

**Autoantikörper und deren pathogene Effekte
auf sympathische Nervenzellen beim „Komplexen
Regionalen Schmerzsyndrom“**

INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Oliver Matz

aus Herborn

Gießen, 2008

Aus dem Medizinischen Zentrum für Neurologie und Neurochirurgie
Klinik für Neurologie
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Leiter: Prof. Dr. med. M. Kaps

1. Gutachter: PD Dr. Blaes
2. Gutachter: Prof. Dr. Berliner

Tag der Disputation: 06.02.2009

Für meine Großmutter Anni

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

Summary

1.	Einleitung	1
1.1.	Autoimmunität	1
1.2.	Das komplexe regionale Schmerzsyndrom	4
1.3.	Klinik des CRPS	5
1.4.	Pathophysiologie des CRPS	9
1.5.	Fragestellung	14
2.	Material und Methoden	16
2.1.	Patienten	16
2.2.	Zellkultur	17
2.3.	Präparation der sympathischen Nervenzellen	17
2.4.	Isolierung der IgG-Fractionen aus dem Serum	18
2.5.	Durchflusszytometrie zur Diagnostik von Oberflächenautoantikörpern	18
2.6.	Immunologische Funktionsassays	20
2.6.1.	Zytotoxizitätsassay	20
2.6.2.	Apoptoseassay	22
2.6.3.	Expressionsänderungen im MAPKinase-Pathway (phospho-ERK-1/2, phospho -p38)	23
2.7.	Parvovirus-B19-IgG-ELISA	24
2.8.	Antiendotheliale Autoantikörper	25
2.9.	Statistik	26
3.	Resultate	27
3.1.	Nachweis von Autoantikörpern gegen Oberflächenepitope	27
3.2.	Immunologische Funktionsassays	31
3.2.1.	Zytotoxizitätsassay	31
3.2.2.	Apoptoseassay	32
3.2.3.	Aktivierung des MAPKinaseweges	33

3.2.3.1. Expressionsänderung von phosphoryliertem ERK-1/2	34
3.2.3.2. Expressionsänderung von phosphoryliertem p38	34
3.3. Parvovirus-B19-IgG-ELISA	36
3.4. Antiendotheliale Autoantikörper	38
4. Diskussion	39
4.1. Relevante Mechanismen in der Pathophysiologie des CRPS	39
4.2. Autoantikörper gegen das autonome Nervensystem	40
4.3. Zytotoxische und Apoptose-induzierende Effekte von Autoantikörpern	43
4.4. Effekte von Autoantikörpern auf zellbiologische Funktionen	46
4.5. Die Rolle von Viren in der Pathogenese des CRPS	49
5. Literaturverzeichnis	53
6. Anhang	65

Zusammenfassung

Einleitung: Das „Komplexe regionale Schmerzsyndrom“ (englisch: Complex Regional Pain Syndrom - CRPS) ist eine Schmerzerkrankung, die sich auch in autonomen und sensomotorischen Funktionsstörungen äußert. Auslöser sind meist geringgradige Traumen oder kleinere Operationen, wobei die Ausprägung der Symptome nicht im Verhältnis zu der Schwere der schädigenden Ursache steht. Die Ätiologie des Syndroms ist bisher nur teilweise geklärt. Diskutiert werden einerseits eine Dysfunktion des sympathischen Nervensystems und andererseits eine neurogene Entzündungsreaktion. In den letzten Jahren wurde auch die Beteiligung des Immunsystems bei der Pathogenese des CRPS diskutiert.

Zum einen könnten postinfektiöse autoimmunologische Prozesse eine Rolle in der Ätiologie des CRPS spielen. Dabei wurde im Rahmen einer Studie eine erhöhte Seroprävalenz für Parvovirus B19 bei CRPS-Patienten beschrieben. Zum anderen konnten bei CRPS-Patienten Autoantikörper gegen intrazelluläre Epitope autonomer Neurone nachgewiesen werden. Die Bedeutung der gegen intrazelluläre Antigene gerichteten Antikörper liegt jedoch hauptsächlich in der Diagnostik, eine pathogenetische Relevanz ist meist nicht bewiesen. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob Autoantikörper gegen Oberflächenstrukturen von sympathischen Nervenzellen im Serum von CRPS-Patienten nachweisbar sind. Ferner soll die pathogenetische Relevanz der Autoantikörper untersucht werden. Desweiteren stellt sich dies Frage, ob CRPS-Patienten eine erhöhte Seroprävalenz für Parvovirus B19 haben und ob diese mit dem Auftreten antiendothelialer Autoantikörpern bei CRPS-Patienten assoziiert ist.

Methoden: Zur Diagnostik der Oberflächenautoantikörper diente die Durchflusszytometrie. Die Untersuchung möglicher zytotoxischer oder apoptotischer Effekte der Antikörper wurde mikroskopisch durchgeführt. Bei den dabei durchgeführten Anfärbungen der Zellen wurden Trypan-Blau und DAPI als Farbstoffe verwendet. Antikörperinduzierte Zellfunktionsstörungen wurden durch die Bestimmung der Phosphorylierung der MAPKinasen ERK-1/2 (Differenzierung) sowie p38 (Apoptose) überprüft. Der Nachweis von Parvovirus-B19-IgG sowie von den antiendothelialen Autoantikörpern erfolgte mittels ELISA.

Resultate: Bei 12 von 40 CRPS-Patienten konnten spezifische Antikörper gegen Oberflächenstrukturen von sympathischen Nervenzellen nachgewiesen werden. In den Kontrollgruppen hingegen wurden bei keinem der 30 gesunden Probanden und lediglich bei 2 von 20 Probanden mit einer nicht CRPS-assoziierten Nervenläsion die oben erwähnten Antikörper nachgewiesen ($p < 0.01$). Bei der nichtneuronalen Kontrollzelllinie HEK 293 (Nierenfibroblasten) konnten keine spezifischen Bindungen der Antikörper in Seren von CRPS-Patienten nachgewiesen werden. In den Apoptose- bzw. Zytotoxizitätsassays zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den CRPS-Patienten und der Kontrollgruppe. Auf eine signifikante Phosphorylierung von p38 und ERK-1/2 durch CRPS-IgG konnte ebenfalls kein Hinweis gefunden werden. Jedoch zeigten die CRPS-Patienten (71.7%) im Vergleich zur Kontrollgruppe (40.0%) eine höhere Seroprävalenz für Parvovirus B19 ($p < 0.01$). Dabei fiel auf, dass alle CRPS-Typ-2-Patienten seropositiv für Parvovirus B19 waren. Hinsichtlich antiendothelialer Autoantikörper wurde kein signifikanter Unterschied zwischen CRPS-Patienten und Kontrollgruppe nachgewiesen.

Diskussion: Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Fragestellung, ob autoimmunologische Prozesse an der Pathogenese des CRPS beteiligt sind. Es konnte nachgewiesen werden, dass CRPS-Patienten spezifische Autoantikörper gegen Strukturen sympathischer Nervenzellen besitzen, jedoch keine spezifischen Antikörper gegen die nichtneuronale Zelllinie HEK 293. Hinsichtlich einer möglichen Pathogenität der Autoantikörper konnten weder zytotoxische Effekte noch eine Beeinflussung des MAPKinase-Pathway nachgewiesen werden. Dies allerdings schließt funktionelle Effekte ähnlich wie bei anderen Antikörper-medierten neuroimmunologischen Erkrankungen (z.B. Myasthenia gravis) nicht aus. In Zukunft sollte die Identifikation von möglichen Oberflächenantigenen sowie die Überprüfung ihrer funktionellen Relevanz Gegenstand der Forschung sein.

Die erhöhte Seroprävalenz bei CRPS-Patienten für Parvovirus B19 konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Dieser Zusammenhang wurde bereits in einer früheren Studie beschrieben, allerdings im Vergleich zu einem historischen Kontrollkollektiv.

Sowohl die nachgewiesenen Autoantikörper, als auch die erhöhte Seroprävalenz für Parvovirus B19 stützen die Hypothese, dass postinfektiöse autoimmunologische Prozesse bei einem Teil der Patienten an der Pathogenese des CRPS beteiligt sind.

Summary

Introduction: Complex Regional Pain Syndrome (CRPS) causes pain as well as autonomic and sensorimotor dysfunction. Usually it develops in the distal extremities after minimal trauma or surgical intervention. The severity of symptoms is disproportionate to the causative event. Though the syndrome was first described in the 19th century its etiology remains unclear. Studies on the pathophysiology of CRPS revealed that there are two major mechanisms responsible for the clinical signs of acute CRPS: Exaggerated inflammation after trauma, in particular the neurogenic inflammatory component, and dysfunction of the sympathetic nervous system. In recent years, an involvement of the immune system has been discussed.

On the one hand, it has been hypothesized that some cases of CRPS might have a postinfectious autoimmune etiology. Thus in one study it was found a significantly higher seroprevalence of Parvovirus B19 in CRPS patients.

On the other hand, autoantibodies against autonomic nervous system structures in some patients with CRPS were described. These autoantibodies were directed against intracellular antigens of sympathetic ganglia neurons. The role of this particular type of autoantibodies is still discussed controversially. They are generally considered to have diagnostic relevance; their pathogenetic significance, however, has not been verified. In the current study, therefore, the presence of autoantibodies against surface epitopes was determined in serum samples from CRPS patients. In addition, effects of IgG from CRPS patients on sympathetic neurons were analyzed. Moreover the prevalence of parvovirus B19 IgG and antiendothelial autoantibodies (AECA) in the sera of CRPS patients was investigated.

Methods: Antibodies against surface epitopes of autonomic neurons were detected by using flow cytometry. For the investigation of cytotoxic and apoptotic effects of IgG fractions, microscopy was used. Sympathetic neurons were counterstained with DAPI and Trypan blue. To detect antibody-mediated effects on neuronal cells, we measured the expression of immunological and neuronal-specific proteins and phosphorylation of the MAP kinases ERK-1/2 and p38 using flow cytometry. Parvovirus B19 IgG and the presence of antiendothelial autoantibodies were determined with ELISA techniques.

Results: Autoantibodies against sympathetic neurons could be detected in 12 of 40 CRPS patients, but only in 2 of 20 trauma patients without CRPS and none of the controls ($p < 0.01$). The surface binding was restricted to sympathetic neurons and could not be observed in the non-neuronal control cell line HEK 293. The investigation of cytotoxic and apoptotic effects showed no significant difference between CRPS patients and healthy controls. Incubation of sympathetic neurons with IgG fractions from CRPS patients did not induce activation of p38 and ERK-1/2. However, CRPS patients (71.7%) showed a higher seroprevalence of parvovirus B19 IgG than controls (40%, $p < 0.01$). All CRPS-2 patients were positive. AECA were not associated with parvovirus B19 seropositivity.

Conclusion: The purpose of the present study was to investigate whether the pathogenesis of Complex Regional Pain Syndrome is associated with autoimmunity against the autonomic nerve system. CRPS patients were shown to have autoantibodies specifically directed against surface antigens of differentiated sympathetic neurons, but not against the non-neuronal control cell line HEK 293. Although functions of the autoantibodies were not identified, the results provide strong evidence that autoimmunity against the autonomic nervous system may be involved in the pathogenesis of CRPS. Future investigations should include identification of possible autoantigens and functional characterization of the autoantibodies.

In addition, an elevated seroprevalence of parvovirus B19 IgG was found in CRPS patients. The results implicate that some cases of CRPS might have a postinfectious autoimmune etiology.

1. Einleitung

1.1. Autoimmunität

Das Immunsystem des menschlichen Körpers schützt diesen mit Hilfe von Abwehrmechanismen vor potentiellen Krankheitserregern. Prinzipiell lassen sich hierbei zwei Formen der Immunität unterscheiden: Zum einen die angeborene Immunität, zum anderen die adaptive Immunität. Unter der angeborenen Immunität versteht man unspezifische Abwehrmechanismen, entweder zellulär (Phagozyten) oder humoral vermittelt (Komplementsystem), die in den ersten Tagen nach Eindringen eines Erregers diesen bekämpfen. Die adaptive Immunität hingegen reagiert spezifisch auf Erreger, indem z.B. durch zelluläre oder humorale Mechanismen eine angepasste Erregerabwehr stattfindet. Die Basis der spezifischen Immunabwehr bilden B-Lymphozyten und T-Lymphozyten. B-Lymphozyten sind für die Produktion von Antikörpern verantwortlich und stehen somit im Zentrum der humoralen Immunantwort. T-Lymphozyten hingegen spielen vor allem bei der zellvermittelten Immunantwort eine zentrale Rolle.

Nach der Aktivierung von adaptiven Immunabwehrmechanismen besteht die Gefahr, dass unreife Lymphozyten nicht entsprechend ihrer eigentlichen Funktion körperfremde Strukturen angreifen, sondern auch auf körpereigene Strukturen reagieren und somit autoreaktiv tätig sind. Während des Reifungsprozesses der B-Lymphozyten im Knochenmark bzw. der T-Lymphozyten im Thymus werden solche autoreaktiven Immunzellen gewöhnlich vernichtet oder dauerhaft inaktiviert; hierbei spricht man von einer natürlichen Selbst-Toleranz gegen körpereigenes Gewebe. Kommt es zum Ausfall dieser Selbst-Toleranz, resultiert daraus eine Immunantwort gegen körpereigenes Gewebe. Dabei sind die Komponenten des Immunsystems in der Regel nicht imstande, das körpereigene Antigen vollständig zu beseitigen. Die Folge ist eine chronische entzündliche Gewebeschädigung (Janeway et al. 2002).

In den letzten Jahren konnte bei verschiedenen Erkrankungen eine Autoimmunpathogenese als Entstehungsmechanismus nachgewiesen werden. Dabei unterscheidet man zwischen organspezifischen und systemischen Autoimmunkrankheiten. Beispiele für organspezifische Autoimmunkrankheiten sind

die Hashimoto-Thyreoditis und die Basedow-Krankheit der Schilddrüse sowie der insulinabhängige Diabetes mellitus Typ I, bei dem die Langerhans-Inseln des Pankreas betroffen sind. Systemisch verlaufende Autoimmunkrankheiten sind z.B. der systemische Lupus erythematodes (SLE) und die Sklerodermie, bei denen verschiedene Organsysteme befallen sind (Janeway et al. 2002).

Witebsky formulierte 1957 erstmals Kriterien zur Klassifikation und Einordnung von Autoimmunkrankheiten (Witebsky et al. 1957). 1993 modifizierten Rose und Bona die Kriterien (Rose & Bona et al. 1993). So gilt eine Erkrankung sicher als autoimmun, wenn Autoantikörper oder autoreaktive T-Zellen gegen ein definiertes Antigen im Blut der Patienten nachweisbar sind und die Erkrankung durch Übertragung von Autoantikörpern oder T-Lymphozyten im Tiermodell ausgelöst werden kann.

Bei der Genese einer Autoimmunkrankheit wird ein multifaktorielles Geschehen diskutiert. Grundsätzlich wird davon ausgegangen, dass bei der Entstehung zwei Voraussetzungen notwendig seien: einerseits eine genetische Komponente und andererseits Umwelteinflüsse, die sogenannten Realisationseinflüsse.

In Hinsicht auf die genetische Komponente spielt nach derzeitigem Kenntnisstand das HLA-System eine entscheidende Rolle. Bei einigen Autoimmunkrankheiten treten bestimmte HLA-Antigene gehäuft auf. So haben HLA-B27-Träger ein erhöhtes Risiko für bestimmte rheumatische Erkrankungen. Die Ursache für das erhöhte Risiko kann allerdings nur hypothetisch beantwortet werden. Man weiß, dass HLA-Moleküle zusammen mit dem T-Zell-Rezeptor eine zentrale Rolle in der Antigenerkennung spielen. In diesem Zusammenhang wird vermutet, bestimmte HLA-Allele seien mehr oder weniger geeignet, antigene Strukturen bzw. exogene Erreger und Noxen zu erkennen. Somit können HLA-Moleküle einerseits eine Schutzfunktion ausüben, andererseits aber auch für Erkrankungen disponieren (Classen et al. 2004).

Als letztendlich auslösende Faktoren einer Autoimmunreaktion werden die sogenannten Realisationseinflüsse bezeichnet.

Anhand der sogenannten „Molecular-Mimikry“-Hypothese lässt sich einer dieser Realisationsfaktoren erklären. Bei der erwähnten Hypothese wird davon ausgegangen, ein bestimmtes Antigen, z.B. ein Virus- oder Bakterienantigen, weise große Ähnlichkeit mit körpereigenen Strukturen auf. Im Sinne einer Kreuzreaktion richtet sich die Immunantwort dann auch gegen diese körpereigenen Strukturen. Das

klassische Modell der „Molecular-Mimicry“ wurde am Beispiel des rheumatischen Fiebers entwickelt. Nach einer Infektion der oberen Atemwege mit einer bestimmten Streptokokkenspezies kommt es zur Ausbildung von Antikörpern, die insbesondere mit Oberflächenantigenen des Endokards oder der Nierenglomerula kreuzreagieren (Cunningham et al. 2000, Classen et al. 2004).

Die autoimmunologische Reaktion des Körpers kann sich in einer Vielzahl von unterschiedlichen Mechanismen manifestieren. So kommt es bei vielen Autoimmunkrankheiten zur Bildung von Autoantikörpern. Beim Nachweis von Autoantikörpern muss jedoch differenziert werden, ob diese bei einer bestimmten Erkrankung lediglich ein diagnostisch nutzbares Begleitphänomen sind oder tatsächlich eine funktionelle Bedeutung haben. Funktionell wirksame Autoantikörper finden sich beispielsweise beim M. Basedow oder der Myasthenia gravis. Hierbei binden Autoantikörper an spezifische Rezeptoren und können so den Funktionsablauf der betroffenen Zelle auf verschiedenste Art und Weise stören. So führen bei der Myasthenia gravis Antikörper gegen den postsynaptischen Acetylcholin-Rezeptor zu einer Blockierung und Internalisierung des Rezeptors. Die Folge ist eine neuromuskuläre Übertragungsstörung, welche typischerweise im Tagesverlauf zu einer zunehmenden Muskelschwäche führt (De Baets et al. 2002). Ebenfalls pathophysiologisch relevant sind Autoantikörper gegen zelluläre Oberflächenmoleküle. Beispiele dafür sind die autoimmunhämolytische Anämie sowie der Morbus Werlhof, bei denen sich Antikörper gegen Oberflächenstrukturen von Erythrozyten bzw. Thrombozyten nachweisen lassen (Schroers et al. 2007, Schreiber et al. 1972, Sokol et al. 1984). Lediglich von diagnostischer Bedeutung sind z.B. antinukleäre Antikörper bei den Kollagenosen und Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis (Übersicht in Fritzler 1996).

Neben diesen beiden genannten Theorien und Mechanismen ist eine Vielzahl von weiteren Vorgängen bekannt, die eine autoimmunologische Reaktion auslösen bzw. unterhalten können. Keine dieser Theorien alleine kann bisher jedoch die meisten autoimmunen Vorgänge erklären.

1.2. Das Komplexe Regionale Schmerzsyndrom

Der Begriff „Komplexes Regionales Schmerzsyndrom“ (englisch: Complex Regional Pain Syndrom - CRPS), früher auch Morbus Sudeck, sympathische Reflexdystrophie oder Kausalgie genannt, beschreibt einen Symptomkomplex aus chronischen Schmerzen, autonomen, sensomotorischen und im weiteren Krankheitsverlauf auftretenden trophischen Störungen. Die Symptome sind vorwiegend an der distalen Extremität lokalisiert. Sie entwickeln sich typischerweise als Folge einer schmerzhaften Verletzung durch meist kleinere Traumen oder Operationen an Knochen, Weichteilen oder Nervengewebe. Dabei muss der Symptomkomplex sich nicht auf den Ort der primären Schädigung beschränken und auch nicht mit dem Ausmaß der Schädigung korrelieren (Köck et al 2003).

