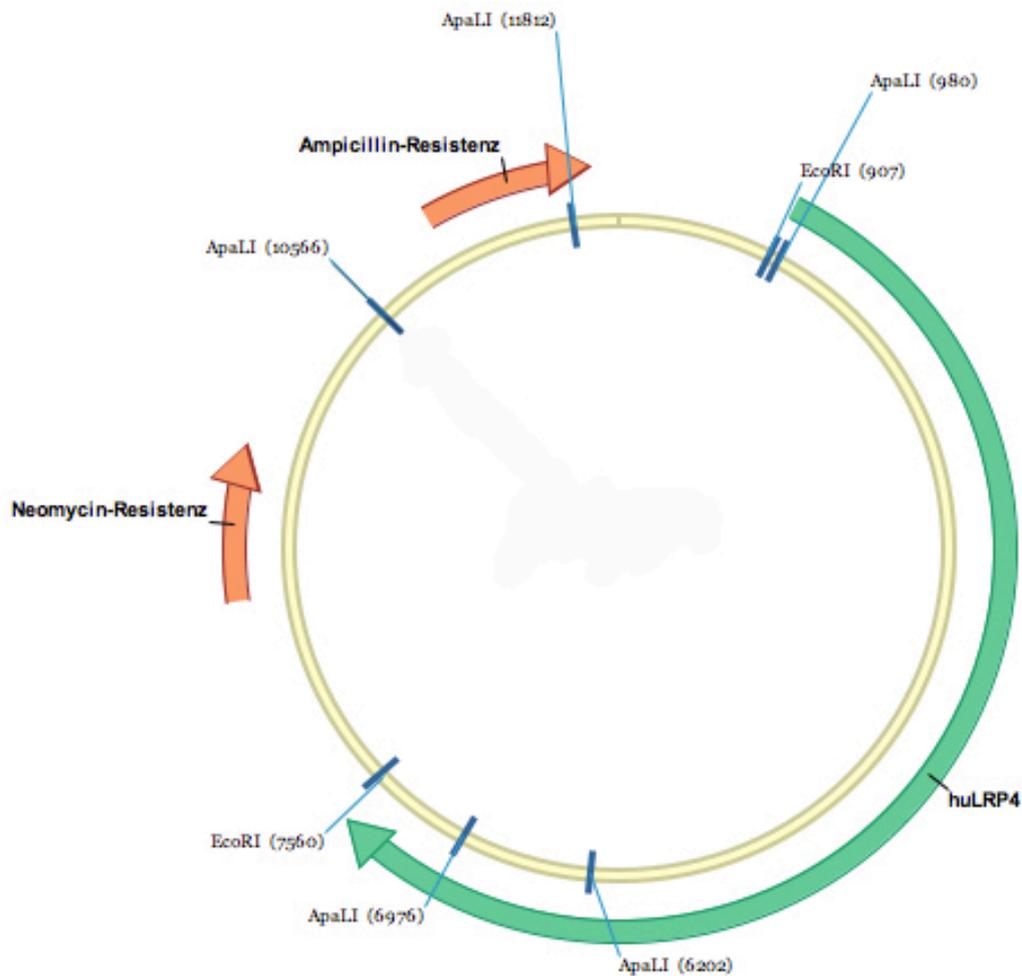


Abbildung 5: Vektorkarte huLRP4voll in pcDNA3

Die Karte des Vektors zeigt die Schnittstellen von EcoRI. Hier wurde das Insert huLRP4voll in den Vektor pcDNA3 kloniert. Die Karte zeigt außerdem die für die Selektion in Bakterien wichtige Ampicillin-Resistenz und die für die Selektion in eukaryoten Zellen benötigte Neomycin (G418)-Resistenz.

Um die Expression von humanem LRP4 in den Zellen immunohistochemisch zu prüfen, wurden HeLa Zellen transient transfiziert. Der Nachweis von LRP4 erfolgte zwei Tage später mittels spezifischer Antikörper.

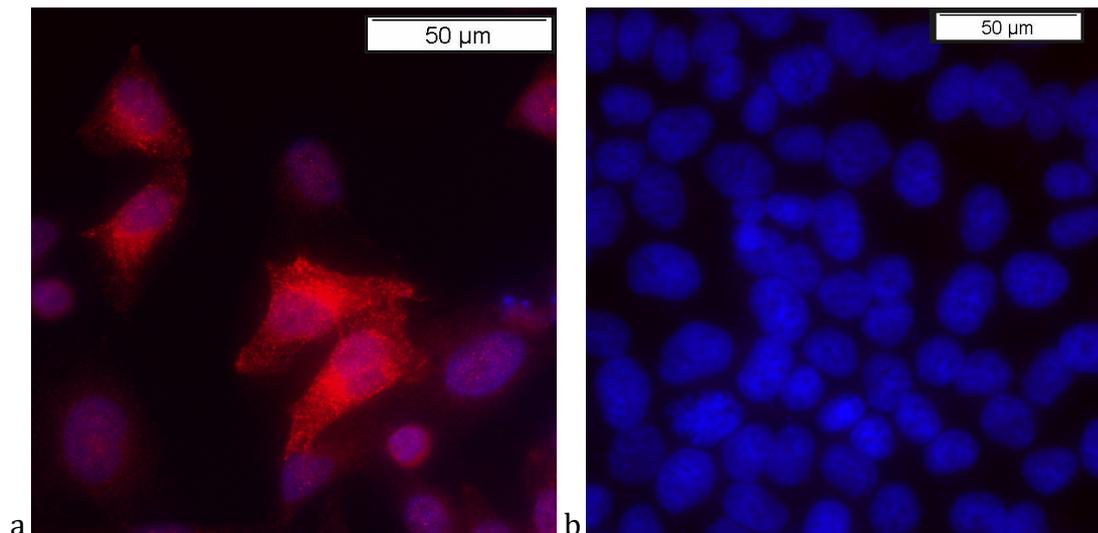


Abbildung 6 Färbung von mit huLRP4voll in pcDNA3 transfizierten HeLa Zellen

a: Mit huLRP4voll in pcDNA3 transient transfizierte HeLa Zellen, gefärbt mit einem 1. Antikörper (anti-huLRP4) und 2. Antikörper (anti-Kaninchen IgG, Alexa 594), DAPI-Färbung der Nuclei
b: Nicht transfizierte HeLa Zellen, gefärbt mit einem 1. Antikörper (anti-huLRP4) und einem 2. Antikörper (anti-Kaninchen IgG, Alexa 594), DAPI-Färbung der Nuclei

Die Färbung transient transfizierter HeLa Zellen zeigte, dass LRP4 erfolgreich in den pcDNA3 Vektor kloniert worden war (Abb. 6a). Die Abwesenheit einer Färbung mit den anti-LRP4-Antikörpern (Abb. 6b) zeigt, dass nicht transfizierte HeLa Zellen kein endogenes LRP4 exprimieren. Dies ist eine wesentliche Grundlage für alle weiteren Experimente und besonders für die Entwicklung des ELISAs.