Erstmals beschrieben wurde das Syndrom 1864 von dem amerikanischen Arzt Weir Mitchell, der es bei Schussverletzten mit partieller Nervenläsion während des amerikanischen Bürgerkrieges beobachtete (Mitchell et al. 1865). Er beobachtete ausgeprägte Brennschmerzen in der betroffenen Extremität bei den Patienten und nannte daher das Krankheitsbild „Kausalgie“ (vom griechischen „Kausis“: brennen). Zu Beginn des 20. Jahrhunderts beschrieb der Hamburger Chirurg Paul Sudeck ähnliche Symptome bei Patienten mit vorausgegangenem Frakturen oder Weichteilverletzungen ohne Vorliegen einer Nervenläsion und prägte damit im deutschsprachigen Raum den Begriff des „Sudeck-Syndroms“ (Sudeck et al. 1902). Evans verwendete 1946 erstmals den Begriff „sympathische Reflexdystrophie“, nachdem er durch Sympathektomie eine erhebliche Schmerzreduktion bei Patienten beobachten konnte, und deshalb eine zentrale Rolle des sympathischen Nervensystems bei der Entstehung der Krankheit vermutete (Evans et al. 1946). Im Jahr 1994 einigte sich die „International Association for the Study of Pain“ vor dem Hintergrund neuer wissenschaftlicher Erkenntnisse schließlich auf den Begriff „Komplexes Regionales Schmerzsyndrom“ und formulierte auch dementsprechende Diagnosekriterien. Hierbei unterteilte man das CRPS in zwei verschiedene Typen: Der Typ I bezeichnet Patienten, die ein CRPS ohne eine Nervenläsion entwickeln und der Typ II, diejenigen mit einer traumatischen Nervenläsion (Brühl et al. 1999; Tabelle 1).

Der Häufigkeitsgipfel der Erkrankung liegt bei etwa 50 Jahren, wobei jedoch auch sehr selten Kinder und ältere Menschen am CRPS erkranken können. Frauen erleiden häufiger ein CRPS als Männer. Die obere Extremität ist doppelt so häufig betroffen wie die untere. Epidemiologische Studien konnten beim CRPS-Typ I eine Inzidenz von 0,5 pro 1000 Einwohner im Jahr ermitteln (Veldman et al. 1993).

Tabelle 1

Kriterien der komplexen regionalen Schmerzsyndrome (CRPS I und II) nach der IASP-Klassifikation chronischer Schmerzsyndrome aus dem Jahr 1994 (Brühl et al. 1999)

CRPS-Typ I	<ol style="list-style-type: none">1. Das CRPS-TYP I entwickelt sich nach einem initialen, schädigenden Ereignis.2. Der auftretende Spontanschmerz oder die Allodynie/Hyperalgesie ist nicht auf das Gebiet eines einzelnen peripheren Nervs begrenzt und nicht proportional zur Schwere der auslösenden Ereignisse.3. Seit dem schädigenden Ereignis war oder ist ein Ödem, eine gestörte Hautdurchblutung oder eine abnormale sudomotorische Aktivität in der vom Schmerz betroffenen distalen Extremitätenregion aufgetreten.4. Diese Diagnose kann beim Vorliegen anderer Erkrankungen/Umstände, die das Ausmaß des Schmerzes und der Funktionsbehinderung erklären, ausgeschlossen werden.
CRPS-Typ II	<ol style="list-style-type: none">1. Das CRPS-Typ II entwickelt sich nach einer peripheren Nervenverletzung.2. Der Spontanschmerz oder die Allodynie/Hyperalgesie sind nicht unbedingt nur auf das Versorgungsgebiet des betroffenen Nervs begrenzt.3. Entsprechend dem CRPS-Typ I4. Entsprechend dem CRPS-Typ I

1.3. Klinik des CRPS

Klassischerweise wird das klinische Bild von der Trias aus trophischer (autonomer), motorischer und sensibler Störungen bestimmt, welche meist mit mehrtägiger Latenz nach dem schädigenden Ereignis auftreten. Die Symptome breiten sich häufig generalisiert an der distalen Extremität aus.

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten einen dreiphasigen Verlauf der Erkrankung herausarbeiten (Veldman et al. 1993).

Das akute Stadium ist oft durch eine Steigerung der Stoffwechselfvorgänge in Weichteilen und Knochen gekennzeichnet. Klinisch kann eine livide Verfärbung der Haut mit teigigem Ödem und Funktionsbehinderung der Gelenke vorliegen. Leitsymptome sind der meist brennende und nicht unbedingt am Ort der primären Schädigung lokalisierte Spontanschmerz (Wasner et al 1998) sowie Störungen der Schweißproduktion und der Hautdurchblutung an der betroffenen Extremität. Zumeist ist auch eine Überwärmung der betroffenen Extremität festzustellen. Ferner gehören auch sensorische Störungen wie Hypalgesie und Hypästhesie zum klinischen Bild des CRPS. Durch mechanische und chemische Reize zu provozierende Schmerzen (Allodynie/Hyperalgesie) sind ebenfalls beschrieben (Sieweke et al. 1999; Birklein et al. 1997). Die Mitbeteiligung des motorischen Systems kann sich z.B. in einer Einschränkung der Feinmotorik, im Auftreten eines Tremors oder Paresen der distalen Extremität bemerkbar machen (Veldman et al. 1993).

Im weiteren Verlauf kann es zur Atrophie der Gewebe mit Entkalkung der betroffenen Knochenpartien und fibröser Verklebungen der Gelenke kommen. Klinisch liegt bei einem Teil der Patienten eine Atrophie der betroffenen Extremität mit trophischen Hautstörungen in Form von Veränderungen des Haar- und Nagelwachstums und Hyperkeratosen bzw. Fibrosierungen vor (Blumberg et al. 1988). An den Gelenken bestehen ausgeprägte Bewegungseinschränkungen, die bis zur Einsteifung der Gelenke führen können. Im Röntgenbild ist teilweise eine fleckige oder diffuse Knochenatrophie nachzuweisen (Niethard et al. 2005). Letztendlich kann sich eine generalisierte Atrophie der Haut, Subkutis, Muskulatur sowie des Skeletts entwickeln. Trotz Therapie kommt es oft zu einer Chronifizierung der Symptome, was die Lebensqualität der Patienten in einem erhöhten Maße einschränkt.



Abbildung 1
Patient mit einem CRPS der rechten Extremität nach Radiusfraktur.
In der akuten Phase der Erkrankung findet sich eine deutliche Schwellung und Überwärmung der Hand (Baron et al. 1999).

Allerdings besteht aber auch die seltene Möglichkeit einer spontanen Rückbildung aller Veränderungen. Die Schwere und der Verlauf der einzelnen Symptome sind insgesamt sehr variabel in ihrer Ausprägung.

Da das CRPS durch die IASP-Kriterien klinisch definiert ist und keine Untersuchung mit einer ausreichenden Sensitivität das CRPS beweist, gilt das Augenmerk in der Diagnostik des CRPS einer gründlichen Anamnese sowie einer sorgfältigen klinischen Untersuchung (Köck et al. 2003). Dabei steht die Untersuchung des Symptomtrias aus motorischen, sensorischen und trophischen Störungen im Vordergrund.

Es stehen jedoch eine Vielzahl von Untersuchungsmethoden, welche die Diagnose eines CRPS stützen bzw. mögliche Differentialdiagnosen ausschließen können, zur Verfügung.

Dazu gehört u.a. die Thermographie der Haut. Richtungsweisend ist dabei der Nachweis eines Temperaturunterschieds von mehr als 1,5-2°C im Vergleich zur gesunden Extremität, was bei ca. 84% der CRPS-Patienten der Fall ist (Hoerster et al. 1998). Eine andere Methode ist die Drei-Phasen-Skelettszintigraphie, bei der eine erhöhte Knochenresorption bei CRPS-Patienten festgestellt werden konnte (Kozin et al. 1981). Signifikante Veränderungen sind allerdings nur innerhalb des ersten Jahres in der akuten und subakuten Krankheitsphase zu erwarten. Während dieses Zeitraums hat jedoch eine pathologische Traceranreicherung in der späten Phase eine Spezifität und Sensitivität von etwa 80% für das CRPS (Zyluk et al. 1999). Ebenfalls von Relevanz ist die quantitative Sudometrie, die mit Hilfe einer quantitativen Feuchtigkeitsmessung erfolgt und mit deren Hilfe sich oftmals sowohl in der akuten als auch in der chronischen Phase der Erkrankung eine erhöhte Schweißproduktion nachweisen lässt (Birklein et al. 1999), sowie die Röntgendiagnostik, mit der schon Sudeck 1902 fleckige Knochenentkalkungen als charakteristisch für das Syndrom beschrieb (Sudeck et al. 1902).

Schließlich ist noch die Möglichkeit der diagnostischen Sympathikusblockaden zu erwähnen. Diese ist in Hinblick auf die Therapiekonzeption wichtig und wird genutzt, wenn klinisch nicht eindeutig unterschieden werden kann, ob die Symptomatik vom sympathischen System unterhalten wird oder davon unabhängig vorhanden ist (Treede et al. 1992).

Die Therapie des CRPS gestaltet sich als schwierig, da einerseits die Pathophysiologie nicht ausreichend verstanden ist und andererseits objektive Diagnosekriterien fehlen. Trotzdem existiert eine große Anzahl verschiedener Ansätze, die bei der Therapie des CRPS angewendet werden.

Vorrangiges Therapieziel ist die Wiederherstellung der vollen Funktion der betroffenen Extremität. Dieses Ziel kann nur erreicht werden, wenn nach der Diagnosestellung so schnell wie möglich die Therapie begonnen wird. Dabei sollten multimodale Behandlungskonzepte zum Einsatz kommen, welche so individuell wie möglich an das jeweilige Erkrankungsstadium angepasst sein sollten.

Im Rahmen der pharmakologischen Therapie kommen bei leichten bis moderaten Schmerzen nicht-steroidale Antiphlogistika sowie bei schweren Schmerzzuständen Opioide in Betracht (Maier et al. 1998). Darüberhinaus konnte die Wirksamkeit oraler Glukokortikoide belegt werden (Christensen et al. 1982). Eine weitere Therapieoption stellt die Gabe von Natrium-Kanal-Blockern wie Lidocain, Mexiletin oder Carbamazepin dar (Wallace et al. 2000). Auch konnte mit der intravenösen Gabe von Bisphosphonaten eine deutliche Reduktion der Schmerzen und des Ödems nachgewiesen werden (Varena et al. 2000).

Ebenfalls positive Effekte zeigte die Verabreichung von Kalzitonin (Gobelet et al. 1986, Gobelet et al. 1992), dem Radikalfänger N-Acetylcystein sowie Dimethylsulfoxid als lokale Therapie (Goris et al. 1987, Perez et al. 2003).

Können die Schmerzen medikamentös nicht ausreichend gelindert werden, sollte auch die Durchführung einer Sympathikusblockade in Betracht gezogen werden.

Bei dieser Therapieform wurde bei ca. 50-85% der CRPS-Patienten eine deutliche Schmerzreduktion beschrieben (Blumberg et al. 1992).

Als weitere Therapieoption stehen u.a. die Applikation von Opioiden im Bereich des Grenzstranges (Arias et al. 1990, Werner et al. 1999), der Einsatz von transkutaner elektrischer Nervenstimulation (TENS) sowie die epidurale Rückenmarksstimulation (Kemler et al. 2000) zur Verfügung.

Letztendlich sollte noch auf die Notwendigkeit einer konsequent durchgeführten Physio- und Ergotherapie hingewiesen werden, welche eine zwingende Voraussetzung für die Wiederherstellung der Funktion der betroffenen Extremität darstellt. Diese sollte jedoch erst nach Abklingen der Akutsymptomatik begonnen werden, wenn der Patient in Ruhe schmerzfrei ist (Sherry et al. 1999, Oerlemans et al. 1999).

1.4. Pathophysiologie des CRPS

Trotz zahlreicher Unklarheiten im Verständnis der Pathophysiologie des CRPS kristallisierten sich in Studien der vergangenen Jahre zwei wesentliche Mechanismen heraus, die für einen Großteil der klinischen Symptome verantwortlich gemacht werden. Das ist einerseits eine neurogene Entzündung, insbesondere während der Akutphase der Erkrankung, und andererseits eine Dysfunktion des sympathischen Nervensystems.

Das Komplexe Regionale Schmerzsyndrom zeigt eine Vielzahl neurologischer Symptome. Eine der für die Symptomatik verantwortlichen Ursachen liegt nach vorherrschender Auffassung in der Dysfunktion des sympathischen Nervensystems. Schon 1946 prägte Evans den Begriff der sympathischen Reflexdystrophie. Basierend auf der Beobachtung einer Schmerzreduktion bei CRPS-Patienten durch Sympathektomien, vermutete er eine entscheidende Rolle des sympathischen Nervensystems bei der Entstehung der Erkrankung (Evans et al. 1946). Mittlerweile konnte jedoch gezeigt werden, dass bei nicht allen CRPS-Patienten der Schmerz vom sympathischen Nervensystem unterhalten wird. Bei einem Teil der Patienten ist nach Sympathikusblockade keine Schmerzreduktion festzustellen. Daraus lässt sich folgern, dass bei dieser Gruppe andere pathophysiologischen Mechanismen für die Schmerzsymptomatik verantwortlich sind. Diese Erkenntnis spiegelt sich in der Tatsache wieder, dass für die Diagnosestellung der sympathisch unterhaltene Schmerz kein zwingendes Kriterium mehr ist (Stanton-Hicks et al. 1995).

Ca. 50-85% der CRPS-Patienten beschreiben jedoch eine Schmerzreduktion nach Sympathikusblockade. Dabei konnte ebenfalls ein Rückgang von Ödemen und eine Reduktion des Tremors beobachtet werden (Blumberg et al. 1992).

Auf die Mechanismen des sympathisch unterhaltenen Schmerzes geben verschiedene Tierexperimente Hinweise. So konnte nachgewiesen werden, dass nach partieller Nervenläsion noch intakte Hautafferenzen Katecholaminrezeptoren an ihrer Oberfläche exprimieren. Folglich entwickeln die Afferenzen eine Sensitivität für diesen Transmitter, die unter physiologischen Bedingungen nicht vorhanden wäre (Janig et al. 1996). Ferner konnte bei Ratten nach Verletzung des Nervus mentalis, ein Sprouting sympathischer Fasern in die oberste Schicht der Epidermis

nachgewiesen werden (Ruocco et al. 2000). Neben diesen Veränderungen in der Peripherie wurden auch im Bereich der Spinalganglien weitere pathologische Prozesse festgestellt. So ließen sich sympathisch-afferente Kopplungen zwischen postganglionären sympathischen Fasern und afferenten Neuronen nachweisen (MacLachlan et al. 1993). Doch nicht nur nach Nervenläsion ließen sich diese Veränderungen feststellen; auch nach thermisch oder chemisch ausgelösten entzündlichen Prozessen konnte eine verstärkte sympathisch-afferente Kopplung beobachtet werden (Levine et al. 1986).

Mit Hilfe dieser tierexperimentellen Erkenntnisse ließe sich auch die Schmerzsymptomatik beim CRPS-Patienten erklären: Durch Freisetzung von Noradrenalin aus den sympathischen Nervenendigungen kommt es zur verstärkten Erregung nozizeptiver Fasern. Diese sind nach einem auslösenden Ereignis durch den Neurotransmitter erregbar; der zugrunde liegende Mechanismus ist allerdings noch nicht geklärt. Diese nervale Stimulation nimmt der Patient schließlich als Schmerz wahr (Schattschneider et al. 2003). Untersuchungen am Menschen stützen diese Theorie: so konnte bei CRPS- Patienten vom Typ II eine Schmerzverstärkung nach intraoperativer Grenzstrangstimulation beobachtet werden (White et al. 1969). Desweiteren berichteten CRPS-Patienten von einer starken Schmerzzunahme infolge intradermaler Injektion von Noradrenalin in das betroffene Areal (Torebjork et al. 1995; Ali et al. 2000).

Im Rahmen einer aktuelleren Studie von Oaklander wurden Hinweise auf einen anderen Mechanismus gefunden. Zumindest bei CRPS-Patienten vom Typ I liegt vermutlich eine persistierende, minimale Degeneration kleiner, distal gelegener Axone sympathischer Neurone als Ursache bzw. Triggerfaktor für die sympathisch unterhaltenen Schmerzen vor (Oaklander et al. 2006).

Neben dem neuropathischen Schmerz sind weitere, autonome Störungen des CRPS auf eine Beteiligung des sympathischen Nervensystems zurückzuführen. In der Akutphase der Erkrankung lässt sich häufig eine regionale Übererwärmung der Haut bzw. eine Erweiterung der Hautgefäße sowie eine Hyperhidrose beobachten. In diesem Zusammenhang konnte man in der akuten Phase der Erkrankung zwei Prozesse nachweisen: Zum einen eine verminderte Aktivität der sympathischen Hautvasokonstriktorneuronen, zum anderen eine vermehrte Aktivierung

sympathischer Sudormotorneuronen (Wasner et al. 1999, Birklein et al. 1997). Mit einem Thermoanzug bekleidete CRPS-Patienten zeigten konstant höhere Messwerte für Hauttemperatur und Hautdurchblutung auf der betroffenen Körperseite, sowohl nach Kühlung als auch nach Erwärmung. Im weiteren Verlauf der Erkrankung fanden sich zusätzlich Hinweise für eine fortbestehende Inhibition der sympathischen Vasokonstriktorneuronen (Wasner et al. 2001). Schattschneider vermutete auf Grund dieser entgegengesetzt wirkenden Reaktionen der beiden sympathischen Systeme eine unilaterale Störung der zentralen Thermoregulation.

Hinsichtlich der Annahme einer neurogenen Entzündung postulierte schon Paul Sudeck 1902 eine lokale Entzündung als einen entscheidenden pathophysiologischen Mechanismus des CRPS, da die klinischen Symptome der Akutphase wie Schmerzen, Ödeme, eine erhöhte Hauttemperatur sowie eine veränderte Durchblutung dafür sprechen. Er vermutete beim Sudeck-Syndrom einen Prozess „mit einem hypothetischen entzündlichen Agens“ als Ursache (Sudeck et al. 1902). Die Ergebnisse mehrerer Studien unterstützen diesen Ansatz, wobei in den letzten Jahren auch grundsätzlich eine Mitbeteiligung des Immunsystems an der Pathogenese des CRPS diskutiert wurde.

In einer prospektiven Studie von 1993 der Arbeitsgruppe Veldman wurden 829 CRPS-Patienten des Typ I auf klinische Symptome hin untersucht, die als frühe klinische Anzeichen eines lokalen entzündlichen Prozesses gewertet wurden.

Tabelle 2

Klinische Symptomatik an von CRPS Typ I betroffenen Extremitäten innerhalb der ersten 2 Monate nach Auftreten der Erkrankung (Veldman et al. 1993).

Entzündungssymptomatik	(%)	Neurologische Symptomatik	(%)
Unterschiedliche Hauttemperatur	98	Paresen	98
Eingeschränkte Beweglichkeit	98	Hyperpathie	75
Unterschiedliche Hautfarbe	97	Hypästhesie	69
Schmerzen	92	Tremor	57
Ödem	86	Koordinationsstörungen	53
Zunahme der Schmerzen nach Belastung	98	Unwillkürliche Bewegungen	19
		Muskelspasmen	11
		Hyperhidrose	57

Die Ergebnisse der Studie unterstützen die von Sudeck formulierte Theorie: Die Patienten zeigten neben einer neurologischen Symptomatik eindeutige Zeichen einer lokalen entzündlichen Reaktion (Tabelle 2). Man kam zu dem Schluss, die entzündlichen Veränderungen in der Frühphase und die dystrophen Veränderungen in der Spätphase des CRPS seien zurückzuführen auf eine übermäßig starke, regionale Entzündungsreaktion in Folge von Verletzungen (Veldman et al. 1993).

Dafür spricht auch der Nachweis einer signifikanten Erhöhung der Entzündungsmediatoren Interleukin 6 und TNF- α im Blut der betroffenen Extremität von CRPS-Patienten des Typ I; systemisch ist diese Veränderung nicht festzustellen (Huygen et al. 2002). Bestätigt wurden diese Ergebnisse in einer weiteren Studie, in der ebenfalls ein signifikanter Anstieg von TNF- α nachgewiesen werden konnte (Maihöfner et al. 2005). Ebenfalls wurde die Konzentration des TNF- α -bindenden Rezeptors 1 (sTNF-R1) bestimmt. Diesem konnte bereits in der Vergangenheit eine Schlüsselrolle in der Vermittlung von Allodynie und Hyperalgesie z.B. bei Polyneuropathiepatienten zugeschrieben werden. Vor allem bei den Patienten, die eine mechanische Hyperalgesie als klinisches Symptom aufwiesen, war eine signifikante Erhöhung von sTNF-R1 zu finden. Ferner bestand eine signifikante Korrelation zwischen den Konzentrationen von sTNF-R1 und TNF- α .

Verantwortlich für die Produktion dieser Zytokine können eine Vielzahl von Zellen sein. Neben Monozyten, Makrophagen oder T-Lymphozyten gehören dazu auch Mastzellen. Diese konnten in der betroffenen Extremität der CRPS-Patienten stark erhöht nachgewiesen werden. Die Konzentration der Mastzellen korreliert außerdem signifikant mit der Intensität der Schmerzen (Huygen et al. 2004).

Darüberhinaus fanden sich Hinweise auf die Beteiligung neurogener Entzündungsmechanismen.

So erklärt man sich die Tatsache, dass CRPS-Patienten in der Akutphase der Erkrankung eine erhöhte Plasmaextravasation und Vasodilatation aufweisen, als Reaktion auf die Erregung nozizeptiver Fasern mit darauf folgender Freisetzung von Neuropeptiden (Oyen et al. 1993).

Eines dieser Neuropeptide ist das Calcitonin-gene-related-peptide (CGRP). In einer Studie wurde mittels Radioimmunassay die CGRP-Konzentration im Blut von CRPS-Patienten gemessen (Birklein et al. 2001). Insbesondere bei Patienten mit deutlichen klinischen Entzündungszeichen im akuten Krankheitsstadium konnte eine erhöhte Konzentration dieses Peptids festgestellt werden. Außerdem korrelierte eine erhöhte

CGRP-Konzentration mit der Häufigkeit einer vorliegenden Nervenläsion sowie der einer Hyperhydrosis. Nach Reduktion der Akutsymptomatik mit Hilfe therapeutischer Maßnahmen war im Vergleich zur Kontrollgruppe kein Unterschied in den CGRP-Konzentrationen mehr festzustellen.

In diesem Zusammenhang wurde auch die Rolle des Neuropeptids Substanz P untersucht. Dieses wurde sowohl den Patienten als auch einer Kontrollgruppe appliziert, um die dadurch induzierte Plasmaproteinextravasation festzustellen. Hierbei konnte bei Patienten ein deutlichen Anstieg der Plasmaextravasation in der betroffenen und auch nicht betroffenen Extremität gemessen werden. In der Kontrollgruppe induzierte Substanz P keine Proteinextravasation. Ursächlich wurde eine Abschwächung der Substanz-P-Inaktivierung vermutet (Leis et al. 2003).

Unklar bleibt jedoch, ob die neurogenen Entzündungsmechanismen durch die Freisetzung der genannten Entzündungsmediatoren angestoßen werden oder diese lediglich unterhalten (Schattschneider et al. 2003).

Vor dem Hintergrund einer fraglichen entzündlichen Pathogenese des CRPS diskutierte man in den letzten Jahren auch die Bedeutung von immunologischen Faktoren. Wegweisend waren Studien, welche sich mit der Fragestellung einer genetischen Prädisposition für das CRPS auseinandersetzten. Dabei untersuchte man die HLA-Region auf Kandidatengene, welche für das CRPS prädisponieren könnten, und fand tatsächlich Assoziationen mit den HLA-Allelen DQ1 (Kemler et al. 1999), DR13 (van Hilton et al. 2000) und der Zentromerregion der HLA-Klasse I Antigene (van de Beek et al. 2003).

Neben der funktionellen Bedeutung des HLA-Systems für das Immunsystem sind Zusammenhänge zwischen der Anfälligkeit für bestimmte Krankheiten und bestimmten Allelen von HLA-Genen bekannt. Von den meisten dieser vom HLA-System beeinflussten Erkrankungen weiß bzw. vermutet man, sie seien immunologischer Genese.

Weitere Hinweise für eine Beteiligung des Immunsystems in der Pathophysiologie des CRPS geben die Ergebnisse von Hartrick. Dieser konnte bei CRPS-Patienten eine gesteigerte Stickstoffmonoxid-Produktion bei Monozyten nach Stimulation mit Interferon- γ feststellen (Hartrick 2002). Diese veränderte Monozytenreaktivität wird als Teil einer Kaskade vermutet, welche für die Entstehung chronisch-neuropathischer Schmerzen verantwortlich ist, und auch bei Patienten mit

systemischer Sklerodermie und Multipler Sklerose nachgewiesen werden konnte (Sarchielli et al. 1992, Yamamoto et al. 1998).

Auch eine Therapieoption des CRPS weist auf eine entzündliche bzw. immunologische Genese hin: So zeigte sich in kontrollierten Studien die Wirksamkeit systemischer Glukokortikoidgaben (Christensen et al. 1982; Braus et al. 1994).

Obwohl die dargestellten Daten die genaue Rolle immunologischer Faktoren für die Pathogenese des CRPS nicht erklären, so belegen sie trotzdem eindeutig eine Beteiligung des Immunsystems. Zum einen das klinische Bild in der Akutphase der Erkrankung, und zum anderen die nachgewiesenen zellbiologischen Veränderungen deuten auf einen lokalen inflammatorischen Prozess hin. Es bleibt jedoch zu klären, inwieweit diese entzündliche Genese für die Dysfunktion des sympathischen Nervensystems verantwortlich ist bzw. inwieweit diese die immunologischen Mechanismen moduliert.

1.5. Fragestellung

Der dargestellte Wissensstand bezüglich der Pathophysiologie des CRPS macht deutlich, dass insbesondere die zwei genannten Mechanismen (Entzündungsprozess und Dysfunktion des sympathischen Nervensystems) für einen großen Teil der klinischen Symptomatik verantwortlich sind. Unklarheit besteht jedoch über das Zusammenspiel der beiden Mechanismen bzw. wodurch diese ausgelöst und unterhalten werden. Hinsichtlich dieser Frage diskutierten Goebel und van de Vusse einen neuen Ansatz. Sie formulierten die Hypothese, postinfektiöse autoimmunologische Prozesse seien zumindest bei einem Teil der Patienten an der Pathogenese des CRPS beteiligt. Van de Vusse konnte 2001 in einer Studie eine erhöhte Seroprävalenz für Parvovirus B19 bei CRPS-Patienten im Vergleich zum Kontrollkollektiv feststellen (van de Vusse et al. 2001). Bezüglich einer Parvovirus-B19-Infektion konnte bereits in der Vergangenheit nachgewiesen werden, dass eine Infektion mit dem Erreger die Bildung von Autoantikörpern induzieren kann. Außerdem sind Assoziationen zu autoimmunologisch-bedingten Vaskulitiden (Kawasaki-Syndrom im Kleinkindesalter bzw. der mikroskopischen Polyarteriitis nodosa bei Erwachsenen) beschrieben (Holm et al. 1995, Lhote et al. 1995).

Den Ansatz einer autoimmunologischen Pathogenese griff Blaes 2004 auf, und zog dabei insbesondere einen Autoantikörper-vermittelten Prozess in Betracht. Mittels Immunfluoreszenz konnte gezeigt werden, dass bei einem Teil der CRPS-Patienten Autoantikörper gegen Strukturen des autonomen Nervensystems vorhanden sind. Diese waren gegen intrazelluläre Antigene sympathischer Ganglienzellen gerichtet (Blaes et al. 2004). Allerdings wird kontrovers diskutiert, welche genaue Funktion die Antikörper, die gegen intrazelluläre Antigene gerichtet sind, haben. Nach dem heutigen Kenntnisstand sind bei vielen neuroimmunologischen Krankheiten insbesondere Autoantikörper gegen Oberflächenstrukturen für die pathologischen Prozesse verantwortlich (Lang et al. 2003).

Daher beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit dem Nachweis von Oberflächenautoantikörpern gegen differenzierte autonome Nervenzellen im Serum von CRPS-Patienten. Außerdem soll deren Funktion in Hinblick auf die Pathophysiologie des CRPS hinterfragt werden.

Im Einzelnen sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Lassen sich im Serum von CRPS-Patienten Autoantikörper gegen Oberflächenantigene von Nervenzellen nachweisen? Wenn ja, sind diese ausschließlich gegen sympathische Nervenzellen gerichtet oder auch gegen die nichtneuronale Zelllinie HEK 293 ?
2. Haben IgG-Fractionen aus dem Serum von CRPS-Patienten einen zytotoxischen bzw. apoptotischen Effekt auf sympathische Nervenzellen?
3. Führt der Einfluss von IgG aus dem Serum der CRPS-Patienten zu einer nachweisbaren Aktivitäts- bzw. Funktionsänderung neuronaler Zellen?
4. Haben CRPS-Patienten eine erhöhte Seroprävalenz für Parvovirus B19-IgG? Wenn dies der Fall ist, können diese Viren die Bildung Vaskulitiden-verursachender antiendothelialer Autoantikörper induzieren?

2. Material und Methoden

2.1. Patienten

Allen Patienten wurde nach entsprechender Aufklärung und mit deren Einverständnis Serum entnommen. Ein positives Votum der Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Giessen für diese Studie liegt vor.

Insgesamt standen für die Studien die Seren von 41 klinisch dokumentierten CRPS-Patienten zur Verfügung, die alle entsprechend der IASP Kriterien (Bruehl et al. 1999) diagnostisch gesichert waren. Davon waren 29 Patienten dem CRPS Typ 1 und 12 Patienten dem CRPS Typ 2 zuzuordnen. Das Alter der Patienten lag zwischen 24 und 81 Jahren (Mittelwert \pm Standardabweichung: 53.1 ± 13.8 Jahre; 25 weiblich/16 männlich).

Als Kontrollen standen Seren von 30 gesunden Probanden und 20 Patienten mit einer Nervenläsion, welche nicht mit einem CRPS assoziiert war, zur Verfügung. Das Alter der Probanden lag zwischen 24 und 74 Jahren (gesunde Kontrollen: 52.0 ± 12.4 Jahre; 18 weiblich/12 männlich, Patienten mit Nervenläsion: 53.9 ± 12.4 ; 10 weiblich/10 männlich).

In der Diagnostik für Oberflächenautoantikörper verwendeten wir die Seren von 40 CRPS-Patienten (28 CRPS Typ 1, 12 CRPS Typ 2; 52.1 ± 13.8 Jahre; 25 weiblich/15 männlich) sowie den 30 gesunden Probanden und den 20 Patienten mit einer Nervenläsion. Die mittlere Dauer klinischer Symptome des CRPS lag in der Patientengruppe bei 29.1 ± 23.9 Wochen.

Zur Durchführung der ELISA-Verfahren standen 39 CRPS-Patienten (28 CRPS I, 11 CRPS II; 54.6 ± 11.7 Jahre; 25 weiblich/11 männlich) sowie die 30 gesunden Probanden zur Verfügung. Die mittlere Dauer klinischer Symptome des CRPS lag in der Patientengruppe bei 30.3 ± 24.5 Wochen.

Bei den immunologischen Funktionsassays standen nur teilweise ausreichende Mengen an Serum zur Aufreinigung der IgG-Fractionen zur Verfügung. Hierbei wurde eine Gruppe von sieben Patienten (3 CRPS-Typ-1-Patienten, 4 CRPS-Typ-2-Patienten) untersucht. Das Alter der Patienten lag zwischen 23 und 81 Jahren (41.8 ± 17.9 Jahre; 5 weiblich/2 männlich).

Das Alter der acht Kontrollprobanden, deren IgG-Fraktionen für die Funktionsassays zur Verfügung standen, lag zwischen 24 und 74 Jahren (45.0 ± 16.4 Jahre; 5 weiblich/3 männlich).

Hinsichtlich Alter- und Geschlechtsverteilung zeigten sich zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede.

2.2. Zellkultur

Neben Zellen des sympathischen Nervensystems wurde die Zelllinie HEK 293 (Nierenfibroblasten) verwendet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO₂. Als Kulturmedium wurde RPMI 1640 (Sigma, Steinheim, Deutschland) mit 10% fetalem Kälberserum (FCS: HyClone, PerbioScience, Bonn, Deutschland), L-Glutamin (4 mmol/l, Sigma, Steinheim, Deutschland) sowie Streptomycin (20 mg/l, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) und Penicillin (20.000 IE/l, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) verwendet. Jeweils am 2. Tag nach Aussaat wurde das Medium erneuert, am 4. Tag nach Aussaat wurden die Zellen im Verhältnis 1/4 gesplittet. Das Splitten erfolgte jeweils nach Inkubation mit Trypsin (2.5 g/l, Gibco-Invitrogen, Carlsbad, USA) für 5 Minuten bei 37°C. HUVEC-Lysat (Abkürzung vom englischen Begriff „human umbilical vein endothelial cell lysate“) wurde von der Abteilung für Labormedizin der Kerckhoff-Klinik in Bad Nauheim (Dr. Madlener) zur Verfügung gestellt.

2.3. Präparation der sympathischen Nervenzellen

Für die verschiedenen Versuchsreihen wurde sympathisches Nervengewebe von ausgewachsenen Wistar Ratten verwendet. Diese wurden nach Narkotisierung mit Halothan mittels Dekapitation getötet. Daraufhin wurde die gesamte Wirbelsäule mit dem sympathischen Grenzstrang und allen Ganglien herauspräpariert. Die Ganglien wurden vom restlichen freigelegten Gewebe abgetrennt und in einen Behälter mit calcium- und magnesiumfreien PBS (8.5 g NaCl; 1.42 g Na₂HPO₄; 0.29 g NaH₂PO₄; in 1l Aqua dest.) überführt. Schließlich folgte eine Inkubation über 40 Minuten in 6 mg/ml Kollagenase (CLS II: Worthington, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) und 2

mg/ml Trypsin (Typ III-S: Sigma, Steinheim, Deutschland) in einem warmen Wasserbad. Daraufhin wurde das Gewebe dreimal in dem Kulturmedium gewaschen. Schließlich wurden die Zellen durch Verwirbelung mit verschiedenen sterilen Pipetten kleiner werdenden Durchmessers dissoziiert. Kultiviert wurden die Zellen in einem Kulturmedium in einer 5% CO₂-Atmosphäre bei 37°C.

2.4. Isolierung der IgG-Fractionen aus dem Serum

Aus den Gruppen der CRPS-Patienten und Kontrollprobanden wurden von sieben bzw. acht Personen die IgG-Fractionen aus Serum gewonnen.

Für deren Isolierung wurde eine 5 ml Protein-G-Säule (Pharmacia, Hi-Trap, Uppsala, Schweden) verwendet. Im ersten Schritt wurden jeweils 10 ml Serum mit Glycinpuffer (0.1 mol/L, pH 9) 1/3 verdünnt und mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/h durch die Säule gegeben. Bei diesem Schritt banden ausschließlich die IgG-Antikörper mit ihrem Fc-Teil an der Protein-G-Beschichtung der Säule. Nach einem Waschvorgang mit dem pH-9-Puffer wurde dann ein 0.1 molarer pH-3-Glycinpuffer auf die Säule gegeben, so dass durch die pH-Wert-Änderung die Bindung des IgG an das Protein G aufgehoben wurde. Aus der Säule wurde die IgG-Fraktion dann in 1 ml-Fractionen eluiert. Anschließend wurde photometrisch die Absorption jeder Fraktion bei 480 nm bestimmt. Verwendet wurden alle Fraktionen mit einer Absorption >2.9, welche dann sieben mal für jeweils 24 Stunden gegen die 1000 fache Menge PBS dialysiert wurden.

Nach Beendigung dieser Prozedur wurde nephelometrisch der IgG-Gehalt (Behring Nephelometer, Deerfield, USA) bestimmt. Abschließend wurden die IgG-Fractionen aliquotiert und bei -24°C aufbewahrt.

2.5. Durchflusszytometrie zur Diagnostik von Oberflächenautoantikörpern

Zum Nachweis von Autoantikörpern gegen Oberflächenstrukturen der verschiedenen Zelllinien wurde die Durchflusszytometrie genutzt. Hierbei handelt es sich um eine Methode, welche das Zählen und die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Zellen in einem Flüssigkeitsstrom ermöglicht. Eine

Hauptanwendung ist die quantitative Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen von Zellen oder Zellpopulationen mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern auf der Grundlage einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Hinsichtlich dem Nachweis von Oberflächenautoantikörpern wird die jeweilige Zellsuspension mit entsprechenden Seren inkubiert. Sind in den Seren Antikörper vorhanden, die an Oberflächenstrukturen der Zellen binden, so können diese nachgewiesen werden, indem ein FITC-markierter-anti-human-IgG-Antikörper hinzugegeben wird. Dieser bindet dann an den ersten Antikörper aus dem Serum, welcher bereits an eine Oberflächenstruktur der Zelle gebunden hat. Somit kann indirekt durch den Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörper die Quantität an Bindungen des ersten Antikörpers bestimmt werden (Abb. 2).

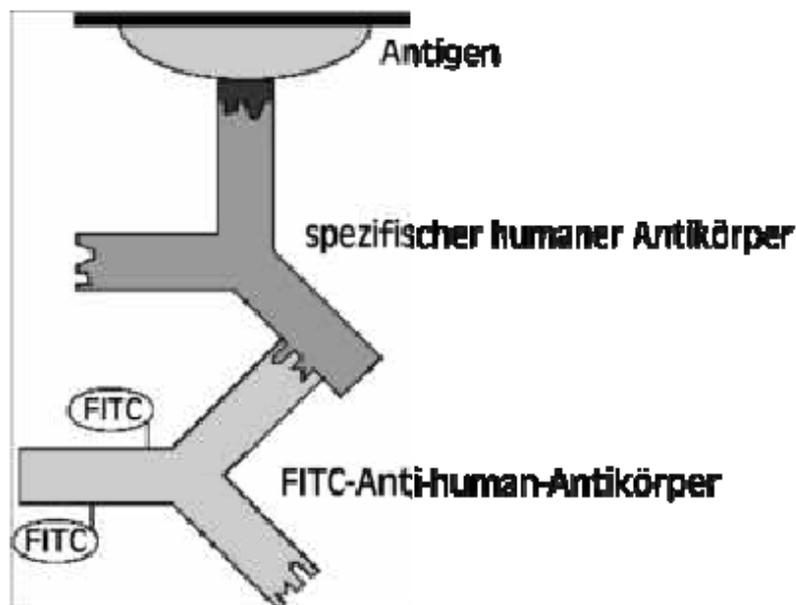


Abbildung 2: Antikörper im Serum von Patienten binden an Oberflächenantigene von Zellen. Zum Nachweis wird ein FITC-markierter-anti-human-IgG-Antikörper hinzugegeben. Der Fluoreszenzfarbstoff-markierte Antikörper bindet an den Autoantikörper, wodurch sich dieser nachweisen lässt. Mittels Durchflusszytometrie lässt sich die Fluoreszenzstärke bestimmen, welche proportional zum Antikörpergehalt des Serums ist (Kischel et al. 2002).

Dabei wurden im ersten Schritt die Zellen auf die 96-Well-Platten verteilt, zweimal mit 100 μ l PBS und einmal mit 100 μ l FACS-Puffer (PBS, 1% FCS, 0.1% NaN_3) gewaschen. Jeder Waschvorgang besteht nach Zugabe der jeweiligen Lösung aus einer vier Minuten andauernden Zentrifugation bei 1200 rpm, dem Abschütten des Überstandes und der anschließenden Resuspendierung der Zellen auf dem Vortexer.

Danach folgte eine 30 minütige Inkubation bei 4°C mit je 50 µl Serumproben, welche 1/50 in FACS-Puffer verdünnt waren.

Nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurden die Wells mit je 50 µl FACS-Puffer aufgefüllt, zentrifugiert und der Überstand wieder abgeschüttet. Es folgten zwei Waschvorgänge mit je 100 µl FACS-Puffer, und schließlich die Zugabe von je 50 µl FITC-markiertem anti-human-IgG (DAKO, Hamburg, Deutschland; 1/75 in FACS-Puffer). Nach 30 Minuten Inkubationszeit bei 4°C wurden wieder zwei Waschvorgänge mit 100 µl FACS-Puffer durchgeführt, bevor dann die Zellen im FACS-Calibur (BDBiosciences, Heidelberg, Deutschland) mit der CellQuest®-Software untersucht wurden.