5.2 Stabile Zelllinie

Um einen reproduzierbaren ELISA zu entwickeln ist eine LRP4 stabil exprimierende Zelllinie Voraussetzung. Da eine Zelllinie mit stabiler Expression von humanem LRP4 nicht kommerziell erhältlich ist, musste eine solche Zelllinie hergestellt werden. Hierfür wurden HeLa Zellen verwendet, später wurde der Prozess auch mit COS7 Zellen durchgeführt, um eine mögliche Alternative zu haben. Zunächst wurde versucht, die stabile Transfektion mit dem für die vorher durchgeführten transienten Transfektionen verwendeten Lipofectamin® 2000 durchzuführen. Unter diesem Reagenz starben allerdings nach einigen Tagen ein Großteil der Zellen ab. Somit wurde zu dem als weniger toxisch beschriebenen SuperFect gewechselt. Mit diesem Transfektions Reagenz und der Selektion der Zellen mit Geneticin (G418) bei einer Konzentration von 800 µg G418 pro ml Zellmedium gelang nach mehreren Subklonierungen die Herstellung einer stabilen Zelllinie. Während der Subklonierungen wurden stets immunhistologische Färbungen der Zellklone angefertigt, um die Expression von LRP4 sicher zu stellen. Weiterhin

wurden Zellysate der Zellklone hergestellt, um einen Western Blot zum Nachweis von humanem LRP4 durchzuführen.

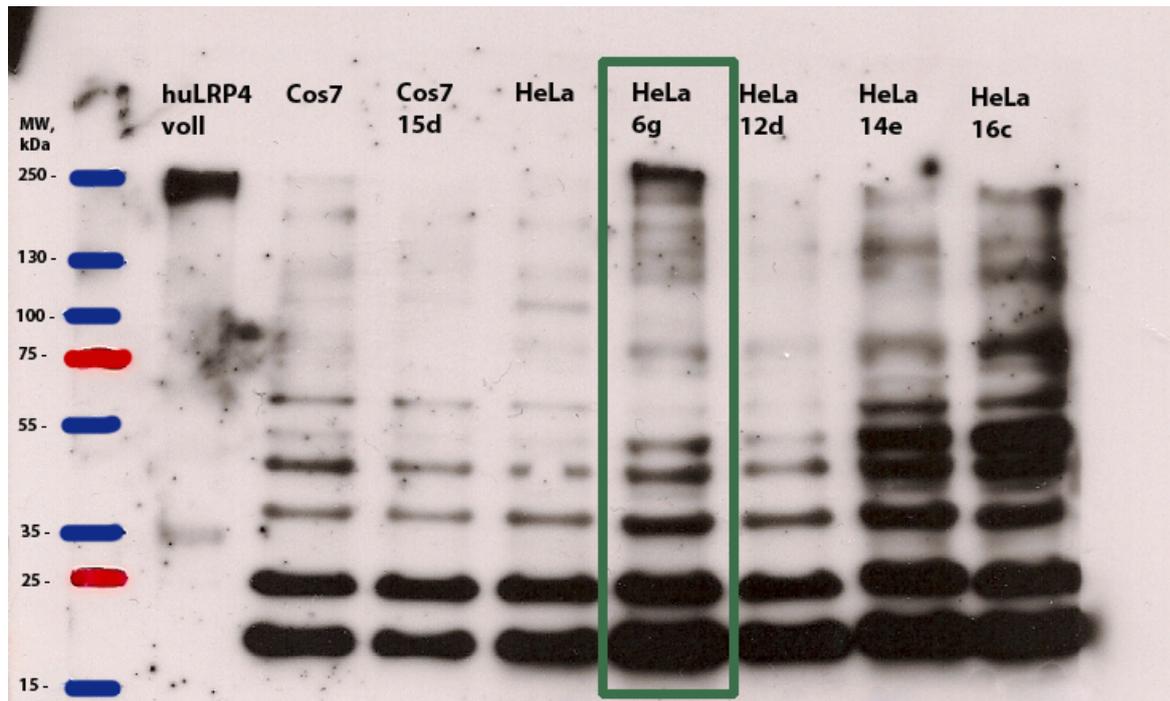


Abbildung 7: Western Blot von Zellklonen der unterschiedlichen stabil transfizierten Zelllinien

Zellysate von Klonen für die Stabile Zelllinie wurden im Western Blot auf die Expression von humanem LRP4 hin untersucht. Die Proben wurden gefärbt mit einem 1. Antikörper (anti-huLRP4) und einem 2. Antikörper (anti-Kaninchen IgG, HRP-konjugiert). Als Positivkontrolle wurde humanes LRP4, als Negativkontrolle wurden Zellysate von nicht transfizierten Zellen verwendet. Der Western Blot zeigt die Präsenz von humanem LRP4 im Lysat der Zelllinie HeLa 6g

Der Western Blot zeigte die Präsenz von humanem LRP4 (Bande bei 250 kDa) im Lysat der Zelllinie HeLa 6g (Abb. 7). Allerdings fiel auf, dass sich in allen getesteten Zelllinien inklusive der Zelllinien ohne vorherige Transfektion eine unspezifische Bindung des Antikörpers an Proteine unterschiedlicher Größen (vor allem im Bereich von 15 bis 55 kDa) zeigte. Das Ergebnis der Western Blots der Zelllinie HeLa 6g konnte in einer immunhistochemischen Färbung verifiziert werden (Abb. 8).