Um Bindungen an ubiquitäre Antigene zu vermindern, wurden in einer modifizierten Versuchsanordnung die jeweiligen verdünnten Seren auf HEK-293-Zellen (Fibroblasten) präinkubiert. Erst danach wurde mit sympathischen Neuronen inkubiert.

Dabei wurden die HEK-Zellsuspensionen auf die 96-Well-Platte verteilt, zwei Waschvorgänge mit PBS und FACS-Puffer durchgeführt und 24 Stunden lang bei 4°C mit den Seren, welche 1/50 in FACS-Puffer verdünnt waren, inkubiert.

Nach Ablauf einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Zellsuspensionen zentrifugiert und der Serumüberstand abpipettiert, bevor dann das oben beschriebene Protokoll fortgeführt wurde.

2.6. Immunologische Funktionsassays

2.6.1. Zytotoxizitätsassay

In den Versuchsreihen wurde mittels Trypanblau-Färbung die zytotoxische Wirkung der CRPS-IgG-Fractionen auf sympathische Neuronen untersucht. Das Prinzip der Methode beruht darauf, dass Trypanblau (0.5% in 0.9% NaCl, Boehringer, Mannheim, Deutschland) von vitalen Zellen nicht aufgenommen wird, geschädigte oder avitale Zellen von diesem Farbstoff aber tiefblau gefärbt werden. So kann nach Färbung mit Trypanblau mikroskopisch beurteilt werden, wie groß der Anteil geschädigter oder toter Zellen von einer bestimmten Gesamtzellzahl ist.

Nach Präparation der sympathischen Neuronen wurden die Wells der 96-Loch-Platten mit je 125 µl dieser Zellsuspension gefüllt. Diese wurden dann mit je 65 µl der IgG-Fractionen in einer Konzentration von 3 g/l im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ für 72 Stunden inkubiert, sodass die IgG-Endkonzentration in jedem Well 1g/l betrug.

Nach diesen 72 Stunden wurden die Mediumüberstände der Wells jeweils in Behälter überführt, zu welchen dann noch, nach Abtrypsinisierung, das Zellpellet hinzugefügt wurde. Danach wurden 10 µl der auszuzählenden Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau gemischt und nach einer Minute in eine Neubauer Zählkammer pipettiert. In 1000-facher Vergrößerung konnten dann alle Zellen unter dem Mikroskop (Steinheim, Berlin, Deutschland) in den vier Großquadranten ausgezählt werden und das Verhältnis zwischen vitalen und avitalen Zellen berechnet werden. Die Zählung wurde je doppeltverblindet durchgeführt, und umfasste dabei stets mindestens 100 Zellen (Abb. 3).

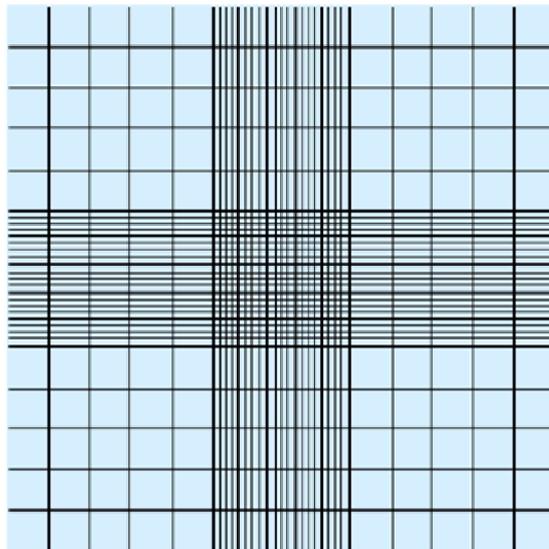


Abbildung 3: Neubauer-Zählkammer. Die Zellzahl/ml wird mit folgender Formel berechnet:

Zellzahl der vier Großquadranten / (4 (Mittelwert aus den 4 Großquadranten) x 2 (Verdünnung) x 10⁴) = Zellzahl/ml

2.6.2. Apoptoseassay

Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs 4,6-Diamidino-2-Phenylindolhydrochlorid (DAPI) (Boehringer, Mannheim, Deutschland) wurde untersucht, ob durch Inkubation von sympathischen Neuronen mit CRPS-IgG-Fraktionen Apoptoseprozesse in neuronalen Zellen ausgelöst werden. DAPI interkaliert sich in die DNA, so dass die Zellkernmorphologie begutachtet und die Kondensation der Zellkerne identifiziert werden kann. Apoptotische Zellen sind durch ihre kondensierten Zellkerne und das kondensierte Chromatin zu identifizieren.

Im ersten Schritt wurden Permanox-8-well-chamber-slides (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) mit Fibronectin (20 µg/ml) in PBS bei 4°C über Nacht beschichtet. Am Folgetag wurde der Überstand abgeschüttet und die Wells mit 200 µl Medium gewaschen. Dann bestückte man jedes Well mit sympathischen Neuronen in 200 µl Medium und inkubierte die Platten wieder über Nacht bei 37°C und 5%CO₂, damit die Zellen auf den Fibronectin-beschichteten Slides adhärent wurden. Daraufhin wurden die Wells mit 100 µl Medium aufgefüllt und mit je 13.5 µl der IgG-Fraktionen in einer Konzentration von 3 g/l inkubiert, sodass die IgG-Endkonzentration bei jedem Patienten 40µg betrug.

Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden wurden die Wells des Chamber Slides mit 200 µl PBS gewaschen und für 30 Minuten mit 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 0.1% Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Daraufhin folgten wieder zwei Waschvorgänge mit 200 µl PBS. Schließlich färbte man die Zellen mit DAPI und befestigte sie mit Vectashild (Vector Laboratories, Burlingame, England).

Die Auswertung und Dokumentation erfolgte verblindet unter einem Fluoreszenzmikroskop (Leica Microsystems, Heidelberg, Deutschland). In vier zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern bestimmte man die Anzahl der Neuronen mit kondensiertem Chromatin bzw. die zum Teil stattfindende Fragmentation der Zellkerne.

2.6.3. Expressionsänderungen im MAPKinase-Pathway (phospho-ERK-1/2, phospho –p38)

Um mögliche, durch Autoantikörper induzierte Änderungen der Zellfunktion zu erfassen, wurde der Anteil an phosphoryliertem ERK-1/2 und phosphoryliertem p38, welche beide Schlüsselenzyme im MAPKinase-Pathway darstellen, bestimmt.

Bei der Bestimmung des phosphorylierten-ERK-1/2 erfolgten Messungen nach 10, 30, 60 und 120 Minuten Inkubationszeit.

Auch hierbei wurden die sympathischen Neuronen aus der Wistar Ratte verwendet.

Nach zweimaligem Waschen mit PBS (bis zum Schritt der Zellfixierung immer mit 10% FCS versetzt) wurden die Zellen auf die 96-Well-Platten verteilt und mit je 100µl IgG-Fraktion (1g/l) inkubiert. Danach folgten zwei Waschvorgänge mit 100 µl PBS und die Fixierung der Zellen mit 1% Paraformaldehyd (PFA) in PBS (15 Minuten bei 4°C) sowie ein erneutes zweimaliges Waschen in PBS. Schließlich wurden die Zellen 10 Minuten in Permeabilisationspuffer (FACS-Puffer mit 0.1% Saponin) gewaschen und 20 Minuten mit PE-markiertem anti-phospho-ERK (BDBiosciences, Heidelberg, Deutschland: 1/5 in Permeabilisationspuffer) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte wieder ein Waschvorgang mit Permeabilisationspuffer und mit PBS, bevor die Fluoreszenz im FACS-Calibur (BDBiosciences, Heidelberg, Deutschland) gemessen wurde. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Cell-Quest®-Software.

Die Bestimmung des phosphorylierten p38 verlief nach ähnlichem Protokoll: Die IgG-Fraktionen wurden ebenfalls zu je 100 µl in einer Konzentration von 1 g/l zu den Zellen hinzugegeben. Nach Ablauf einer 48-stündigen Inkubationszeit wurden die Zellen abtrypsinisiert und zweimalig mit 100 µl PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen fixiert (15 Minuten, 1% PFA, bei 4°C). Darauf folgten Waschvorgänge mit 100 µl PBS und 100 µl Permeabilisationspuffer. Schließlich wurden 100 µl PE-markierter anti-phospho-p38 (BDBiosciences, Heidelberg, Deutschland; 1/5 in Permeabilisationspuffer) für 20 Minuten bei Raumtemperatur hinzugegeben. Bevor die Bestimmung der Fluoreszenz mit dem FACSCalibur durchgeführt wurde, folgten noch Waschvorgänge jeweils mit Permeabilisationspuffer und FACS-Puffer.

2.7. Parvovirus-B19-IgG-ELISA

Mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen ELISA (Immuno Biological Laboratories, Hamburg, Deutschland) wurden die Seren der CRPS-Patienten auf IgG-Antikörper gegen Parvovirus B19 untersucht. Das Prinzip des Tests basiert darauf, Patientenserum auf Wells einer Mikrotiterplatte zu geben, die mit Parvovirus-B19-spezifischem Antigen beschichtet sind. Wenn im zugefügten Serum spezifische Antikörper gegen dieses Antigen vorhanden sind, kann man diese mit einem Enzymkonjugat nachweisen und mit Hilfe eines Photometers quantifizieren.

Im ersten Schritt wurden je 100 µl der verdünnten Seren, Positivkontrolle und den Standards A-D (IgG-Antikörper gegen Parvovirus B19 in ansteigender Konzentration) in die einzelnen Wells der Mikrotiterplatte pipettiert und 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Seren waren 1/101 und die Positivkontrolle sowie die Standards 1/10 in Verdünnungspuffer gelöst. Danach wurde der Überstand verworfen und die Wells dreimal mit je 250 µl Waschpuffer (Phosphatpuffer, Stabilisatoren, 1/10 in Aqua dest. verdünnt) gereinigt. Schließlich wurden je 100 µl des IgM-Konjugats hinzugegeben und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit folgten wieder drei Reinigungsschritte mit Waschpuffer und der Zugabe von je 100 µl TMB-Substratlösung. Danach erfolgte erneut eine Inkubation über 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Daraufhin wurde in jedes Well 100 µl TMB-Stopplösung (1 M H₂SO₄) gegeben. Innerhalb von 15 Minuten nach Zugabe der Stopplösung erfolgte die Messung der Extinktion mit einem Spectra Max-Microplate-Reader (Molecular Devices, München, Deutschland) bei 450 nm. Anschließend wurde an Hand der Standards A-D eine Eichkurve angefertigt, mit deren Hilfe dann die Konzentrationen der Seren an Parvovirus B19-IgG bestimmt werden konnten. Die Versuche wurden in Doppelansätzen durchgeführt. Eine Konzentration größer als 3.5 U/mL wurde als positiver Befund gewertet.

2.8. Antiendotheliale Autoantikörper

Mittels ELISA-Verfahren wurden die Seren der CRPS-Patienten auf Autoantikörper gegen endotheliale Strukturen untersucht. Die Antigenfunktion übernahm die Proteinfraction menschlicher Nabelvenenendothelzellen (HUVEC-Lysat: Abkürzung vom englischen Begriff „human umbilical vein endothelial cell lysate“).

Im ersten Schritt wurden die ELISA-Platten (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) für 12 Stunden bei 4°C mit 0.5 µg/well HUVEC-Lysat beschichtet. Daraufhin wurden sie gewaschen (2% Pulver entrahmter Milch in PBS/0.1% Tween 20), und für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit den CRPS-Seren (1/500 in PBS mit 0.1% Tween 20, 0.1% Pulver entrahmter Milch und 10% Maltose) inkubiert. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit und zweimaligem Waschen wurden die Wells zuerst mit Peroxidase-markiertem anti-human-IgG für eine Stunde bei Raumtemperatur, und schließlich mit Phenylendiamin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgte die Messung der Extinktion bei 492 nm mit dem Spectra Max-Microplate-Reader (Molecular Devices, München, Deutschland).

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde im nächsten Schritt die Fragestellung untersucht, ob diese Autoantikörper direkt an Oberflächenantigene der endothelialen Zellen binden.

Dazu wurden wiederum HUVEC-Zellen verwendet, welche in Medium (RPMI 1640, 10% FCS, 1% Glutamin) kultiviert wurden.

Zu Beginn wurden die Zellen abtrypsinisiert, mit FACS-Puffer gewaschen, und schließlich auf 96-Well-Platten ausplattiert.

Danach inkubierte man die Wells für 30 Minuten bei 4°C mit je 1/50 verdünnten Seren der CRPS-Patienten. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurden die Wells mit je 50 µl FACS-Puffer aufgefüllt, zentrifugiert und der Überstand wieder abgeschüttet. Es folgten zwei Waschvorgänge mit je 100 µl FACS-Puffer, und schließlich die Zugabe von je 50 µl FITC-markiertem anti-human-IgG (DAKO, Hamburg, Deutschland; 1/75 in FACS-Puffer). Nach 30 Minuten Inkubationszeit bei 4°C wurden wieder zwei Waschvorgänge mit 100 µl FACS-Puffer durchgeführt, bevor schließlich die Zellen im FACS-Calibur (BDBiosciences, Heidelberg, Deutschland) mit der Cell-Quest®-Software auf gebundene Autoantikörper untersucht wurden.

2.9. Statistik

Die Ergebnisse der laborchemischen Untersuchungen wurden mit Hilfe des t-Tests bzw. bei Vergleichen von mehr als zwei Gruppen mit dem ANOVA-Test auf ihre Signifikanz überprüft. Ein $p < 0.05$ wurde als signifikant angesehen. Bei den jeweiligen Versuchen der Durchflusszytometrie wurde der Mittelwert der Kontrollgruppe errechnet und gleich 100% gesetzt. Davon ausgehend wurde die prozentuale Abweichung der jeweiligen Probanden von diesem Mittelwert bestimmt. Als positive Befunde wurden alle Ergebnisse eingeordnet, welche größer als die 3-fache Standardabweichung vom Mittelwert der Kontrollgruppe waren. Bei den ELISA-Testverfahren wurden direkt die unterschiedlichen Titer mit Hilfe des t-Tests verglichen, bei den Apoptose- und Zytotoxizitätsassays direkt die prozentualen Absolutwerte. Zusammenhänge zwischen den klinisch-epidemiologischen Daten der einzelnen CRPS-Patienten und deren laborchemischen Befunde in den jeweiligen Untersuchungen wurde mit Hilfe des „Fisher’s exact test“ überprüft. Alle statistischen Analysen erfolgten mit der Prism© 4.02 Software (Graph Pad, Inc. , San Diego, USA, 2004).

3. Resultate

3.1. Nachweis von Autoantikörpern gegen Oberflächenepitope

Hierbei wurden die Seren der CRPS-Patienten auf Antikörper gegen Oberflächenstrukturen von sympathischen Nervenzellen und von der nichtneuronalen Zelllinie HEK 293 mittels Durchflusszytometrie getestet (Abb. 4).

Autoantikörper gegen Oberflächenstrukturen des sympathischen Nervensystems konnten bei 25% (10 von 40) der CRPS-Patienten ($n=40$, Mittelwert der Bindungen \pm Standardabweichung: $190.0\% \pm 167.2\%$) nachgewiesen werden, jedoch nur bei 10% (2 von 20) der Patienten mit einer Nervenläsion ($n=20$, $106.2\% \pm 60.0\%$) und bei keinem der gesunden Probanden ($n=30$, 100.3 ± 36.5 , $p<0.01$, Abb. 5 A). Bei der HEK-293-Zelllinie konnten lediglich bei einem CRPS-Patienten, zwei Patienten mit Nervenläsion und einem gesunden Probanden Oberflächenbindungen festgestellt werden (Kontrollgruppe: $n=30$, $100.8\% \pm 56.8\%$; Patienten mit Nervenläsion: $n=20$, $149.1\% \pm 84.3\%$; CRPS-Patienten: $n=40$, $119.8\% \pm 55.4\%$, Abb. 6). Der CRPS-Patient war ebenfalls auf Zellen des sympathischen Nervensystems positiv getestet worden. Auf Grund der Reaktion sowohl mit Fibroblasten und Neuronen, wurde eine Bindung an ubiquitär vorkommende Antigene angenommen.

Um diese Bindungen herauszufiltern, wurde alle Seren auf der nichtneuronalen Kontrollzelllinie HEK 293 für 24 Stunden vorinkubiert. Anschließend wurden die Seren nochmals auf Autoantikörper gegen Strukturen des autonomen Nervensystems überprüft. Letztlich waren hier sogar 12 CRPS-Patienten ($n=40$, $176.9\% \pm 129.1\%$) positiv, jedoch nur noch ein Neuropathiepatient ($n=20$, $96.6\% \pm 35.6\%$) und kein gesunder Proband ($n=30$, $98.3\% \pm 35.6\%$, $p<0.01$, Abb. 5 B). Ferner wurden die Patienten bezüglich ihrer klinisch-epidemiologischen Daten überprüft. Es konnte jedoch zwischen positiv und negativ getesteten Patienten kein Unterschied festgestellt werden (Tabelle 3).

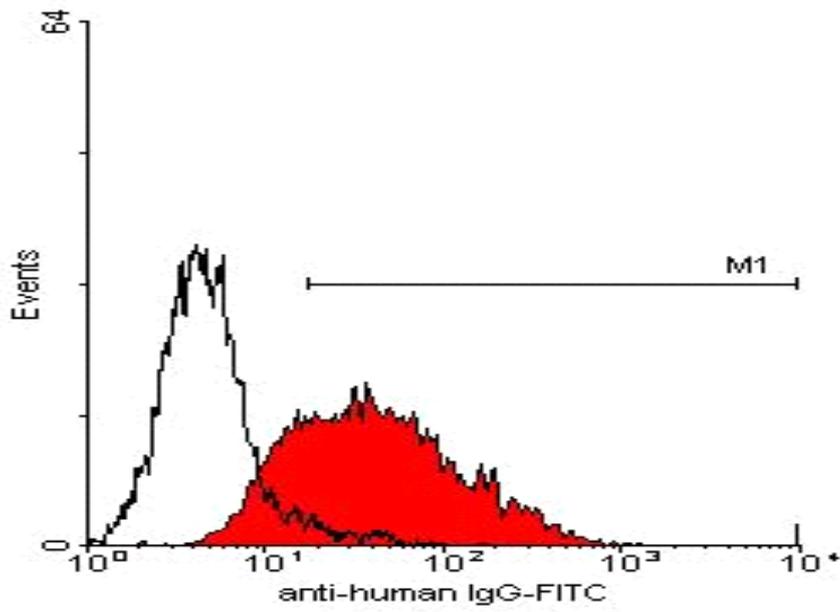


Abbildung 4: Oberflächenbindungen eines CRPS-Patienten (roter Graph) im Vergleich mit einem Kontrollprobanden (transparenter Graph) an sympathischen Neuronen.