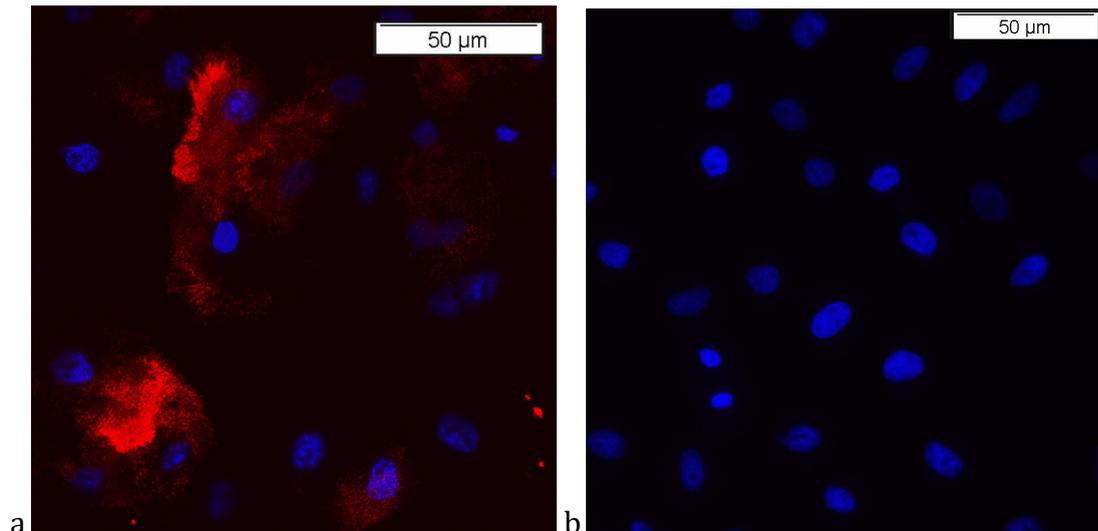


Abbildung 8: Färbung von Zellen der stabilen Zelllinie HeLa 6g

a: Zellen des Klons HeLa 6g (stabil transfiziert mit huLRP4 in pcDNA3), gefärbt mit einem 1. Antikörper (anti-huLRP4) und einem 2. Antikörper (anti-Kaninchen IgG, Alexa 594), DAPI-Färbung der Nuclei

b: Native HeLa Zellen, gefärbt mit einem 1. Antikörper (anti-huLRP4) und einem 2. Antikörper (anti-Kaninchen IgG, Alexa 594), DAPI-Färbung der Nuclei

5.3 ELISA

Wie ist es nun möglich eine schnelle und sichere Diagnose durch den Nachweis der Autoantikörper zu stellen? Bei jedem Patienten- bzw. Kontrollgruppenserum wurde die Reaktion der Serumprobe sowohl auf die transfizierten, d.h. auf die LRP4-exprimierenden Zellen als auch auf nicht transfizierte und damit nicht LRP4-exprimierende Zellen getestet. Die gemessene Extinktion bei nicht transfizierten Zellen wurde von der gemessenen Extinktion bei den LRP4-exprimierenden Zellen subtrahiert. Somit konnte der Hintergrund, welcher variabel zwischen den einzelnen Assays ist, weggerechnet werden und eine einheitliche Reaktion berechnet werden. Es wurden 15 Seren gesunder Probanden als Kontrollgruppe und 36 Seren AChR- und MuSK-seronegativer MG-Patienten auf die Anwesenheit von Antikörpern gegen LRP4 getestet. Als Signifikanzgrenze wurde die 4-fache Standardabweichung benutzt, was einer Konfidenz von 99.9% entspricht. Bei keinem der Seren konnte im ELISA eine über dem Hintergrund liegende spezifische erhöhte Konzentration an LRP4 nachgewiesen werden.

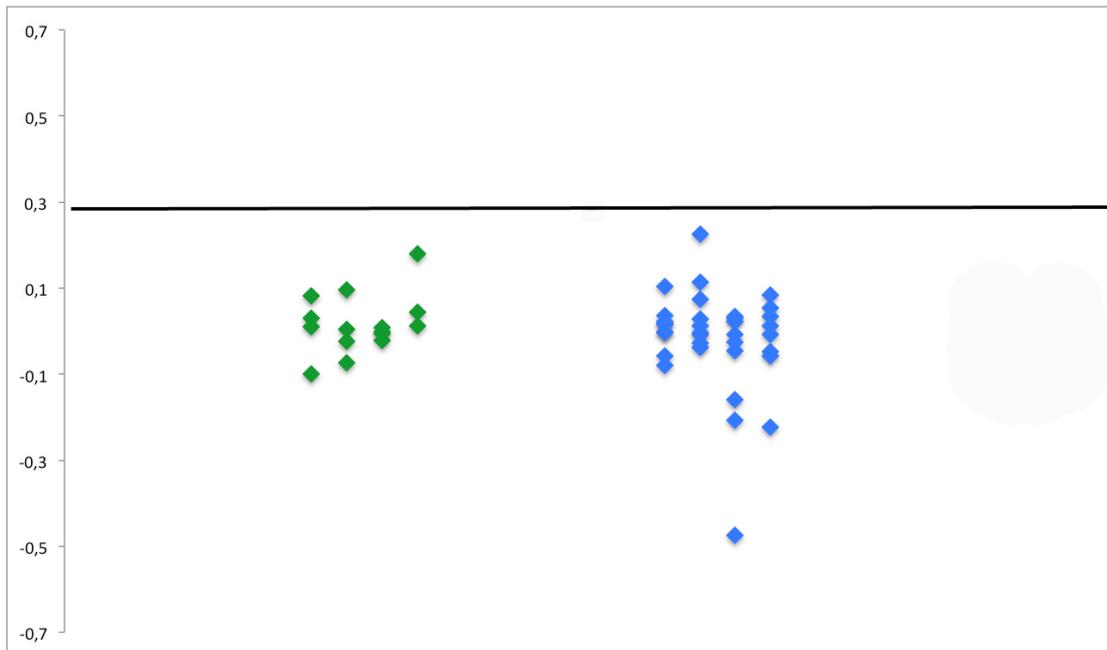


Abbildung 9 ELISAs für LRP4-Antikörper

Die vom Hintergrund (Reaktion der Seren auf nicht transfizierte Zellen) subtrahierten Mittelwerte der gemessenen Extinktion (y-Achse) von Seren gesunder Probanden (grüne Rauten) und AChR- und MuSK-seronegativer MG-Patienten (blaue Rauten) wurden hier aufgetragen. Die schwarze Linie zeigt die 4-fache Standardabweichung, welche als Signifikanzgrenze bestimmt worden ist. Keine der getesteten Seren lag demnach oberhalb des Signifikanzniveaus.

6 Diskussion

Die Rolle von LRP4 in der MuSK- und Agrin-vermittelten Bildung, Aufrechterhaltung und Regeneration der neuromuskulären Endplatte macht das Transmembranprotein zu einem gut geeigneten Target für Autoantikörper mit dem klinischen Erscheinungsbild einer MG. LRP4 ist nicht nur während der Bildung der neuromuskulären Endplatte [29], sondern auch in der Aufrechterhaltung ihrer Funktion und Beschaffenheit essentiell: Es kommt zu einem Verlust der charakteristischen Struktur der neuromuskulären Endplatte, zu einer Reduktion der Dichte von AChR an der neuromuskulären Endplatte, zu einem Verlust von Vesikeln und aktiven Zonen und damit zu einer verminderten Übertragung vom Nerven auf den Muskel. Weiterhin kann simultan eine Reduktion an neuronalem Agrin an der neuromuskulären Endplatte beobachtet werden.[35] Somit ist der Nachweis dieses Targetprotein in der Diagnostik von MG von großer Bedeutung.

6.1 Nachweis von Antikörpern gegen LRP4 in Patienten mit MG

Weltweit befassen sich mehrere Arbeitsgruppen mit der Untersuchung von LRP4-Antikörpern bei MG. Wie oben beschrieben bildete die Arbeit von *Pevzner et al* die Grundlage für die vorliegende Untersuchung. Hier wurden die gleichen 13 doppelt-seronegative Patientenserum untersucht. *Pevzner et al* zeigte, dass 12 von 13 Seren mit der neuromuskuläre Endplatte von Skelettmuskeln in Kryostatschnitten von adulten Mäusen reagierten. 50% der Seren zeigten eine immunhistochemische Reaktion auf mit LRP4-transfizierten HEK-Zellen. Wie oben beschrieben fungiert LRP4 als Ko-Rezeptor von Agrin. Durch die Bindung beider Proteine wird die MuSK aktiviert, welche die für die neuromuskuläre Übertragung essentiellen Azetylcholinrezeptoren akkumuliert, regeneriert und die Dichte der Rezeptoren aufrechterhält. (vgl. Kapitel 2.2.1). In Myotuben-Kulturen von Hühnerembryonen, welche mit den zu testenden Patientenserum inkubiert wurden, war die Agrin-induzierte Aggregation von AChR gehemmt. Dies zeigt, dass Anti-LRP4-Antikörper bereits die Entstehung einer suffizienten physiologischen neuromuskulären Endplatte be-bzw. verhindern können.[3]

Higuchi et al zeigte ebenfalls den Nachweis von LRP4-Antikörpern Seren von doppelt-seronegativen MG-Patienten. Im Vergleich mit anderen Arbeitsgruppen gelang hier die Bestimmung eines genauen Titors. Im Gegensatz zu u.g. Arbeit von *Zisimopoulou et al* zeigte sich allerdings ein sehr viel geringerer Anteil von LRP4-Antikörpern in den positiven Seren.[2]

In „A comprehensive analysis of the epidemiology and clinical characteristics of anti-LRP4 in MG“ [45] wurde die wohl bisher größte Kohorte mit 809 Patientenseren, davon 635 doppelt-seronegativen Patienten auf das Vorhandensein von LRP4-Antikörpern untersucht. Die Arbeitsgruppe beschränkte sich auf die Aussage über das Vorhandensein der Antikörper. Die genauen Antikörpertiter wurden nicht bestimmt.

Von allen 809 getesteten doppelt seronegativen Seren (keine Antikörper gegen den AChR oder die MuSK) fanden sich in 20% der Fälle Autoantikörper gegen LRP4. Weiterhin wurden auch in einem geringen Teil der Patientenseren, welche Antikörper gegen den AChR oder die MuSK hatten, zusätzlich Antikörper gegen LRP4 gefunden. Außerdem enthielten Seren von Patienten mit Multipler Sklerose anti-LRP4-Antikörper. Einerseits ist hier sicherlich die Epidemiologie und Prävalenz interessant. Andererseits wurde im Rahmen der Arbeit von *Zisimopoulou et al.* die klinische Ausprägung der LRP4-positiven Patienten untersucht. Patienten mit LRP4-Antikörpern hatten generell eine mildere Symptomatik, als diejenigen mit AChR- oder MuSK-Antikörpern. Die meisten LRP4-positiven Patienten zeigten einen Krankheitsbeginn um das 40. Lebensjahr und eine Symptomatik die vor allem in die Kategorien I und II der modifizierten Klassifikation der MG Foundation of America eingeordnet werden konnte.[7] In 20% der untersuchten Fälle von rein okulärer MG waren die Patientenseren positiv für LRP4-Antikörper. Interessanterweise ist bei okulärer MG in etwa 50% das Vorhandensein von AChR-Antikörpern[46] und nur selten das Vorhandensein von MuSK-Antikörpern nachweisbar[11]. Zusätzlich befasste sie die Arbeit von *Zisimopoulou et al* noch mit der Therapie von LRP4-positiven Patienten. Die bereits für AChR-positiven Patienten etablierten Therapien mit Azetylcholinesterasehemmern, Corticosteroiden, Azathioprin u.a. zeigten eine vergleichbare Wirksamkeit bei LRP4-positiver MG wie bei Patienten mit AChR-seropositiver MG. Alle oben genannten Aspekte sind vor allem für den klinisch arbeitenden Neurologen von enormer Bedeutsamkeit, da sich somit die Behandlung nur für MuSK-positive Patienten anders verhält, da diese Patienten oft einen weitaus schwereren Krankheitsverlauf zeigen.[45] *Zhang et al* wies in der Arbeit „Autoantibodies to lipoprotein-related protein 4 in double seronegative myasthenia gravis“ ebenfalls LRP4-Antikörper in 9,2% der getesteten Patienten mit doppelt-seronegativer MG und in 2,8% der getesteten Patienten mit MuSK-Antikörpern nach. Keine LRP4-Antikörper fanden sich hingegen in Patienten mit AChR-Antikörpern, korrelierend mit den Ergebnissen aus *Higuchi et al.*[2] In einer Untersuchung von chinesischen Patienten zeigten 2% der doppelt-seronegativen MG Seren LRP4-Antikörper, hier mit dem

klinischen Erscheinungsbild einer okulären MG.[47] Insgesamt zeigten sich eine große Variation der Anteile an LRP4-Antikörper positiven Patienten mit doppelt-seronegativer MG: von 2% in *Higuchi et al* (Patientenseren aus Japan)[2] und *Li et al* (Seren aus China)[47], 9,2% in *Zhang et al* (Seren aus Griechenland und den USA)[1] bis zu 50% in *Pevzner et al* (Seren aus Deutschland)[3]. Hier mögen Ethnizität oder geographische Aspekte eine Rolle spielen.