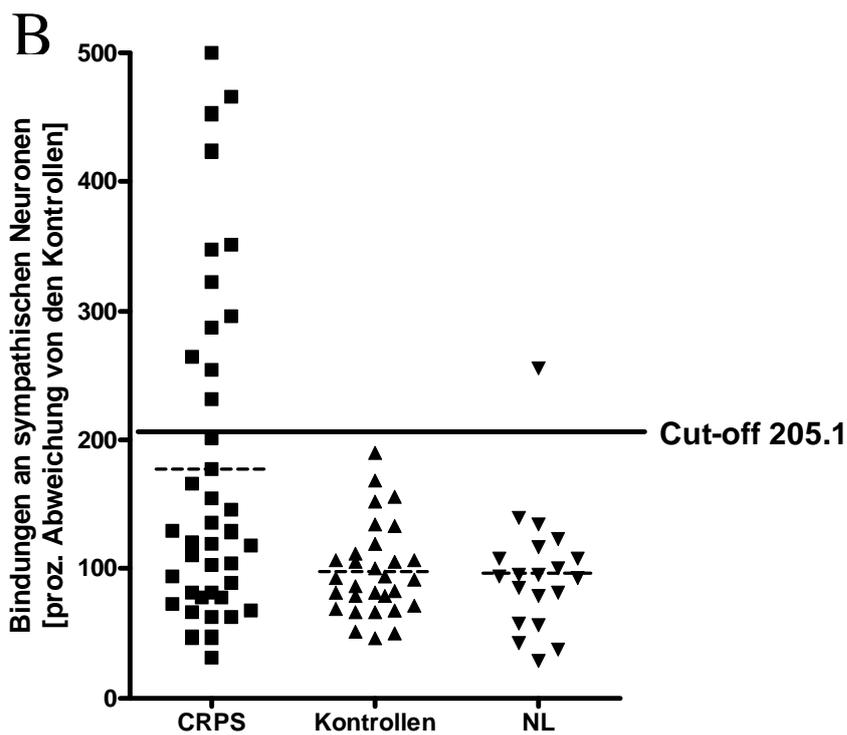
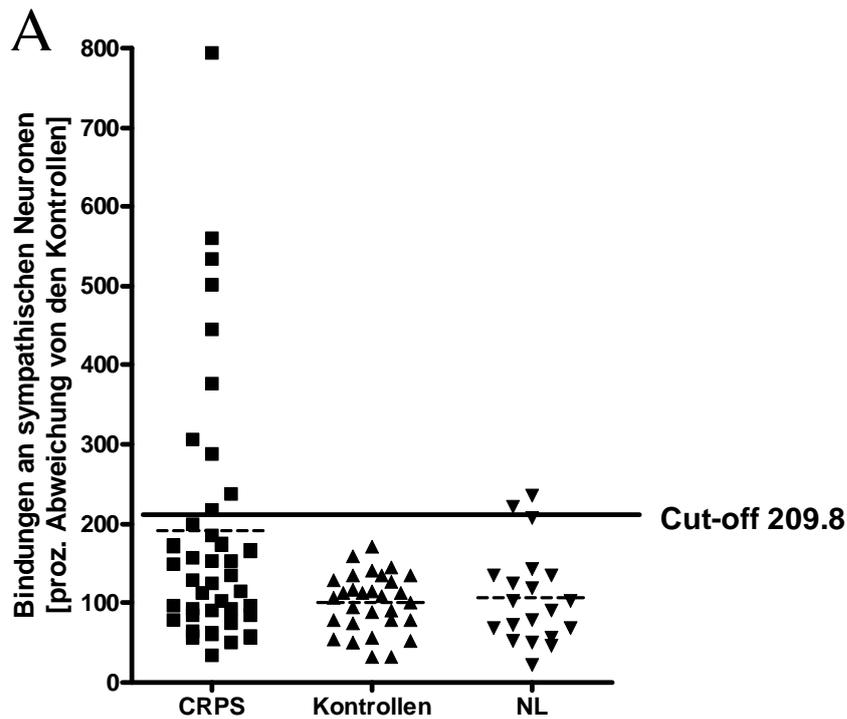


Abbildung 5: (A,B) Oberflächenbindungen an sympathischen Neuronen (dargestellt als prozentuale Abweichung vom Mittelwert der Bindungen in der Kontrollgruppe) vor (A) und nach (B) Vorinkubation der Seren mit HEK-293-Zellen. Als positive Befunde wurden alle Ergebnisse eingeordnet, welche größer als die 3-fache Standardabweichung vom Mittelwert der Kontrollgruppe waren (hier markiert als durchgezogene Linie). Die Mittelwerte der einzelnen Gruppen sind als gestrichelte Linien dargestellt. Die CRPS-Patienten zeigten sowohl positive als auch höhere Bindungen an sympathischen Neuronen im Vergleich zu den Kontrollprobanden und den Patienten mit Nervenläsion (A: $p < 0.01$; B: $p < 0.01$).

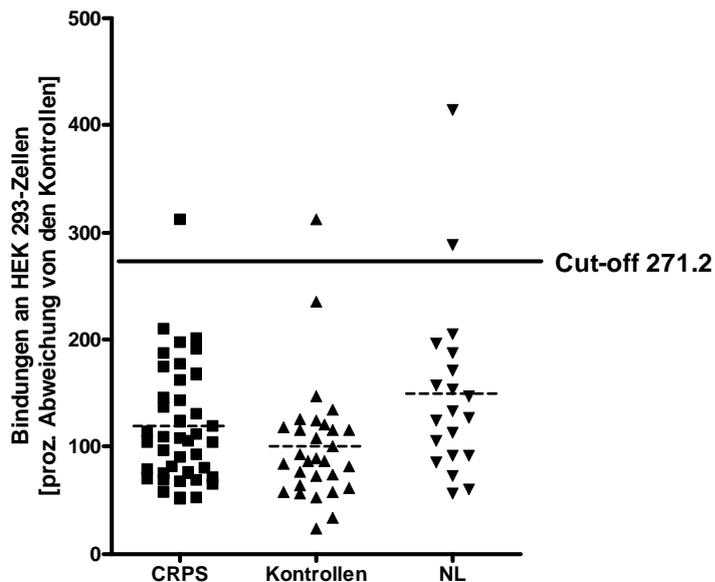


Abbildung 6: Oberflächenbindungen an HEK-293-Zellen (dargestellt als prozentuale Abweichung vom Mittelwert der Bindungen in der Kontrollgruppe). Als positive Befunde wurden alle Ergebnisse eingeordnet, welche größer als die 3-fache Standardabweichung vom Mittelwert der Kontrollgruppe waren (hier markiert als durchgezogene Linie). Die Mittelwerte der einzelnen Gruppen sind als gestrichelte Linien dargestellt.

Tabelle 3: Klinische Daten der CRPS-Patienten, welche auf Oberflächenautoantikörper getestet wurden. ¹motorische bzw. sensorische Beeinträchtigung unabhängig von einer Nervenläsion; ²erhöht oder vermindert; *Informationen nicht von allen Patienten vorhanden, ³Zeit von Symptombeginn bis zur Blutentnahme

	Oberflächenbindung (+) (n=12)	Oberflächenbindung (-) (n=28)	p
Alter	51.4 ± 17.3	53.4 ± 12.2	n.s.
Geschlecht	7w/5m	18w/10m	n.s.
CRPS-Typ	8 CRPS Typ 1 4 CRPS Typ 2	21 CRPS Typ 1 7 CRPS Typ 2	n.s.
betroffene Extremität	10 oben/2 unten	22 oben/6 unten	n.s.
Operation	8/12	15/28	n.s.
Motorik ¹	7/12	16/28	n.s.
Sensorik ¹	8/12	21/28	n.s.
Hauttemperatur ²	9/12	14/21*	n.s.
Haarwuchs ²	3/10*	6/18*	n.s.
Schwitzen ²	4/11*	8/15*	n.s.
Zeit bis zur Serumanalyse ³	40.1±43.3	23.8±23.9	n.s.

3.2. Immunologische Funktionsassays

3.2.1. Zytotoxizitätsassay:

In diesem immunologischen Funktionsassay wurde untersucht, ob die IgG-Fractionen der CRPS-Patienten eine zytotoxische Wirkung auf die Zellen des sympathischen Nervensystems haben. Es ließ sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen CRPS-Patienten ($n=7$; $11.1\% \pm 3.3\%$) und der Kontrollgruppe ($n=7$; $10.4\% \pm 4.1\%$) feststellen. Der prozentuale Anteil toter Zellen lag nach 72 Stunden bei Kontrollprobanden und Patienten zwischen 3.6-16.0% (Abb. 7).

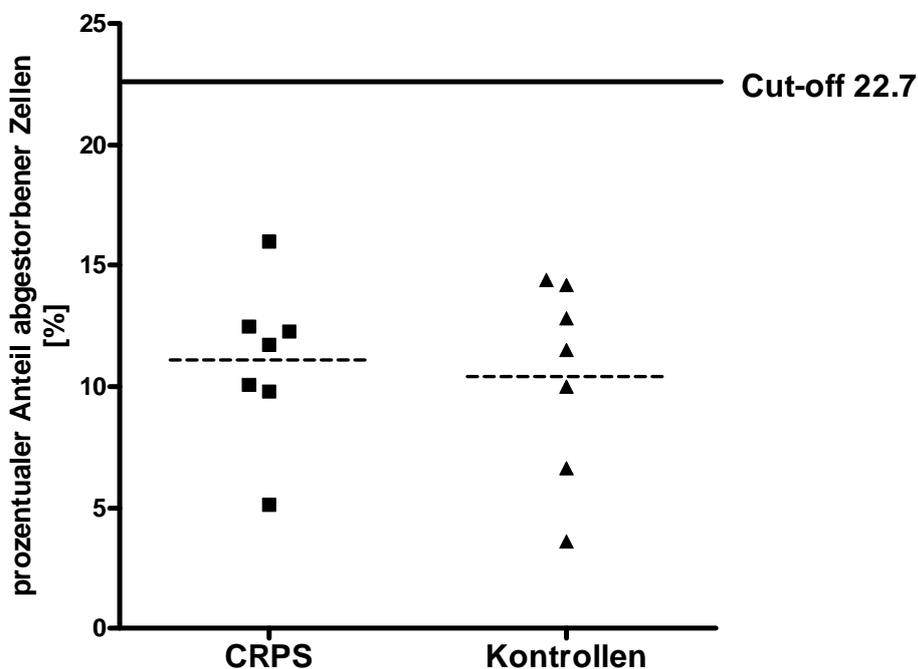
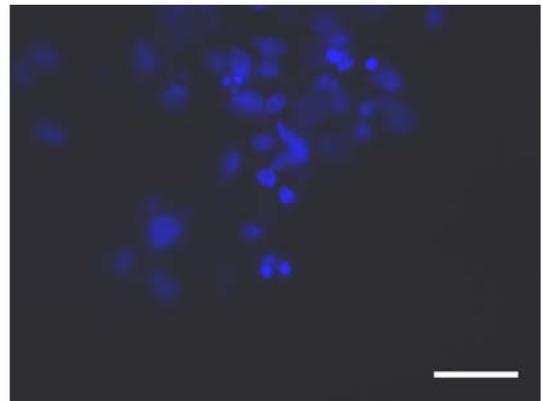
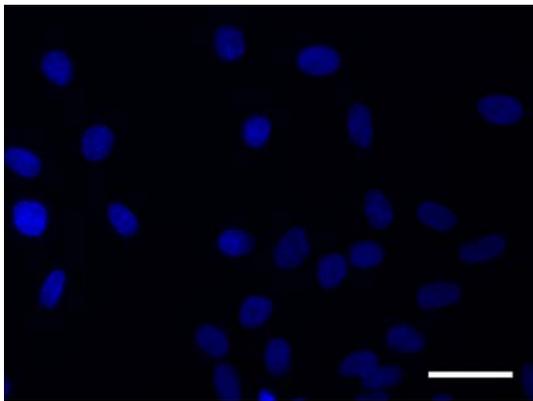


Abbildung 7: Mit Hilfe der Typan-Blau-Färbung ermittelter prozentuale Anteil toter neuronaler Zellen nach Inkubation der Neuronen mit IgG-Fractionen der CRPS-Patienten und Kontrollprobanden. Es konnte kein zytotoxischer Effekt der CRPS-IgG-Fractionen auf die Neuronen nachgewiesen werden. Als positive Befunde wurden alle Ergebnisse eingeordnet, welche größer als die 3-fache Standardabweichung vom Mittelwert der Kontrollgruppe waren (hier markiert als durchgezogene Linie). Die Mittelwerte der einzelnen Gruppen sind als gestrichelte Linien dargestellt.

3.2.2. Apoptoseassay

Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoff 4,6-Diamidino-2-Phenylindolhydrochlorid (DAPI) wurde untersucht, ob die IgG-Fractionen der CRPS-Patienten proapoptotisch auf sympathische Neuronen wirken. Insgesamt ließ sich zwischen der Kontrollgruppe (n=6; $1.37\% \pm 0.16\%$) und den Patienten (n=7; $2.33\% \pm 1.68\%$) kein signifikanter Unterschied nachweisen (Abb. 8 und 9). Jedoch konnte man bei zwei Patienten eine deutlich erhöhte Anzahl apoptotischer Zellkerne beobachten (Patient 1: 4.3%, Patient 2: 5.2%). Diese beiden Patienten waren ebenfalls positiv auf Autoantikörper gegen Oberflächenstrukturen differenzierter autonomer Neurone getestet worden. Bei den Kontrollprobanden fanden sich keine Anzeichen vermehrter Apoptoseprozesse.



Bar=30 μ m

Abbildung 8: DAPI-Färbung sympathischer Neuronen nach Inkubation mit einem Kontrollprobanden (links) und einem der beiden Patienten mit apoptotischem Effekt auf die Nervenzellen (rechts). Apoptotische Neuronen werden durch ihre kondensierten Zellkerne und das kondensierte Chromatin charakterisiert.

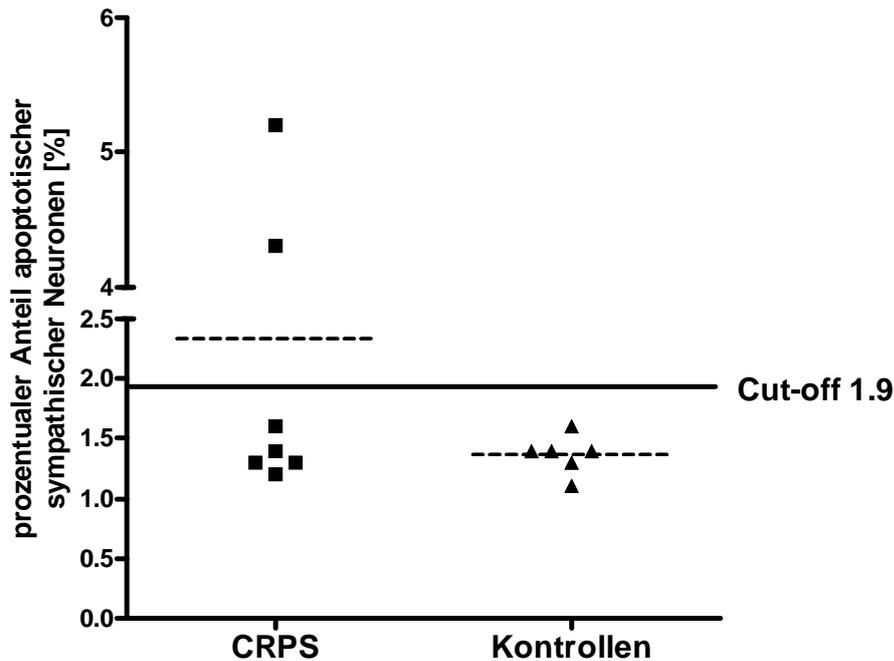


Abbildung 9: Prozentualer Anteil apoptotischer neuronaler Zellkerne nach Inkubation der sympathischen Neuronen mit IgG-Fractionen der CRPS-Patienten und Kontrollprobanden. Als positive Befunde wurden alle Ergebnisse eingeordnet, welche größer als die 3-fache Standardabweichung vom Mittelwert der Kontrollgruppe waren (hier markiert als durchgezogene Linie). Die Mittelwerte der einzelnen Gruppen sind als gestrichelte Linien dargestellt. Zwar ließ sich insgesamt kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen feststellen, so zeigten zwei Patienten nach IgG-Inkubation jedoch eine deutlich erhöhte Anzahl apoptotischer Sympathikusneuronen-Zellkerne.

3.2.3. Aktivierung des MAPKinaseweges

Um Funktionsänderungen der Zelle durch Autoantikörpereffekte zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit die Phosphorylierung von Enzymen des MAP (mitogen activated protein) Kinase-Pathway verwendet. Diese sind zwar ein unspezifischer, allerdings auch sehr sensibler Screeningparameter der Zelle auf externe Noxen.

Die Phosphorylierung des jeweiligen Schlüsselenzyms (ERK-1/2, p38) wurde durchflusszytometrisch nach Inkubation von sympathischen Neuronen mit den isolierten IgG-Fractionen gemessen.

3.2.3.1. Expressionsänderung von phosphoryliertem ERK-1/2

Untersucht wurde die Wirkung der IgG-Fractionen von CRPS-Patienten auf die Expression der phosphorylierten Form von ERK-1/2 im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. Nach 10 Minuten ließ sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der ERK-Phosphorylierung zwischen Kontrollgruppe (n=7; 99.3% ± 11.8%) und CRPS-Patienten (n=7; 94.6% ± 23.7%) feststellen (Abb.10 A) Nach 30 Minuten zeigte sich im Vergleich der beiden Gruppen das gleiche Ergebnis (Kontrollgruppe: 99.5% ± 2.9%; CRPS-Patienten: 96.8% ± 6.7%, nicht signifikant, Abb.10 B).

Auf Grund der Ergebnisse des Apoptoseassays, in welchem zwei der sieben CRPS-IgG-Fractionen positiv getestet wurden, untersuchte man diese auch nach 60 und 120 Minuten auf Veränderungen der ERK-1/2-Phosphorylierung. Hier fanden sich ebenso wie nach 10 und 30 Minuten keine Unterschiede zu den Kontrollprobanden. Bei den IgG-Fractionen der Kontrollprobanden zeigte keine Messung einen gesteigerte oder verminderte ERK-1/2-Phosphorylierung.

3.2.3.2. Expressionsänderung von phosphoryliertem p38

Untersucht wurde die Wirkung der IgG-Fractionen von den CRPS-Patienten auf die Expression der phosphorylierten Form von p38 im Vergleich zu den gesunden Kontrollen.

Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den CRPS-Patienten (n=7; 142.3% ± 120.8%) und der Kontrollgruppe (n=6; 99.9% ± 5.5%, Abb.11). Nur einer der beiden CRPS-Patienten, welche sowohl Oberflächenautoantikörper gegen das autonome Nervensystem aufwiesen wie auch im Apoptoseassay positiv getestet wurden, zeigte eine signifikante Steigerung der p38-Phosphorylierung (Patient 1: 316%).

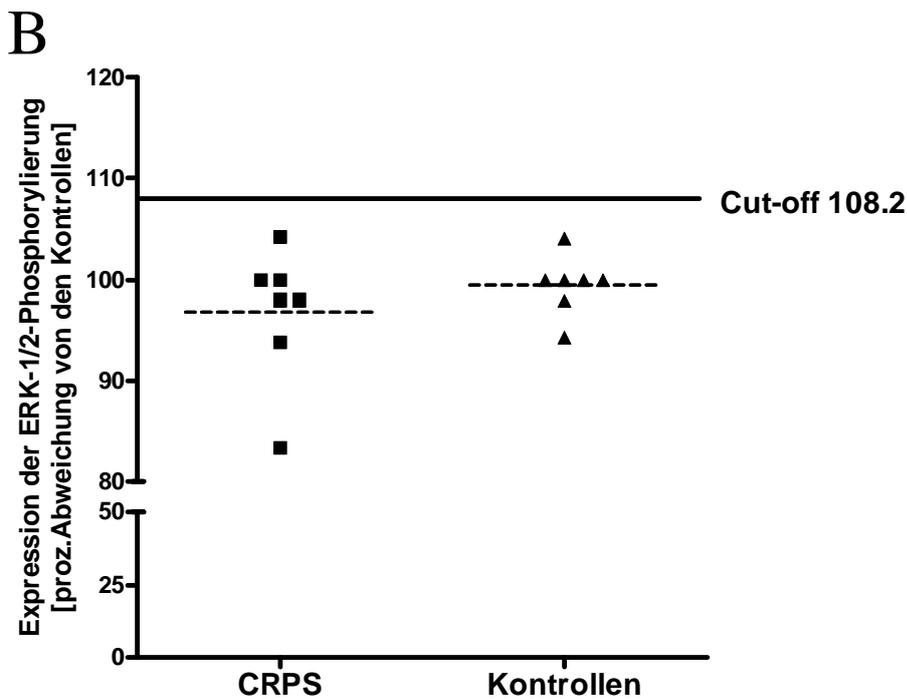
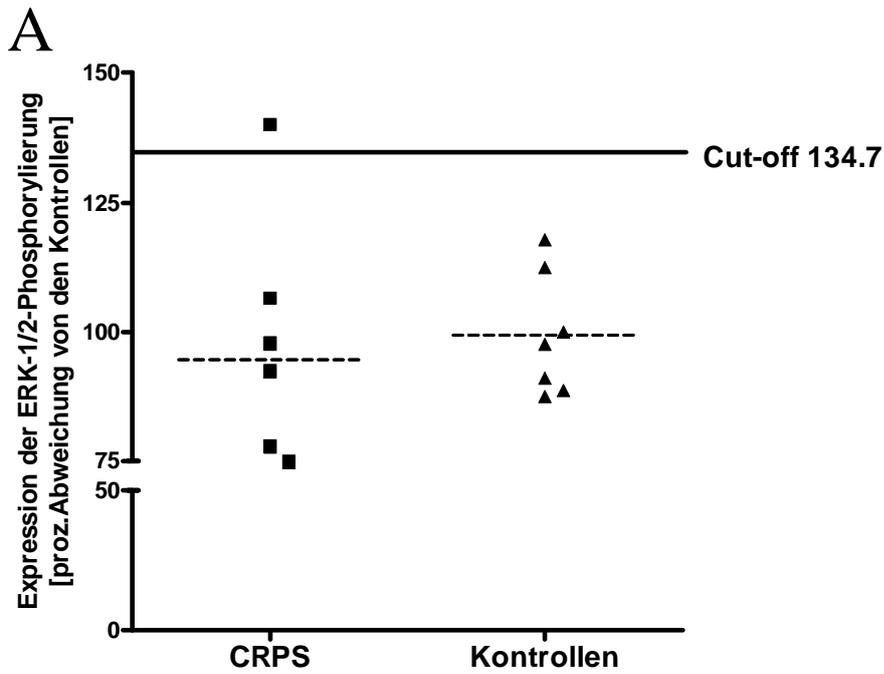


Abbildung 10: Expression der phosphorylierten Form von ERK-1/2 nach einer Inkubationszeit der Neuronen von 10 Minuten (A) und 30 Minuten (B) mit den IgG-Fractionen. Dargestellt als prozentuale Abweichung vom Mittelwert der Expression in der Kontrollgruppe, konnte keine signifikante Veränderung der ERK-1/2-Phosphorylierung zwischen den beiden Gruppen nachgewiesen werden. Als positive Befunde wurden alle Ergebnisse eingeordnet, welche größer als die 3-fache Standardabweichung vom Mittelwert der Kontrollgruppe waren (hier markiert als durchgezogene Linie). Die Mittelwerte der einzelnen Gruppen sind als gestrichelte Linien dargestellt.