Im Rahmen der Arbeit von *Zhang et al* wurden neben gesunden Probanden, bei denen sich keine LRP4-Antikörper fanden, auch Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen untersucht. Hier fanden sich interessanterweise bei 16 getesteten Patienten mit einer Neuromyelitis optica Spektrum Erkrankung und keiner MG in zwei Fällen LRP4-Antikörper. [1] Auch *Vaknin-Dembinsky et al* sowie *Jarius et al* zeigten eine Komorbidität zwischen MG und Neuromyelitis optica Spektrum Erkrankungen. In der Arbeit von *Jarius et al* waren alle eingeschlossenen MG-Patienten AChR-Antikörper-positiv. Seronegative Patienten wurden hier nicht inkludiert.[48] Dahingegen waren in der Arbeit von *Vaknin-Dembinsky et al* 73% der MG-Patienten mit zusätzlichem Verdacht auf eine Neuromyelitis optica Spektrum Erkrankung AChR-Antikörper positiv, die restlichen 27% wurden nicht spezifiziert. Insgesamt zeigte sich bei sieben von 15 Patienten das Auftreten von Aquaporin-4-Antikörpern bzw. das Vorhandensein einer Neuromyelitis optica Spektrum Erkrankung. Zwei der sieben Patienten waren interessanterweise AChR-Antikörper negativ[49]. Dies suggeriert eindeutig einen Zusammenhang zwischen MG und Neuromyelitis optica Spektrum Erkrankungen. Inwieweit LRP4-Antikörper auch bei den Neuromyelitis optica Spektrum Erkrankungen oder bei anderen entzündlichen ZNS-Erkrankungen mit oder ohne Komorbidität einer MG eine Rolle spielen muss allerdings an einem größeren Patientenkollektiv noch intensiver untersucht werden.

6.2 ELISA als diagnostische Methode

Ein ELISA bot sich als bereits im Nachweis von anderen Antikörpern verwendetes Assaysystem an, um Seren von Patienten mit dem klinischen Bild einer MG auf das Vorliegen von anti-LRP4-Antikörpern zu untersuchen. Bereits *Hoch et al. 2001* hatte mithilfe dieser Methode Antikörper gegen MuSK im Serum von MG Patienten nachweisen können. Im Gegensatz zu *Hoch et al. 2001* wurde in der vorliegenden Arbeit allerdings ein Zell-basierter ELISA gewählt. Dies geschah aus mehreren Gründen: Zum einen war es

nicht gelungen, das Transmembranprotein LRP4 biochemisch zu reinigen. Zum anderen sollte es mithilfe von Zellen möglich sein, eine größere Anzahl an LRP4 pro Oberflächeneinheit zu exprimieren und so die Dichte von LRP4 im Testverfahren deutlich zu steigern, was wiederum die Sensibilität des Verfahrens erhöhen sollte. Bereits in der Diagnostik von anti-AChR- und anti-MuSK-Antikörpern hatte sich gezeigt, dass zellbasierte Assays eine höhere Sensitivität besitzen.[12] Dies war notwendig, da die Titer von anti-LRP4 Antikörpern signifikant geringer zu erwarten waren, als die von anti-AChR Antikörpern.[2]

Der Vektor, welcher die cDNA für die Expression von LRP4 enthielt, konnte erfolgreich hergestellt werden. Anschließend erfolgte die Transfektion von HEK und HeLa Zellen mit diesem Vektor sowie der immunhistologische Nachweis, dass die Transfektion erfolgreich war und die transfizierten Zellen LRP4 exprimierten. Die Herstellung einer stabilen Zelllinie sollte in erster Linie ein konstantes, standardisiertes Testumfeld gewährleisten, da bei den transienten Transfektionen viele Variablen für unterschiedliche Bedingungen im Assay sorgen. Dies schien mit der Herstellung der stabilen Zelllinie erreicht werden zu können. Allerdings zeigte sich während der Durchführung der Experimente, dass die Zellen einem konstanten Selektionsdruck ausgesetzt sein müssen, um die Vektor-DNA weiterhin zu exprimieren. Am Ende der Experimente zeigten sich in den Kontrollen des ELISA immer wieder ähnliche Extinktionen wie in den nicht transfizierten Kontrollen, sodass darauf geschlossen werden konnte, dass die Zelllinie aufhörte, LRP4 zu exprimieren.

Eine weitere Schwierigkeit des Testverfahrens mit einem Zell-basiertem ELISA war die starke unspezifische Reaktion der Seren auf die HeLa Zellen. Auch die Seren der gesunden Probanden zeigten eine starke Reaktivität sowohl auf transfizierte als auch auf nicht transfizierte HeLa Zellen. Trotz Subtraktion der beiden Extinktionen konnte nach Anwendung der vierfachen Standardabweichung kein Serum als positiv auf das Vorliegen von LRP4-Antikörpern identifiziert werden. Die Frage bleibt, ob durch die große Reaktivität von menschlichen Seren auf HeLa Zellen die Sensibilität des Verfahrens herabgesetzt war und deshalb Patientenserum, die einen geringen Titer an LRP4-Antikörpern gehabt hätten, nicht entdeckt werden konnten. Die Vermutung, dass einige der getesteten Seren positiv reagieren würden, entstand aufgrund der Tatsache, dass in der Arbeitsgruppe zuvor einige der in dieser Arbeit untersuchten Seren immunhistologisch positiv auf das Vorliegen von LRP4-Antikörpern getestet wurden. [3]. Aufbauend auf den immunhistochemischen Methoden in *Pevzner et al* sollte mithilfe des

ELISAs nicht nur eine schnelle Methode zum Testen auf das Vorliegen von Antikörpern gegen LRP4 geschaffen werden, sondern zusätzlich auch eine Bestimmung des genauen Titers erfolgen. Da in der vorliegenden Arbeit allerdings keine positiven Seren gefunden werden konnten, blieb letzterer Schritt aus.

6.3 Die Rolle von LRP4 in anderen Organen

LRP4 spielt nach neueren Erkenntnissen auch eine entscheidende Rolle in der Knochen- und Nierenentwicklung. LRP4-defiziente Mäuse zeigen Polysyndaktylie. Hier kommt es zur Fusion, zur Fehlbildung oder zur Duplikation von Fingern und/oder Zehen. In Patienten mit Cenani-Lenz Syndrom konnten Mutationen in den für LRP4 kodierenden Gensequenzen gefunden werden. Patienten mit Cenani-Lenz Syndrom leiden unter Syndaktilie, Polydaktylie von Fingern und Zehen, zeigen abnormale knöcherne Gesichtsstrukturen sowie eine Nierenhypoplasie bis hin zur –agenesie.[50-52] Darüber hinaus zeigen sich Mutationen der für LRP4 kodierenden Gensequenzen in Patienten mit Osteosklerose.[53] Bei Patienten mit Osteosklerose kommt es zu einer Verdickung des Knochengewebes vor allem an Schädel, Rippen, Claviculae sowie zum vermehrten Längenwachstum der Knochen und teilweise auch zur Syndaktylie. In einer Arbeit von *Chang et al.* wurde LRP4 in Osteoblasten und Osteozyten eliminiert. Die Folge war einer Hyperostose aller Skelettknochen, was nahelegt, dass LRP4 eine wichtige Rolle bei der Bildung und Funktionserhaltung von Osteoblasten spielt.[54] Da es sich hier allerdings um Mutationen im LRP4-Gen handelt ist zu hinterfragen inwieweit LRP4-Antikörper, die sich meist erst viele Jahre nach Abschluss der Organentwicklung bilden, pathophysiologisch eine Rolle spielen könnten. Zum Beispiel wäre denkbar, dass LRP4-Antikörper auch nach reifer Ausbildung beider Organe die Aufrechterhaltung von Nieren- und Knochenfunktion beeinflussen könnten, ähnlich wie sich bereits in Studien zur neuromuskulären Endplatte gezeigt hat, wo LRP4 nicht nur eine entscheidende Rolle in der Bildung, sondern auch in der Aufrechterhaltung der synaptischen Spezialisierungen spielt.

An der neuromuskulären Endplatte ist vor allem die extrazelluläre Domäne von LRP4 wichtig, denn diese interagiert mit Agrin und aktiviert die MuSK (siehe Abb.1)[29]. Bisher ist allerdings nur wenig bekannt über die Funktion der intrazellulären bzw. transmembranen Domäne in Bezug auf die Funktion an der neuromuskulären Endplatte. In der Knochenentwicklung konnte hingegen gezeigt werden, dass Mäuse, die keine

intrazelluläre Domäne aufwiesen, unter einer Fehlentwicklung der Extremitäten litten. [29, 55] Interessanterweise konnten keine neuromuskulären Dysfunktionen in Patienten gefunden werden, welche LRP4-Mutationen assoziierte Knochenerkrankungen zeigten. Hingegen treten Knochen- und Nierenfehlerentwicklungen oft in den gleichen Patienten auf. [50, 56] Da LRP4 auch in anderen Organen eine entscheidende Rolle zur Funktionalität spielt und Mutationen im LRP4-Gen klinische Auswirkungen haben, könnte es interessant sein, Patienten mit LRP4-Antikörpern auf mögliche Auswirkungen in der Integrität von Knochen und Nieren zu untersuchen.

6.4 Ausblick

LRP4 ist essentiell während der Bildung und Funktionserhaltung der neuromuskulären Endplatte. In diversen Arbeiten konnte die pathogene Rolle von Antikörpern gegen LRP4 vor allem bei der MG gezeigt werden. Hierdurch kann die Diagnose der Erkrankung erheblich verbessert werden. Eine Routinediagnostik der LRP4-Antikörper sollte das Ziel für den klinischen Alltag werden. Weiterhin könnte durch genaue Untersuchung von klinischer Ausprägung, Epidemiologie und Ansprechen auf medikamentöse Therapien die Behandlung der Patienten verbessert werden, der klinische Verlauf besser antizipiert und die Therapie so spezialisiert und angepasst werden. Auch hier ist die weitere Erforschung möglicher Targets bei MG von großer Bedeutung. LRP4 war in ca. 20% der doppelt-seronegativen Patienten nachweisbar, in jüngsten Studien konnten Autoantikörper gegen Agrin bei doppelt-seronegativen Patienten nachgewiesen werden. [6, 45] Es bleiben trotz dessen viele Patienten, bei denen weiterhin keine Antikörper identifiziert werden konnten. Um eine noch detailliertere Vorstellung zu bekommen, wie genau LRP4 sich in zellulären Signalkaskaden verhält braucht es weitere Untersuchungen. Hierdurch könnte die Funktion und damit die Pathogenität von Defekten und Antikörpern in diesem wichtigen Protein genauer verstanden werden, was langfristig zu verbesserter Diagnostik und vor allem zu spezifischen Behandlungsansätzen für Patienten führen kann.