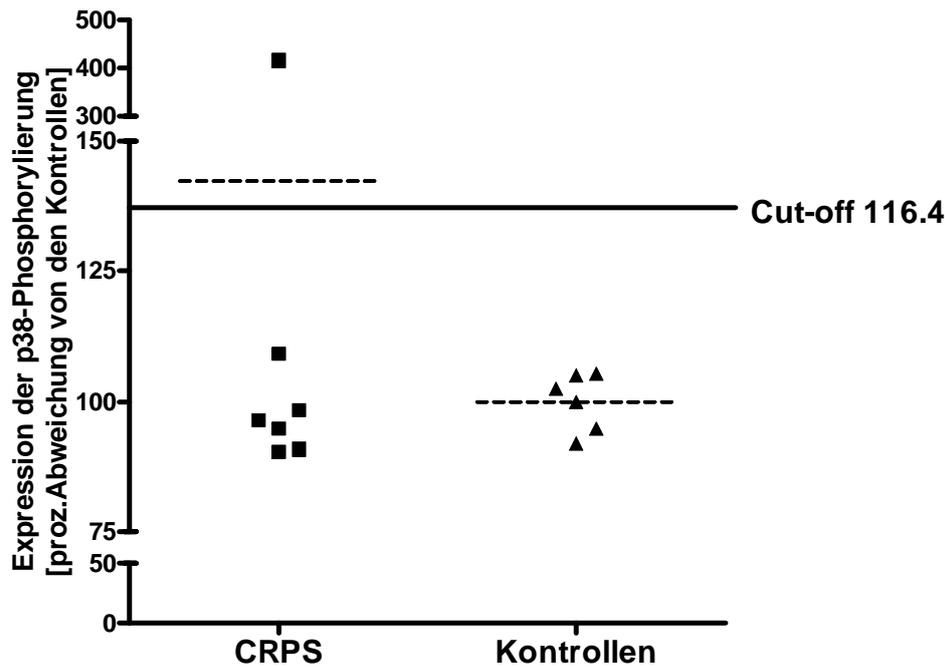


Abbildung 11: Expression der phosphorylierten Form von p38 (dargestellt als prozentuale Abweichung vom Mittelwert der Kontrollgruppe der Expression in der Kontrollgruppe) nach einer Inkubationszeit der sympathischen Neurone von 48 Stunden. Als positive Befunde wurden alle Ergebnisse eingeordnet, welche größer als die 3-fache Standardabweichung vom Mittelwert der Kontrollgruppe waren (hier markiert als durchgezogene Linie). Die Mittelwerte der einzelnen Gruppen sind als gestrichelte Linien dargestellt. Lediglich ein CRPS-Patient wies eine deutlich gesteigerte p38-Phosphorylierung auf.

3.3. Parvovirus-B19-IgG-ELISA

Mit Hilfe der ELISA-Diagnostik wurden die Seren der CRPS-Patienten auf IgG-Antikörper gegen Parvovirus B19 untersucht. Insgesamt fand man bei den CRPS-Patienten eine Seroprävalenz von 71.7%. In der Kontrollgruppe konnten dagegen im Vergleich nur 40% der Probanden positiv auf Parvovirus-B19-IgG getestet werden ($p < 0.01$, Abb. 12).

Die Parvovirus-IgG-Titer von CRPS-Patienten ($n=39$; 13.3 ± 18.6) und Kontrollprobanden ($n=30$; 14.6 ± 35.1) zeigten keinen signifikanten Unterschied.

Ferner war auffällig, dass alle CRPS Typ II-Patienten (11/11) positiv getestet wurden, jedoch nur 60.7% (17/28) der CRPS Typ I-Patienten ($p < 0.05$). Zwischen seropositiven und seronegativen Patienten ließ sich in Bezug auf die klinisch-epidemiologischen Daten kein signifikanter Unterschied feststellen (Tabelle 4).

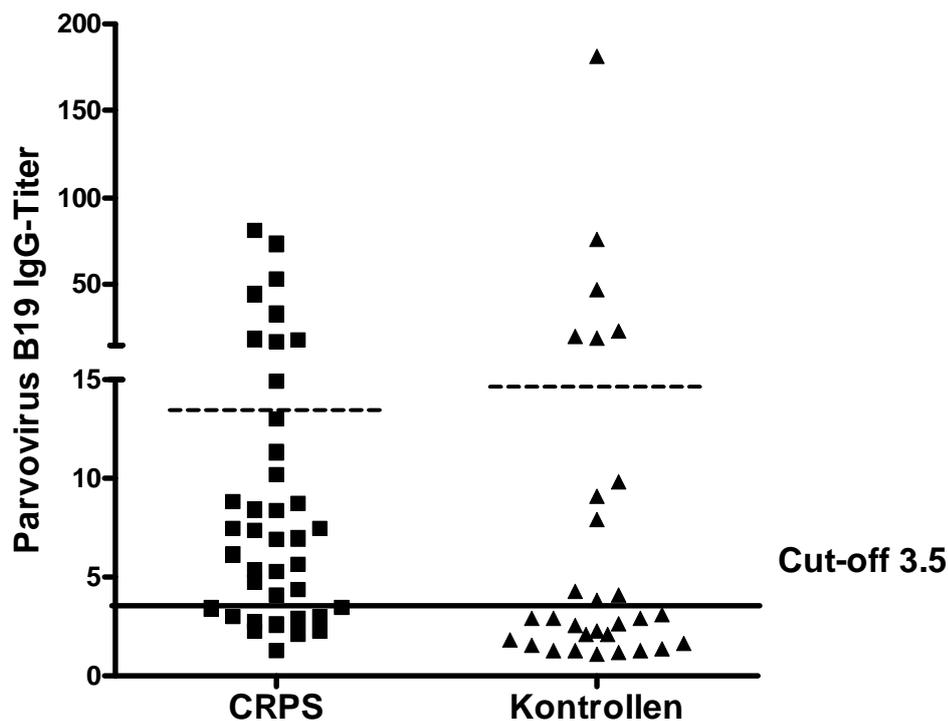


Abbildung 12: Parvovirus-B19-IgG-Titer von CRPS-Patienten und Kontrollprobanden. Zwar ließen sich in Bezug auf die Mittelwerte der Titer keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen feststellen, so wurden doch mehr CRPS-Patienten als Kontrollprobanden positiv auf Parvovirus-B19-IgG getestet ($p < 0.01$). Eine Konzentration größer als 3.5 U/mL wurde als positiver Befund gewertet (hier markiert als durchgezogene Linie). Die Mittelwerte der einzelnen Gruppen sind als gestrichelte Linien dargestellt.

Tabelle 4

Klinisch-epidemiologische Daten von Parvovirus-B19-seropositiver und -seronegativer CRPS-Patienten

	Parvovirus B19 (+)/n=28	Parvovirus B19 (-)/n=11	p
Alter	50.0 ± 13.1	58.9 ± 14.2	n.s.
Geschlecht	16 w/12 m	9 w/2 m	n.s.
CRPS-Typ	17 CRPS Typ 1 11 CRPS typ 2	11 CRPS Typ 1 0 CRPS Typ 2	<0.05
betroffene Extremität	24 oben/4 unten	7 oben/4 unten	n.s.
Zeit bis zur Serumanalyse	33.6 ± 38.3	28.3 ± 26.7	n.s.

3.4. Antiendotheliale Autoantikörper

Mittels ELISA-Verfahren und der Durchflusszytometrie wurden die CRPS-Patienten auf Autoantikörper gegen endotheliale Strukturen untersucht.

Es ließ sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen feststellen. Lediglich zwei der 39 CRPS-Patienten ($n=39, 488.1 \pm 872.6$) und einer der 30 Kontrollprobanden ($n=30, 316.8 \pm 448.1$) konnten positiv auf endotheliale Autoantikörper getestet werden (Abb.13).

In der Durchflusszytometrie zeigte sich auch, dass bei keinem der Patienten, welche auf antiendotheliale Autoantikörper positiv getestet wurden, die Bindungen direkt gegen Oberflächenepitope der Endothelzellen gerichtet waren.

Ferner konnte keine Korrelation zwischen seropositivem Parvovirus- B19-Befund und dem Vorhandensein von endothelialen Autoantikörpern nachgewiesen werden.

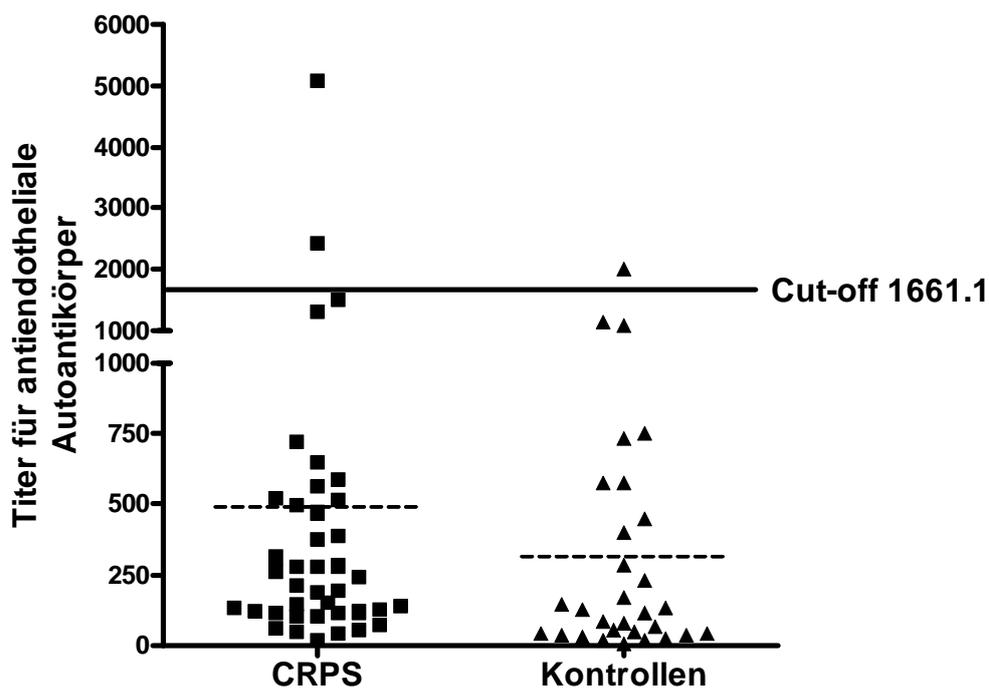


Abbildung 13: Untersuchung der CRPS-Patienten und Kontrollprobanden auf antiendotheliale Autoantikörper mittels ELISA. Als positive Befunde wurden alle Ergebnisse eingeordnet, welche größer als die 3-fache Standardabweichung vom Mittelwert der Kontrollgruppe waren (hier markiert als durchgezogene Linie). Die Mittelwerte der einzelnen Gruppen sind als gestrichelte Linien dargestellt.

4. Diskussion

4.1. Relevante Mechanismen in der Pathophysiologie des CRPS

Der Begriff des „Komplexen Regionalen Schmerzsyndroms“ umschreibt eine Schmerzerkrankung, welche sich in neuropathischen Spontanschmerzen, sowie Berührungs- und Belastungsschmerzen äußert. Zudem treten autonome Funktionsstörungen und motorischen Beeinträchtigungen auf. Auslöser sind meist geringgradige Traumen oder kleinere Operationen, wobei die Ausprägung der Symptome nicht im Verhältnis zu der Schwere der schädigenden Ursache steht.

Die Ätiologie des Syndroms ist seit den Erstbeschreibungen im 19. und 20. Jahrhundert jedoch nur ansatzweise geklärt. Diskutiert werden einerseits eine Dysfunktion des sympathischen Nervensystems und andererseits eine übermäßig starke Entzündungsreaktion durch ein auslösendes Trauma. Unklarheiten bestehen dabei insbesondere über das Zusammenspiel dieser beiden Komponenten in der Pathophysiologie des CRPS bzw. durch welche Mechanismen diese wiederum induziert werden.

Für die Hypothese eines sympathisch unterhaltenen Geschehens sprechen u.a. die Beobachtungen von Evans, welcher nach Sympathektomie eine deutliche Schmerzreduktion bei CRPS-Patienten feststellen konnte (Evans et al. 1946), sowie die klinischen Anzeichen einer vasomotorischen Instabilität und einer Hyperhidrose v.a. in der Akutphase der Erkrankung (Birklein et al. 1997, Wasner et al. 1999).

Für eine unverhältnismäßig stark ausgeprägte Entzündungsreaktion auf das Trauma spricht ein Großteil der klinischen Symptome des CRPS wie Schmerzen, Ödembildung, eine erhöhte Hauttemperatur und veränderte Durchblutungsverhältnisse (Veldman et al. 1993).

Zwar sind beim CRPS keine typischen Entzündungsmarker im klassischen Sinn nachweisbar, so konnten jedoch im Serum signifikant erhöhte Entzündungsmediatoren wie Interleukin 6 und TNF- α in den betroffenen Extremitäten der Patienten festgestellt werden (Huygen et al. 2002).

Weiterhin fanden sich Hinweise auf eine Beteiligung neurogener Entzündungsmechanismen wie einer erhöhten Freisetzung der Neuropeptide Substanz P oder CRGP, deren chronisch gesteigerte Produktion für die klinischen

Symptome einer Entzündungsreaktion beim CRPS verantwortlich sein könnten (Birklein et al. 2001, Leis et al. 2003). Diese werden durch Erregung nozizeptiver Fasern freigesetzt und führen unter anderem zu einer Histaminfreisetzung aus Mastzellen und konsekutiv zu Vasodilatation und vermehrter Plasmaextravasation. Neben dieser Entzündungstheorie wurde in den letzten Jahren grundsätzlich über eine mögliche Beteiligung des Immunsystems an der Pathogenese des CRPS diskutiert.

In diesem Zusammenhang fanden sich bei CRPS-Patienten Hinweise auf Assoziationen mit dem HLA-Allel DQ1 (Kemler et al. 1999), der Zentromerregion der HLA-Klasse-1-Antigene (van de Beek et al. 2003) sowie dem HLA-Allel DR13 (van Hilton et al. 2000). Insbesondere bei Patienten, welche im Verlauf ihrer Erkrankung eine multifokale oder generalisierte tonische Dystonie als klinische Symptomatik entwickelten, zeigte sich eine Assoziation mit dem HLA-Allel DR13.

Obwohl nicht jede HLA-Assoziation zwingend eine immunologische Ätiologie einer Krankheit impliziert, konnte in der Vergangenheit doch bei vielen – insbesondere autoimmunologisch-bedingten – Krankheiten dieser Zusammenhang nachgewiesen werden. Beispiele dafür sind der Diabetes mellitus Typ 1, bei dem ein gehäuftes Auftreten der HLA-Allele DR3 und DR4 gefunden wurde (Schober et al. 1981), sowie die Myasthenia gravis, die mit dem HLA-Allel DR3 assoziiert ist (Garlepp et al. 1983). Schließlich lassen sich auch in Bezug auf die Therapiemöglichkeiten Hinweise für eine Mitbeteiligung immunologischer Faktoren beim CRPS nachweisen. Neben der erwiesenen Wirksamkeit von Glukokortikoiden (Christensen et al. 1982, Braus et al. 1994) wurde in jüngster Zeit auch die Gabe von Immunglobulinen diskutiert (Goebel et al. 2005).

4.2. Autoantikörper gegen das autonome Nervensystem

In Hinblick auf den dargestellten Wissensstand untersuchte die Arbeitsgruppe Blaes in einer vorausgegangenen Studie 12 CRPS-Seren auf Antikörper gegen Strukturen des autonomen Nervensystems (Blaes et al. 2004). Dabei konnten mittels indirekter Immunfluoreszenz bei 5 von 12 CRPS-Patienten (1/6 CRPS Typ 1; 4/6 CRPS Typ 2) Antikörper gegen Strukturen des autonomen Nervensystems nachgewiesen werden.

Im Western Blot, bei welchem die Neuroblastomazelllinie SKN-SH als Antigen genutzt wurde, zeigten sich bei 91,6% (11 von 12) der Patienten Antikörper gegen verschiedene Proteine. Gegen ein 22kD Protein konnten bei über 50% der Patienten Reaktivitäten festgestellt werden; vier Patienten hatten eine 38kD-Reaktivität und vier Patienten eine 50kD-Reaktivität. Bis auf die 22kD-Bande, welche in der nicht-neuronalen Zelllinie HEK 293 gefunden wurde, waren alle anderen Reaktivitäten neuronal-spezifisch. Zusätzlich fanden sich bei einem CRPS-Patienten Antikörper gegen glatte Muskulatur (anti-smooth-muscel-antibodies (ASMA)) und bei drei weiteren CRPS-Patienten niedrig-titrige antinukleäre Antikörper (ANA).

Die pathogenetische Relevanz dieser direkt gegen nicht organspezifische, intrazelluläre Antigene gerichteten Antikörper ist dabei fraglich. So liegt deren Bedeutung bei den Kollagenosen und Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis, wie dem Lupus erythematodes (LE) oder dem Sjörgen-Syndrom, hauptsächlich in der Diagnostik (Übersicht in Fritzler 1996). Beim LE lassen sich bei fast allen Patienten und bei der Sklerodermie bei 40-70% der Patienten ANA nachweisen, die gegen ubiquitär vorkommende Zellkernbestandteile gerichtet sind. Auf der anderen Seite finden sich jedoch auch bei 2-6% aller gesunden Probanden über 65 und manchmal auch bei jüngeren Gesunden ANA im Serum (Azizah et al. 1996).

Kontrovers diskutiert wird dagegen die Rolle dieser Antikörper in der Pathogenese paraneoplastischer neurologischer Syndrome (PNS) bzw. als Begleiterscheinung von Tumorerkrankungen. Antikörper gegen neuronale Strukturen lassen sich bei etwa 50-60% der PNS-Patienten nachweisen (Wilkinson 1965, Moll et al. 1995, Antoine et al. 1999). Sie richten sich gegen Proteine, die sowohl im Nervensystem, wie auch im Tumor exprimiert werden, weswegen man als entscheidenden Mechanismus eine tumor-induzierte, kreuzreagierende Autoimmunreaktion vermutet (Dalmau et al. 1999, Darnell 1996). Außerdem ist in vielen Fällen das Vorkommen von organ-unspezifischen Autoantikörpern, wie z.B. antinukleäre Antikörper, bei Patienten mit PNS beschrieben (Moll et al. 1996).

In Bezug auf die pathogenen Effekte der antineuronalen und antinukleären Antikörper, welche beide an intrazellulär gelegene Proteine binden, bestehen in der Literatur aber widersprüchliche Aussagen. Zwar konnten in einigen Studien zytotoxische und Apoptose-induzierende Effekte nachgewiesen werden (Greenlee et al. 1993, Schäfer et al. 2000, DeGiorgio et al 2003), dessen ungeachtet ist weiterhin

im Grundsatz umstritten, ob diese Antikörper in vivo überhaupt in eine lebende Zelle eindringen können, um dort eine Wirkung zu erzielen (Verschuuren et al. 1997, Vincent et al. 1998).

Erwiesen sind jedoch pathologische Effekte von Autoantikörpern gegen Oberflächenstrukturen von Zellen (Watermann et al. 2001, Goldblatt et al. 2002). Beim Nervensystem ist die Myasthenia gravis eine der prominentesten Beispiele. Bei dieser Erkrankung führen Antikörper gegen den postsynaptischen Acetylcholin-Rezeptor zu einer Blockierung und Internalisierung des Rezeptors. Die Folge ist eine neuromuskuläre Übertragungsstörung, welche typischerweise im Tagesverlauf zu einer zunehmenden Muskelschwäche führt (De Beets et al. 2002). Eine ähnliche klinische Symptomatik hat das Lambert-Eaton-Myasthenie-Syndrom (LEMS). Hierbei kommt es zu einer Antikörper-vermittelten Immunreaktion gegen die $\alpha 1a$ -Untereinheit präsynaptischer, spannungsabhängiger P/Q-Typ-Kalziumkanäle. Neben der direkten Blockierung von Kanälen werden außerdem Proteine nach Quervernetzung durch die Antikörper internalisiert und finden sich somit in verminderter Anzahl an der Synapse. Es kommt zu einer Funktionsstörung an neuromuskulären Synapsen und Synapsen des autonomen Nervensystems, wodurch sich schließlich die klinische Symptomatik der LEMS-Patienten erklären lässt (Newsom-Davis et al. 1982, Pinto et al. 1998, Lang et al. 2003).

Hinsichtlich des autonomen Nervensystems konnte bei der autonomen Neuropathie eine pathogenetische Relevanz von Autoantikörpern nachgewiesen werden. Die klinische Symptomatik in Form einer autonomen Dysfunktion manifestiert sich bei dieser Erkrankung unter anderem in einer Störung der Schweißsekretion, einer orthostatischen Hypotonie sowie einer reduzierten Speichel- und Tränensekretion. Vernino konnte bei über 50% der Patienten Autoantikörper gegen Acetylcholin-Rezeptoren von neuronalen Ganglienzellen nachweisen (Vernino et al. 2000). Die Ausprägung der klinischen Symptomatik korrelierte dabei mit der Konzentration der Autoantikörper. Ferner zeigte sich, dass die Autoantikörper bei einem Großteil der Patienten an die alpha-3-Untereinheit des Acetylcholin-Rezeptors binden (Vernino et al. 2008).

Ausgehend von diesem aktuellen Wissensstand wurde in der vorliegenden Arbeit die Hypothese überprüft, das CRPS sei bei einem Teil der Patienten mit dem Auftreten von Oberflächenautoantikörpern gegen das autonome Nervensystem assoziiert. Es

zeigte sich, daß CRPS-Patienten Autoantikörper direkt gegen Oberflächenstrukturen sympathischer Neuronen besitzen, nicht aber gegen die nicht-neuronale Zelllinie HEK 293. Diese Ergebnisse legen nahe, dass bei einem Teil der Patienten autoimmunologische Prozesse gegen differenzierte autonome Nervenzellen an der Pathogenese des CRPS beteiligt sind.

Außerdem wurde die klinische Symptomatik zwischen Patienten mit negativen oder positiven Oberflächenautoantikörperbefunden verglichen. In der Vergangenheit konnten in einem Open-field-Experiment abnorme Verhaltensweisen bei Mäusen festgestellt werden, welche IgG-Fractionen aus CRPS-Seren injiziert bekommen hatten (Goebel et al. 2005). Kurz nach den Injektionen wurde beobachtet, dass die Mäuse zu zittern begannen, sich krümmten und in ihren Bewegungen reduziert waren. Koordinationsstörungen oder motorische Defizite konnten nicht festgestellt werden. In der vorliegenden Arbeit zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patientengruppen.

Insgesamt ist die Rolle der Autoantikörper in der Pathophysiologie des CRPS als noch vollkommen unklar zu bezeichnen. Auf Grund des Nachweises von Autoantikörpern, die spezifisch gegen das autonome Nervensystem gerichtet sind und nicht gegen nicht-neuronale Zelllinien, lässt sich aber bei einem Teil der CRPS-Patienten eine pathogenetische Relevanz von Autoantikörpern gegen autonomes Nervensystem vermuten. Für die Zukunft bleibt die Aufgabe, die verantwortlichen Autoantigene zu identifizieren.

4.3. Zytotoxische und Apoptose-induzierende Effekte von Autoantikörpern

Basierend auf dem Nachweis von Autoantikörpern sowohl gegen Oberflächenepitope als auch intrazelluläre Strukturen, wurde im Folgenden untersucht, welche pathogenen Effekte CRPS-IgG-Fractionen auf autonome Nervenzellen haben.

Die Rolle von Autoantikörpern ist bei vielen Autoimmunerkrankungen kontrovers diskutiert. So sind lediglich in einigen Fällen die Funktion und die Wirkungsmechanismen geklärt. Wie bereits in vorherigen Abschnitten beschrieben binden zum Beispiel bei der Myasthenia gravis oder dem Lambert-Eaton-Syndrom die Antikörper an spezifische Rezeptoren und rufen dadurch Veränderungen der Zellfunktion hervor, zerstören diese aber nicht. Bei anderen Krankheiten stellen

Autoantikörper dagegen oftmals lediglich nur ein diagnostisches Hilfsmittel dar, die eigentlichen pathogenen Effekte werden durch zytotoxische T-Zellen vermittelt.

Schließlich werden bei vielen Autoimmunerkrankungen auch unmittelbare zytotoxische Effekte auf die Zielzellen durch Antikörper vermutet. Der direkte Nachweis fehlt jedoch oft bzw. ist schwer durchzuführen. Besonderes Augenmerk galt dabei in den letzten Jahren dem Stellenwert Apoptose-induzierender Effekte in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen. Apoptose oder programmierter Zelltod ist in allen Geweben ein relativ konstant ablaufender Prozess; der Körper reguliert dadurch die Anzahl der Zellen oder erleichtert sich damit die Umorganisation von Gewebe. Die Apoptose ist zum Beispiel verantwortlich für das Absterben der ältesten Zellen im Darmepithel, aber auch für die Vernichtung autoreaktiver Immunzellen während der Reifung im Knochenmark und Thymus. Außerdem wird der Apoptose eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie vieler Autoimmunerkrankungen zugeschrieben, was jedoch in den meisten Fällen nicht belegt ist (Janeway et al. 2002).

Zumindest ansatzweise untersucht sind, trotz vieler widersprüchlicher Aussagen, zytotoxische bzw. apoptotische Effekte durch Autoantikörper bei den paraneoplastischen Syndromen.

So konnte gezeigt werden, dass sowohl antineuronal-positive Patientenserum als auch die IgG-Fractionen von Patienten mit paraneoplastischen neurologischen Syndromen einen zytotoxischen Effekt auf Primärkulturen von Plexus myentericus-Neuronen haben. Dieser Effekt war sowohl dosisabhängig, als auch komplement-unabhängig, sodass von einem direkten Effekt der Autoantikörper auszugehen ist (Schäfer et al. 2000). Schon in früheren Studien war ein zytotoxischer Effekt antineuronaler Autoantikörper auf primärkultivierte Granularisneurone des Kleinhirns nachweisbar (Greenlee et al. 1993). Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch eine Studie, welche eine Apoptose-Induktion durch anti-Hu-positive Serum an primärkultivierten Neuronen des Plexus myentericus und der Neuroblastomazelllinie SY5Y nachweisen konnten (DeGiorgio et al. 2003). Ferner konnte eine Apoptose-Induktion retinaler Neurone durch Autoantikörper gegen das intrazelluläre Protein Recoverin bei der paraneoplastischen Retinadegeneration aufgezeigt werden (Adamus et al. 1994, Adamus et al. 1997).

Im Gegensatz dazu konnte ein pathogener Effekt von antineuronalen Antikörpern auf Tumorzellen nicht nachgewiesen werden. So konnte die Arbeitsgruppe Verschuuren

keine Effekte ant-Hu-positiver IgG-Fractionen auf verschiedene kleinzellige Bronchialkarzinom-Zelllinien nachweisen (Verschuuren et al. 1997). Ein methodisches Problem dieser Arbeit bestand jedoch darin, dass die IgG-Fractionen nicht mit Protein G sondern mit Protein A aufgereinigt wurden, wodurch die Subklasse IgG₃ fehlte. Antineuronale Antikörper gehören hauptsächlich dieser Subklasse an, sodass der fehlende Nachweis zytotoxischer Effekte hauptsächlich durch den Verlust dieser IgG₃ bedingt sein könnte (Jean et al. 1994).

In der vorliegenden Arbeit konnten mittels Trypan-Blau-Färbung keine zytotoxischen Effekte der CRPS-IgG-Fractionen auf Zellen des sympathischen Nervensystems nachgewiesen werden. Auch zeigten sich mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI, mit dem die Zellkernmorphologie und die Kondensation der Zellkerne dargestellt werden kann, keine signifikanten Unterschiede zwischen CRPS-Patienten- und Kontrollprobanden-IgG in Bezug auf neuronale Apoptoseprozesse.

Es war jedoch auffällig, dass bei den beiden IgG-Fractionen der Seren, bei welchen zwischen Auftreten des CRPS und Entnahme des Serums die geringste Zeitdauer vergangen war, nach 72 Stunden eine deutlich gesteigerte proapoptotische Aktivität festzustellen war. Diese erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen widerspricht den Ergebnissen der Trypan-Blau-Färbung. Da mit dieser zweiten Methode im Prinzip ausschließlich tote Zellen gezählt werden, hätte deren Anzahl theoretisch bei den beiden genannten Patienten erhöht sein müssen. Als Ursache für diese Diskrepanz kann die höhere Sensitivität der DAPI-Färbung vermutet werden.

Da die beiden Patienten mit erhöhten Apoptoseraten ebenfalls positiv auf Oberflächenautoantikörper gegen das autonome Nervensystem getestet wurden, lassen sich unter Beachtung des genannten Faktors eines geringeren Zeitabstandes zum Erkrankungsbeginn, Assoziationen von Antikörper-medierten Effekten mit einer erhöhten Zahl apoptotischer Zellen bei einem Teil der CRPS-Patienten vermuten. Zumindest müsste die Fragestellung in Bezug auf die vorhandenen Ergebnisse mit Proben von insgesamt wesentlich geringerem Zeitabstand zum Erkrankungsbeginn sowie einer sensitiveren Meßmethode überprüft werden, um eindeutig belegen zu können, dass Patienten in der Akutphase der Erkrankung mehr funktionell wirksame Autoantikörper haben.

4.4. Effekte von Autoantikörpern auf zellbiologische Funktionen

In Hinblick auf den dargestellten Wissenstand wird deutlich, wie schwierig es ist, Autoantikörper-mediierte Effekte zu erfassen. Ferner scheint die im letzten Abschnitt bearbeitete Fragestellung, ob Autoantikörper zytotoxisch auf bestimmte Zellen wirken oder nicht, zu ungenau. So konnten in den letzten Jahren eine Vielzahl von Autoimmunreaktionen gegen spezifische Rezeptorproteine nachgewiesen werden, welche zu erheblichen Störungen der Zellfunktion, aber nicht zum Tod der Zelle führen. Beispiele dafür sind die Myasthenia gravis und das Lambert-Eaton-Syndrom, an welchen gezeigt werden konnte, dass Autoantikörper pathogen wirksam sein können, ohne die Zelle einer erhöhten Zytotoxizität auszusetzen. Zwar blockieren die anti-AchR-Antikörper den Acetylcholin-Rezeptor und führen zu einer Internalisierung quervernetzter Rezeptoren, allerdings wirken sie nicht zytotoxisch auf die quergestreiften Muskelzellen (Übersicht in Vincent et al. 1998). Da ein zytotoxischer bzw. Apoptose-induzierender Effekt von IgG-Fractionen aus CRPS-Seren auf differenzierten Zellen des sympathischen Nervensystems nur bei einzelnen Patienten nachgewiesen werden konnte, wurden in dieser Arbeit auch die Effekte von CRPS-IgG auf zellbiologische Funktionen untersucht.

Als Screeningparameter für Funktionsänderungen der Zelle wurde in der vorliegenden Arbeit die Phosphorylierung von Enzymen des MAP (mitogen activated protein) - Kinase-Pathway genutzt. Dieser gehört zu einer Reihe von Proteinkinase-Kaskaden, über deren Aktivierung die Veränderung zellbiologischer Parameter, wie Wachstum und Differenzierungsgrad, durch äußere Reize vermittelt wird. Da Reaktionen auf äußere Reize schnell erfolgen müssen, wird deren Aktivität nicht über eine Änderung des Expressionslevels gesteuert, sondern durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung der entsprechenden Schlüsselenzyme (Übersicht in Su et al. 1996). Durch Aktivierung dieser second-messenger-pathways werden die Informationen schließlich von außen an den Zellkern übermittelt, wodurch dann die Zelle mit vermehrter oder verminderter Translation bestimmter Gene auf diesen extrazellulären Stimulus reagieren kann. Trotz der geringen Spezifität stellen diese Proteinkinase-Kaskaden auf Grund ihrer hohen Sensitivität auf äußere Stimuli einen wichtigen Marker bei der Beurteilung von Funktionsänderungen der Zelle durch äußere Reize dar.

Eine der wichtigsten Gruppen von Proteinkinasewegen sind die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK), welche sowohl in neuronalen als auch nicht-neuronalen Zellen vorkommen. Innerhalb dieser Gruppe gibt es fünf wichtige Pathways, die nach ihren Schlüsselenzymen benannt wurden (Abbildung 14).

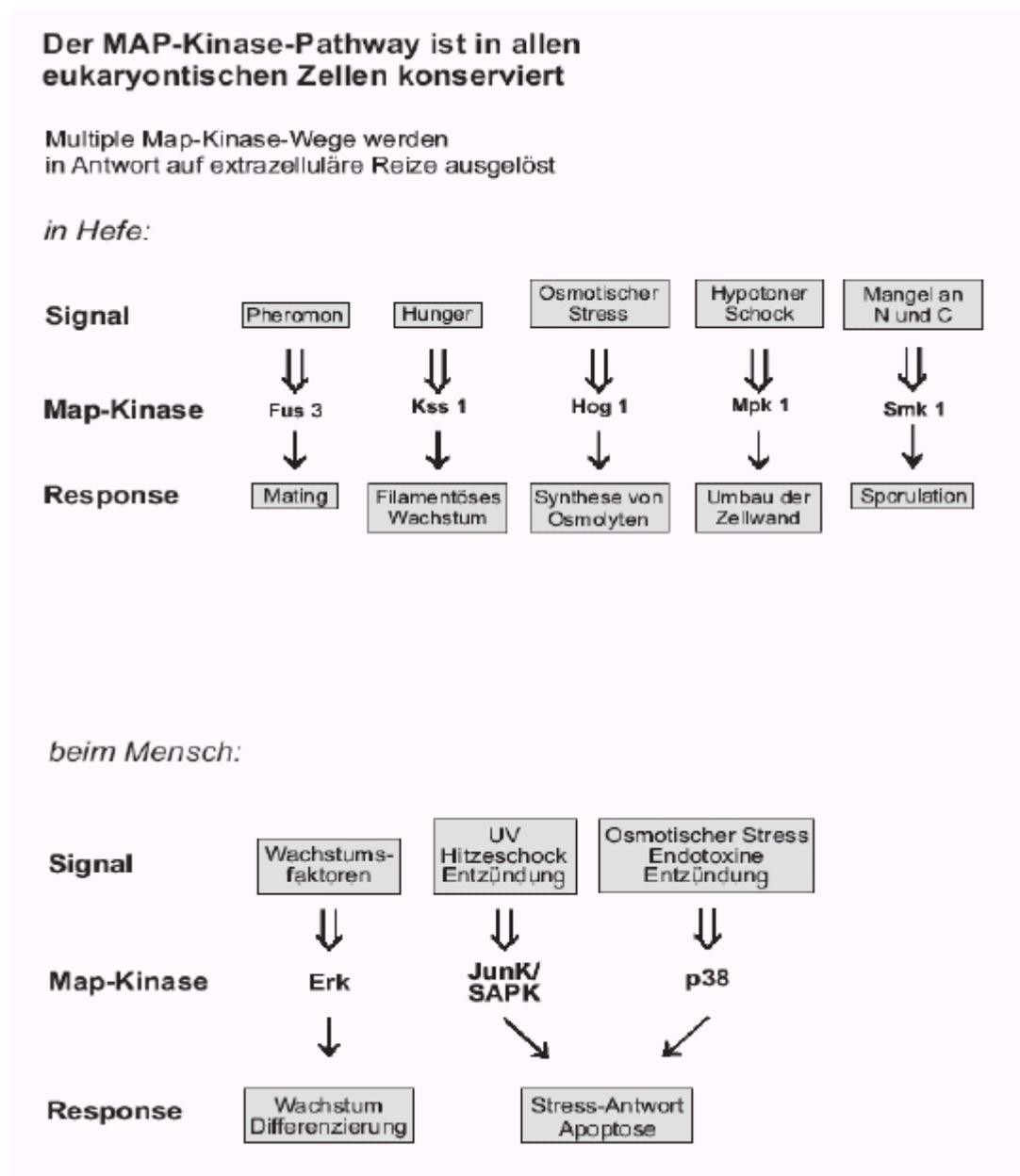


Abbildung 14: Der MAPKinase-Pathway übermittelt Informationen von außerhalb der Zelle nach intrazellulär. Vorhanden ist er in allen eukaryontischen Zellen. Unterschiede bestehen jedoch hinsichtlich der ausführenden Endstrecke und der Antwort auf die Aktivierung. Beim Menschen gibt es drei wichtige Effektoren der MAPKinase: p38 und Junk/SAPK sind zumeist mit apoptotischen Prozessen assoziiert, während ERK-1/2 unspezifisch auf verschiedene Reize reagiert und eine Differenzierung der Zelle induziert (Widmann et al. 1999).

Dazu gehören ERK-1/2, ERK-3/4, ERK-5, p38 und SAP/JNK, welche auf verschiedene extrazelluläre Reize wie Zytokine, Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter oder Hormone reagieren. Dabei ist die Aktivierung von p38 oder SAP/JNK zumeist mit einer proapoptotischen Wirkung assoziiert, während die Stimulation von ERK-1/2 eher zu Wachstum und Differenzierung der Zelle führt (Cross et al. 2000). In neuronalen Zellen konnte jedoch auch eine erhöhte Vulnerabilität nach Aktivierung von ERK-1/2 nachgewiesen werden (Runden et al. 1998, Murray et al. 1998).

Die p38-Kaskade wird ebenso wie die JNK-Kaskade hauptsächlich durch proinflammatorische Zytokine, wie TNF- α , IL-1 und Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert (Tibbles et al. 1999, Han et al. 1994), die ERK-1/2 Kaskade zumeist durch Mitogene und Wachstumsfaktoren (Su et al. 1996).

Schließlich wurde in jüngerer Zeit auch untersucht, in welchem Maße Autoantikörper diese Proteinkinase-Kaskaden beeinflussen. So konnte bei entzündlichen Systemerkrankungen eine Beeinflussung des Phosphorylierungszustandes und damit der Aktivität einzelner Schlüsselenzyme des MAP-Kinase-Pathway durch Autoantikörper nachgewiesen werden (Vega-Ostertag et al. 2004). Beim Morbus Behcet konnte eine endotheliale Phosphorylierung von ERK-1/2 durch Autoantikörper nachgewiesen werden (Lee et al. 2002). Auffallend war in diesem Fall insbesondere die sehr kurze Zeitspanne von lediglich 10 Minuten bis zur Aktivierung von ERK-1/2. Trotz anschließend wiederum schneller Deaktivierung der ERK-1/2-Kaskade, zeigten sich im weiteren Verlauf jedoch längerdauernde Expressionsänderungen von Oberflächenproteinen. Ebenfalls nachgewiesen wurde die Zunahme der Phosphorylierung von ERK-1/2 bei Kindern mit einem Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom (Fühlhuber et al., persönliche Mitteilung).