7 Literatur

1. Zhang, B., et al., *Autoantibodies to lipoprotein-related protein 4 in patients with double-seronegative myasthenia gravis*. Arch Neurol, 2012. **69**(4): p. 445-51.
2. Higuchi, O., et al., *Autoantibodies to low-density lipoprotein receptor-related protein 4 in myasthenia gravis*. Ann Neurol, 2011. **69**(2): p. 418-22.
3. Pevzner, A., et al., *Anti-LRP4 autoantibodies in AChR- and MuSK-antibody-negative myasthenia gravis*. J Neurol, 2012. **259**(3): p. 427-35.
4. Berrih-Aknin, S. and R. Le Panse, *Myasthenia gravis: A comprehensive review of immune dysregulation and etiological mechanisms*. J Autoimmun, 2014. **52C**: p. 90-100.
5. Carr, A.S., et al., *A systematic review of population based epidemiological studies in Myasthenia Gravis*. BMC Neurol, 2010. **10**: p. 46.
6. Gasperi, C., et al., *Anti-agrin autoantibodies in myasthenia gravis*. Neurology, 2014. **82**(22): p. 1976-83.
7. Jaretzki, A., 3rd, et al., *Myasthenia gravis: recommendations for clinical research standards. Task Force of the Medical Scientific Advisory Board of the Myasthenia Gravis Foundation of America*. Ann Thorac Surg, 2000. **70**(1): p. 327-34.
8. Osserman, K.E. and G. Genkins, *Studies in myasthenia gravis: review of a twenty-year experience in over 1200 patients*. Mt Sinai J Med, 1971. **38**(6): p. 497-537.
9. Karl F. Masuhr, F.M., Marianne Neumann, *Duale Reihe Neurologie*. Vol. Auflage: 7. (23. Oktober 2013). 2013: Thieme.
10. Jacob, S., et al., *Presence and pathogenic relevance of antibodies to clustered acetylcholine receptor in ocular and generalized myasthenia gravis*. Arch Neurol, 2012. **69**(8): p. 994-1001.
11. Yang, L., et al., *Non-radioactive serological diagnosis of myasthenia gravis and clinical features of patients from Tianjin, China*. J Neurol Sci, 2011. **301**(1-2): p. 71-6.
12. Gilhus, N.E. and J.J. Verschuuren, *Myasthenia gravis: subgroup classification and therapeutic strategies*. Lancet Neurol, 2015. **14**(10): p. 1023-36.
13. Meyer, D.M., et al., *Comparative clinical outcomes of thymectomy for myasthenia gravis performed by extended transsternal and minimally invasive approaches*. Ann Thorac Surg, 2009. **87**(2): p. 385-90; discussion 390-1.
14. Cea, G., et al., *Thymectomy for non-thymomatous myasthenia gravis*. Cochrane Database Syst Rev, 2013(10): p. CD008111.
15. Barth, D., et al., *Comparison of IVIg and PLEX in patients with myasthenia gravis*. Neurology, 2011. **76**(23): p. 2017-23.
16. Barnett, C., et al., *Changes in quality of life scores with intravenous immunoglobulin or plasmapheresis in patients with myasthenia gravis*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2013. **84**(1): p. 94-7.
17. Andreas Hufschmidt, C.H.L.u.S.R., *Neurologie compact Für Klinik und Praxis*. Vol. 6. 2013: Georg Thieme Verlag
Stuttgart • New York
18. Evoli, A. and L. Padua, *Diagnosis and therapy of myasthenia gravis with antibodies to muscle-specific kinase*. Autoimmun Rev, 2013. **12**(9): p. 931-5.

19. Lindstrom, J.M., et al., *Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis. Prevalence, clinical correlates, and diagnostic value.* Neurology, 1976. **26**(11): p. 1054-9.
20. Vincent, A. and J. Newsom-Davis, *Acetylcholine receptor antibody as a diagnostic test for myasthenia gravis: results in 153 validated cases and 2967 diagnostic assays.* J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1985. **48**(12): p. 1246-52.
21. Rodriguez Cruz, P.M., et al., *Clinical Features and Diagnostic Usefulness of Antibodies to Clustered Acetylcholine Receptors in the Diagnosis of Seronegative Myasthenia Gravis.* JAMA Neurol, 2015. **72**(6): p. 642-9.
22. Green, D.P., R. Miledi, and A. Vincent, *Neuromuscular transmission after immunization against acetylcholine receptors.* Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1975. **189**(1094): p. 57-68.
23. Kao, I. and D.B. Drachman, *Myasthenic immunoglobulin accelerates acetylcholine receptor degradation.* Science, 1977. **196**(4289): p. 527-9.
24. Tuzun, E. and P. Christadoss, *Complement associated pathogenic mechanisms in myasthenia gravis.* Autoimmun Rev, 2013. **12**(9): p. 904-11.
25. Lambert, E.H., J.M. Lindstrom, and V.A. Lennon, *End-plate potentials in experimental autoimmune myasthenia gravis in rats.* Ann N Y Acad Sci, 1976. **274**: p. 300-18.
26. Hoch, W., et al., *Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies.* Nat Med, 2001. **7**(3): p. 365-8.
27. May, P., et al., *The LDL receptor-related protein (LRP) family: an old family of proteins with new physiological functions.* Ann Med, 2007. **39**(3): p. 219-28.
28. Shen, C., W.C. Xiong, and L. Mei, *LRP4 in neuromuscular junction and bone development and diseases.* Bone, 2015.
29. Weatherbee, S.D., K.V. Anderson, and L.A. Niswander, *LDL-receptor-related protein 4 is crucial for formation of the neuromuscular junction.* Development, 2006. **133**(24): p. 4993-5000.
30. Nitkin, R.M., et al., *Identification of agrin, a synaptic organizing protein from Torpedo electric organ.* J Cell Biol, 1987. **105**(6 Pt 1): p. 2471-8.
31. Lin, W., et al., *Distinct roles of nerve and muscle in postsynaptic differentiation of the neuromuscular synapse.* Nature, 2001. **410**(6832): p. 1057-64.
32. Yang, X., et al., *Patterning of muscle acetylcholine receptor gene expression in the absence of motor innervation.* Neuron, 2001. **30**(2): p. 399-410.
33. DeChiara, T.M., et al., *The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo.* Cell, 1996. **85**(4): p. 501-12.
34. Selcen, D., et al., *Impaired Synaptic Development, Maintenance, and Neuromuscular Transmission in LRP4-Related Myasthenia.* JAMA Neurol, 2015. **72**(8): p. 889-96.
35. Barik, A., et al., *LRP4 is critical for neuromuscular junction maintenance.* J Neurosci, 2014. **34**(42): p. 13892-905.
36. Mori, S., et al., *Immunization of mice with LRP4 induces myasthenia similar to MuSK-associated myasthenia gravis.* Exp Neurol, 2017. **297**: p. 158-167.
37. Ulusoy, C., et al., *Immunization with Recombinantly Expressed LRP4 Induces Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis in C57BL/6 Mice.* Immunol Invest, 2017. **46**(5): p. 490-499.
38. Gautam, M., et al., *Defective neuromuscular synaptogenesis in agrin-deficient mutant mice.* Cell, 1996. **85**(4): p. 525-35.
39. Gautam, M., et al., *Distinct phenotypes of mutant mice lacking agrin, MuSK, or rapsyn.* Brain Res Dev Brain Res, 1999. **114**(2): p. 171-8.

40. Zhang, B., et al., *LRP4 serves as a coreceptor of agrin*. *Neuron*, 2008. **60**(2): p. 285-97.
41. Kim, N., et al., *Lrp4 is a receptor for Agrin and forms a complex with MuSK*. *Cell*, 2008. **135**(2): p. 334-42.
42. Zhang, W., et al., *Agrin binds to the N-terminal region of Lrp4 protein and stimulates association between Lrp4 and the first immunoglobulin-like domain in muscle-specific kinase (MuSK)*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(47): p. 40624-30.
43. Barik, A., et al., *Crosstalk between Agrin and Wnt signaling pathways in development of vertebrate neuromuscular junction*. *Dev Neurobiol*, 2014. **74**(8): p. 828-38.
44. Masters, J.R., *HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(4): p. 315-9.
45. Zisimopoulou, P., et al., *A comprehensive analysis of the epidemiology and clinical characteristics of anti-LRP4 in myasthenia gravis*. *J Autoimmun*, 2014. **52**: p. 139-45.
46. Meriglioli, M.N. and D.B. Sanders, *Muscle autoantibodies in myasthenia gravis: beyond diagnosis?* *Expert Rev Clin Immunol*, 2012. **8**(5): p. 427-38.
47. Li, Y., et al., *Anti-LRP4 autoantibodies in Chinese patients with myasthenia gravis*. *Muscle Nerve*, 2017. **56**(5): p. 938-942.
48. Jarius, S., et al., *Neuromyelitis optica spectrum disorders in patients with myasthenia gravis: ten new aquaporin-4 antibody positive cases and a review of the literature*. *Mult Scler*, 2012. **18**(8): p. 1135-43.
49. Vaknin-Dembinsky, A., et al., *Myasthenia gravis-associated neuromyelitis optica-like disease: an immunological link between the central nervous system and muscle?* *Arch Neurol*, 2011. **68**(12): p. 1557-61.
50. Li, Y., et al., *LRP4 mutations alter Wnt/beta-catenin signaling and cause limb and kidney malformations in Cenani-Lenz syndrome*. *Am J Hum Genet*, 2010. **86**(5): p. 696-706.
51. Karner, C.M., et al., *Lrp4 regulates initiation of ureteric budding and is crucial for kidney formation--a mouse model for Cenani-Lenz syndrome*. *PLoS One*, 2010. **5**(4): p. e10418.
52. Lindy, A.S., et al., *Truncating mutations in LRP4 lead to a prenatal lethal form of Cenani-Lenz syndrome*. *Am J Med Genet A*, 2014. **164A**(9): p. 2391-7.
53. Leupin, O., et al., *Bone overgrowth-associated mutations in the LRP4 gene impair sclerostin facilitator function*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(22): p. 19489-500.
54. Chang, M.K., et al., *Disruption of Lrp4 function by genetic deletion or pharmacological blockade increases bone mass and serum sclerostin levels*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(48): p. E5187-95.
55. Johnson, E.B., R.E. Hammer, and J. Herz, *Abnormal development of the apical ectodermal ridge and polysyndactyly in Megf7-deficient mice*. *Hum Mol Genet*, 2005. **14**(22): p. 3523-38.
56. Khan, T.N., et al., *Cenani-Lenz syndrome restricted to limb and kidney anomalies associated with a novel LRP4 missense mutation*. *Eur J Med Genet*, 2013. **56**(7): p. 371-4.

8 Danksagung

Ich möchte meinem Betreuer Professor Dr. Stephan Kröger für die Möglichkeit dieser interessanten Dissertation und für seine wertvolle und lehrreiche Unterstützung während meiner Arbeit danken.

Außerdem danke ich herzlichst allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Kröger, Dr. Christiane Gasperi, Dr. Andromachi Karakatsani, Katja Peters, Anna Schick und Dr. Yina Zhang, die als Berater und Freunde immer für mich da waren.

Ich danke Professor Dr. Arthur Melms, Professor Dr. Berthold Schalke und Professor Dr. Benedikt Schoser für die Bereitstellung der Patientenseren und die gute Zusammenarbeit sowie den Patienten, die bereit waren, als Probanden für wissenschaftliche Arbeiten wie diese zur Verfügung zu stehen.

Ich danke meinen Eltern Jutta und Karl-Günter, meinen Großeltern Hildegard und Adelbert, meiner Patentante Melanie und meinen Freunden für ihre uneingeschränkte Unterstützung und ihre Ruhe, Geduld und Ausdauer, mit der sie mir zur Seite standen. Diese Arbeit wäre ohne euch nicht möglich gewesen.

9 Appendix

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Klinische Klassifikation der Myasthenia gravis (modifizierte MGFA Klassifikation 2000) .. 10

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Agrin-LRP4-MuSK Komplex</i>	<i>15</i>
<i>Abbildung 2: pcDNA 3.....</i>	<i>18</i>
<i>Abbildung 3: Aufteilung einer 96-Well ELISA Platte für den Nachweis von LRP4-Antikörpern.....</i>	<i>25</i>
<i>Abbildung 4: Restriktionsverdau des Vektors huLRP4voll in pcDNA3 mit ApaLI.....</i>	<i>27</i>
<i>Abbildung 5: Vektorkarte huLRP4voll in pcDNA3</i>	<i>28</i>
<i>Abbildung 6 Färbung von mit huLRP4voll in pcDNA3 transfizierten HeLa Zellen.....</i>	<i>29</i>
<i>Abbildung 7: Western Blot von Zellklonen der unterschiedlichen stabil transfizierten Zelllinien.....</i>	<i>30</i>
<i>Abbildung 8: Färbung von Zellen der stabilen Zelllinie HeLa 6g.....</i>	<i>31</i>
<i>Abbildung 9 ELISAs für LRP4-Antikörper.....</i>	<i>32</i>