Über die Aktivierung von p38 durch Autoantikörper wurde ebenso berichtet. So konnte in Thrombozyten nach 60 Minuten einer Steigerung der p38-Phosphorylierung durch Antiphospholipid-Antikörper nachgewiesen werden. (Vega-Ostertag et al. 2004). Ferner zeigte sich auch nach Inkubation mit anti-Hu-positiven IgG-Fractionen von PNP-Patienten eine deutliche Steigerung der p38-Phosphorylierung bei Plexus-myentericus-Neuronen (Tschernatsch et al., unpublizierte Daten).

In der vorliegenden Arbeit konnte kein Antikörper-mediierter Effekt auf die Phosphorylierung von p38 und ERK-1/2 nachgewiesen werden. Lediglich einer der

beiden CRPS-Patienten, bei welchen mittels DAPI-Färbemethode eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen nachgewiesen werden konnte, zeigte eine erhöhte Aktivierung der p38-Phosphorylierung. Letztendlich ist also ebenso wie bei den Zytotoxizitäts-/Apoptoseassays darauf zu verweisen, dies mit Proben von akuten CRPS-Erkrankungen zu untersuchen. Ferner sollte beachtet werden, dass trotz der hohen Sensitivität dieser genannten Marker, stattgefundenen Veränderungen sehr schwierig nachweisbar sind, da deren Aktivierungsdauer und somit auch Nachweisbarkeit oftmals nur von sehr kurzer Zeit ist.

4.5. Die Rolle von Viren in der Pathogenese des CRPS

Zumindest bei einem Teil der Patienten ist, in Hinblick auf den dargestellten Wissensstand, Autoimmunität in Form Antikörper-vermittelter Prozesse an der Pathogenese des CRPS beteiligt. Ungeklärt ist jedoch die Funktion der Antikörper und auf Grund welcher Ursache deren Produktion induziert wird.

Hinweise darauf geben Studien, welche eine durchlittene bzw. in der Akutphase der Erkrankung erworbene Infektion als prädisponierenden Faktor für das CRPS vermuten. Im Sinne der „Molecular-Mimikry“-Hypothese, die von einem kreuzreagierenden Antigen zwischen Infektionserreger und Körperzelle ausgeht, könnte durch eine vorausgehende Infektion in Kombination mit anderen Faktoren die Bildung von Autoantikörpern induziert werden.

Prominente Belege für diesen Mechanismus sind das rheumatische Fieber (Cunningham et al. 2000) und das Guillian-Barre-Syndrom. Letzteres ist eine monophasische, demyelinisierende Erkrankung des peripheren Nervensystems, welche mit aufsteigenden Lähmungen, Areflexie und Sensibilitätsstörungen einhergeht. Ursache ist die Zerstörung der Myelinscheiden der peripheren Nerven. In den Myelinscheiden sind Ganglioside eingelagert, die zur Proteinfamilie der Sialinsäure-substituierten Glycosphingolipiden gehören. Oligosaccharide in der Oberfläche von *Campylobacter* spp. sind ebenfalls Sialinsäure-substituiert und somit der Struktur der Ganglioside sehr ähnlich. Kommt es zur Antikörperbildung gegen die Oberflächenstrukturen des *Campylobacter*, so können diese ebenfalls die Ganglioside der Myelinscheiden angreifen (Nachamkin et al. 2000, Hughes et al. 2000, Kist et al. 2002).

Bei CRPS-Patienten wies Goebel bei einer Vielzahl von Patienten, welche kürzer als 18 Monate unter der Krankheit litten, erhöhte IgA-Antikörpertiter gegen *Campylobacter* nach. Ferner zeigten sich in der indirekten Immunfluoreszenz bei diesen Patienten im erhöhten Maße Antikörper gegen verschiedene Gewebe der Maus (Goebel et al. 2005).

Eine andere Arbeit konnte dagegen bei CRPS-Seren eine erhöhte Prävalenz für Parvovirus B19 feststellen (van de Vusse et al. 2001). In dieser Studie wurde jedoch ein historisches Patientenkollektiv verwendet. Trotzdem wurde der Ansatz in der vorliegenden Arbeit aufgegriffen, indem die Seren der CRPS-Patienten auf IgG-Antikörper gegen Parvovirus B19 untersucht wurden. Dabei konnten die Ergebnisse von van de Vusse bestätigt werden. Insbesondere bei CRPS-Typ-2-Patienten (11/11) konnte eine erhöhte Seroprävalenz für Parvovirus B19 festgestellt werden.

Letzteres könnte Hinweis für einen prädisponierenden Faktor sein. So ist zu vermuten, dass hauptsächlich CRPS-Typ-2-Patienten zu der Teilgruppe von CRPS-Patienten gehören, deren klinische Symptomatik durch einen postinfektiösen autoimmunologischen Prozess unterhalten wird.

Der Parvovirus B19 ist hauptsächlich Verursacher des Erythema infectiosum, welches mit grippeähnlichen Symptomen, Arthropathien und einem girlandenförmigen Erythem verbunden sein kann. Komplikationen der Erkrankung sind aplastische Krisen sowie der Hydrops fetalis während einer Schwangerschaft. In seltenen Fällen ist auch die Beteiligung des zentralen Nervensystems sowohl bei Kindern als auch Erwachsenen beschrieben (Isumi et al. 1999). Es konnten Assoziationen zu Enzephalitiden (Balfour et al. 1970), Enzephalopathien (Hall et al. 1977, Walsh et al. 1988, Umene et al. 1995), aseptischen Meningitiden (Cassinotti et al. 1993, Okumura et al. 1993) und okulären Neuropathien (Corridan et al. 1991) nachgewiesen werden.

Außerdem wird auch über Neuropathien des Plexus brachialis (Denning et al. 1987, Pellas et al. 1993, Puechal et al. 1998), rezidivierende Parästhesien (Faden et al. 1992) und Taubheits- bzw. Kribbelgefühle in den Fingern (Faden et al. 1990) berichtet. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der Parvovirus B19 die Produktion von Autoantikörpern induzieren kann (Kerr et al. 1996, Lunardi et al. 1998). In diesem Zusammenhang sind Assoziationen mit der Rheumatoiden Arthritis

(Goldstein et al. 1996), Lupus-ähnlichen Symptomen (Tanaka et al. 1998) und Vaskulitiden beschrieben worden (Holm et al. 1995, Lhote et al. 1995).

In Bezug auf letztere wurde bei Patienten mit systemischer Sklerodermie eine erhöhte Seroprävalenz für Parvovirus B19 sowie dessen DNA in Endothelzellen nachgewiesen. Im Sinne der „Molecular-Mimikry“-Hypothese wurde als Ursache ein kreuzreagierendes Antigen zwischen Virus und Endothelzelle vermutet (Magro et al. 2004). Durch Viren induzierte Autoimmunität gegen Endothelzellen konnte in der Vergangenheit ebenfalls schon bei Hepatitis C und Zytomegalievirus-Infektionen beschrieben werden (Toyoda et al. 1999; Cacoub et al. 1999).

Auf Grund dieser Tatsachen sowie Hinweisen für eine endotheliale Dysfunktion in der betroffenen Extremität von CRPS-Patienten (Dayan et al. 2008, Schattschneider et al. 2006) wurden die Seren der CRPS-Patienten in der vorliegenden Arbeit auf Antikörper gegen endotheliale Strukturen untersucht. Es ließ sich jedoch im Vergleich zur Kontrollgruppe keine erhöhte Prävalenz für antiendotheliale Antikörper bei den CRPS-Patienten nachweisen. Daraus ist zu schließen, dass Autoimmunität gegen endotheliale Strukturen im Falle des CRPS nicht mit einer positiven Serologie für Parvovirus B19 assoziiert ist bzw. eine endotheliale Dysfunktion in der betroffenen Extremität nicht durch antiendotheliale Antikörper verursacht zu sein scheint.

Zusammenfassend lässt sich trotzdem der Verdacht äußern, dass CRPS ist assoziiert mit einer erhöhten Seroprävalenz für Parvovirus B19. Dies könnte Hinweis sein für eine mögliche ätiologische Relevanz viral-induzierter autoimmunologischer Phänomene bei einem bestimmten Teil der CRPS-Patienten. So könnte sich eine subklinisch-verlaufende Parvovirusinfektion mehrere Monate oder Jahre später in Kombination mit anderen ebenso unklaren Faktoren im CRPS manifestieren, möglicherweise durch eine Kreuzreaktivität mit dem autonomen Nervensystem. Dies ist jedoch ebenso wenig untersucht, wie die Rolle anderer Infektionserreger. So konnte neben dem Parvovirus B19 auch eine erhöhte Seroprävalenz für *Campylobacter* in einer Studie nachgewiesen werden (Goebel et al. 2005).

Ferner wäre interessant, die Seroprävalenzen für Parvovirus B19 und *Campylobacter* bei den untersuchten Patienten- bzw. Kontrollgruppen mit den weltweiten Seroprävalenzen für diese Infektionserreger zu vergleichen, um mögliche epidemiologische oder geographische Zusammenhänge offen legen zu können.

Schließlich ist zu überprüfen, ob bestimmte Faktoren mit einem positiven Parvovirus-B19-Nachweis assoziiert sind. In der vorliegenden Studie konnte diesbezüglich

gezeigt werden, dass hauptsächlich CRPS Typ 2-Patienten positiv auf Parvovirus B19 getestet wurden. Eine Infektion mit Parvovirus B19 könnte folglich ein prädisponierender Faktor für die Erkrankung an einem CRPS vom Typ 2 sein.

In Zusammenschau mit den anderen Ergebnissen der vorliegenden Arbeit liegt die Vermutung nahe, dass bei einem Teil der Patienten autoimmunologische Prozesse an der Pathogenese des CRPS beteiligt sind. So konnte gezeigt werden, dass CRPS-Patienten Autoantikörper direkt gegen Oberflächenstrukturen differenzierter sympathischer Neuronen besitzen, jedoch keine spezifischen Antikörper gegen die nicht-neuronale Kontrollzelllinie HEK 293. Hinsichtlich der funktionellen Effekte der Antikörper konnten keine sicheren Schlüsse gezogen werden. In Zukunft sollte neben der Untersuchung einer möglichen viral-induzierten Genese des CRPS die Identifikation von möglichen Oberflächenantigenen sowie die Überprüfung ihrer funktionellen Relevanz Gegenstand der Forschung sein.

5. Literaturverzeichnis

1. Adamus G, Ortega H, Witkowska D, Polans A. Recoverin: a potent uveitogen for the induction of photoreceptor degeneration in Lewis rats. *Exp Eye Res* 1994; 59:447-455
2. Adamus G, Machnicki M, Seigel GM. Apoptotic retinal cell death induced by antirecoverin autoantibodies of cancer-associated retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997 ; 38: 283-291
3. Ali Z, Raja SN, Wesselmann U, Fuchs P, Meyer RA, Campell JN. Intradermal injection auf norepinephrine evokes pain in patients with sympathetically maintained pain. *Pain* 2000; 88 (3): 161-168
4. Antoine JC, Mosnier JF, Absi L, Convers P, Honnorat J, Michel D: Carcinomaassociated paraneoplastic peripheral neuropathies in patients with and without anti-onconeural antibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999; 67: 7-14
5. Arias LM, Frank E, Rogers K, Santo J, Grossmann K. Sulfentanil sympathetic ganglia injection in patients with reflex sympathetic dystrophy. *Reg Anaesth* 1990; 14: 90-92
6. Azizah MR, Azila MN, Zulkifli MN, Norita TY. The prevalence of antinuclear, anti-dsDNA, anti-Sm and anti-RNP antibodies in a group of healthy blood donors. *Asian Pac J Allergy Immunol* 1996; 14: 125-128
7. Balfour HHJ, Schiff GM, Blomm JE. Encephalitis associated with erythema infectiosum. *J Pediatr* 1970; 77: 133-6
8. Baron R, Jänig W. Schmerzsyndrome mit kausaler Beteiligung des Sympathikus. *Anästhesist* 1998; 47/1: 4-23
9. Baron R, Levine JD, Fields HL. Causalgia and reflex sympathetic dystrophy: does the sympathetic nervous system contribute to the generation of pain? *Muscle Nerve* 1999. 22: 678-695
10. Birklein F, Claus D, Riedl B, Neundorfer B, Handwerker HO. Effects of cutaneous histamine application in patients with sympathetic reflex dystrophy. *Muscle Nerve* 1997; 20 (11): 1389-1395
11. Birklein F, Riedl B, Griessinger N, Neundörfer B. Komplexes regionales Schmerzsyndrom- Klinik und autonome Störungen während akuter und chronischer Krankheitsstadien. *Nervenarzt* 1999; 70: 335-341

12. Birklein F, Schmelz M, Schifter S, Weber M. The important role auf neuropeptides in complex regional pain syndrome. *Neurology* 2001; 57 (12): 2179-2184
13. Blaes F, Schmitz K, Tschernatsch M, Kaps M, Krasenbrink I, Hempelmann G, Bräu ME. Autoimmune etiology of complex regional pain syndrome. *Neurology* 2004; 63: 1734-1736.
14. Blumberg H. Zur Entstehung und Therapie des Schmerzsyndroms bei der Sympathischen Reflexdystrophie. *Der Schmerz* 1988; 2:125
15. Blumberg H. Clinical and pathophysiological aspects of reflex sympathetic dystrophy and sympathetically maintained pain. In: Jänig W, Schmidt RF. Reflex sympathetic dystrophy. Pathophysiological mechanisms and clinical implications, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, New York: 1992: 29-50
16. Braus DF, Krauss JK, Strobel J. The shoulder-hand syndrome after stroke: a prospective clinical trial. *Ann Neurol* 1994; 36: 728-733
17. Bruehl S, Harden RN, Galer BS, et al. External validation auf ISAP diagnostic criteria for complex and proposed research diagnostic criteria. *Pain* 1999; 81: 147-154
18. Cacoub P, Ghillani P, Thibault V, Calvez V, Charlotte F, Musset L, Youinou P, Piette JC. Anti-endothelial cell auto-antibodies in hepatitis C virus mixed cryoglobulinemia. *Journal of Hepatology* 1999; 31: 598-603
19. Cassinotti P, Schultze D, Schlageter P, et al. Persistent human parvovirus B19 infection following an acute infection with meningitis in an immunocompetent patient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993; 12: 701-4
20. Christensen K, Jensen EM, Noer I. The reflex sympathetic dystrophy syndrome response to treatment with systemic corticosteroids. *Acta Chir Scand* 1982; 148: 653-655
21. Classen M, Diehl V, Kochsieck K. Innere Medizin-5.Auflage. Urban&Fischer, München Jena 2004; 1039-1043
22. Corridan PGJ, Laws DE, Morrell AJ, et al. Tonic pupils and human parvovirus B19 infection. *J Clin Neuroophthalmol* 1991; 11: 109-10
23. Cross TG, Scheel-Toellner D, Henriquez NV, Deacon E, Salmon M, Lord JM. Serine/threonine protein kinases and apoptosis. *Exp Cell Res* 2000; 256:34-41
24. Cunningham MW. Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin Microbiol Rev.* 2000 Jul; 13 (3): 470-511

25. Dalmau J, Gultekin SH, Voltz R Hoard R, DesChamps T, Balmaceda C, Batchelor T, Gerstner E, Eichen J, Frennier J, Posner JB, Rosenfeld MR. Ma1, a novel neuron- and testis-specific protein, is recognized by the serum of patients with paraneoplastic neurological disorders. *Brain* 1999; 122: 27-39
26. Darnell RB. Onconeural antigens and the paraneoplastic neurologic disorders: at the intersection of cancer, immunity, and the brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93:4529-4536
27. Dayan L, Salman S, Norman D, Vatine JJ, Calif E, Jacob G. Exaggerated Vasoconstriction in Complex Regional Pain Syndrome-1 is associated with impaired resistance artery endothelial function and local vascular reflexes. *J Rheumatol*. 2008 May 1
28. De Baets M, Stassen MH. The role of antibodies in Myasthenia gravis. *J Neurol Sci* 2002; 202: 5-11
29. De Giorgio R, Bovara M, Barbara G Canossa M, Sarnelli G, De Ponti F, Stanghellini V, Tonini M, Cappello S, Pagnotta E, Nobile-Orazio E, Corinaldesi R. Anti-HuD-induced neuronal apoptosis underlying paraneoplastic gut dysmotility. *Gastroenterology* 2003; 125: 70-79
30. Dietel M, Suttrop N, Zeitz M. *Harrisons Innere Medizin-16.Auflage*. ABW-Wissenschaftsverlag, Berlin 2005
31. Denning DW, Amos A, Rudge P, et al. Neuralgic amyotrophy due to parvovirus infection. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1987; 50: 641-2
32. Evans JA. Reflex sympathetic dystrophy. *Surg Clin North Am* 1946;26: 435-448
33. Faden H, Gary GWJ, Anderson LJ. Chronic parvovirus infection in a presumably healthy woman. *Clin Infect Dis* 1992; 15: 595-7
34. Faden H, Gary WJ, Korman M. Numbness and tingling of fingers associated with parvovirus B19 infection. *J Infect Dis* 1990; 161: 354-355
35. Fritzler MJ. Clinical relevance of autoantibodies in systemic rheumatic diseases. *Mol Biol Rep* 1996; 23: 133-145
36. Garlepp MJ, Dawkins RL, Christiansen FT. HLA Antigens and acetylcholine receptor antibodies in penicillamine induced myasthenia gravis. *Br Med J*.1983 Jan 29; 286 (6362): 338-40
37. Gobelet C Maier JL, Schaffner W, Bischof-Delaloye A, Gerster JC, Burckhardt P. Calcitonin and reflex sympathetic dystrophy syndrome. *Clin Rheumatol* 1986; 5 (3): 382-388

38. Gobelet C, Waldburger M, Maier JL. The effect of adding calcitonin to physical treatment on reflex sympathetic dystrophy. *Pain* 1992; 48 (2): 171-175
39. Goebel A, Netal S, Schedel R, Sprotte G. Human pooled immunoglobulin in the treatment of chronic pain syndromes. *Pain Med* 2002; 3: 119-127
40. Goebel A, Stock M, Deacon R, Sprotte G, Vincent A. Intravenous Immunoglobulin Response and Evidence for Pathogenic Antibodies in a Case of Complex Regional Pain Syndrome 1. *Ann of Neurology* 2005; 57: 463
41. Golstein MA, Semaille P, Steinfeld S. Rheumatic manifestations due to human parvovirus B19: a report of four cases. *Rev Rheum Eng Ed* 1996; 63: 854-8
42. Goldblatt F, Gordon TP, Waterman SA. Antibody-mediated gastrointestinal dysmotility in scleroderma. *Gastroenterology* 2002; 123: 1144-5040.
43. Goris RJ, Dongen LM, Winters HA. Are toxic oxygen radicals involved in the pathogenesis of reflex sympathetic dystrophy? *Free radicals Res Commun* 1987; 3 (1-5): 13-18
44. Greenlee JE, Parks TN, Jaeckle KA: Type IIa (anti-Hu) antineuronal antibodies produce destruction of rat cerebellar granule neurones in vitro. *Neurology* 1993; 43: 2049-2054
45. Hall CB, Horner FA. Encephalopathy with erythema infectiosum. *Am J Dis Child* 1977; 131:65-7
46. Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 1994; 265(5173):808-811
47. Hartrick CT. Increased production of nitric oxide stimulated by interferon-gamma from peripheral blood monocytes in patients with complex regional pain syndrome. *Neurosci Lett* 2002; 323: 75-77
48. Hoerster W, Reining R. Sympathische Reflexdystrophie. In: Flöter T (Hrsg.) *Grundlagen der Schmerztherapie*. Urban&Vogel, München 1998, 351-355
49. Holm JM, Hansen LK, Oxhoj H. Kawasaki disease associated with parvovirus B19 infection. *Eur J Pediatr* 1995; 154: 633-634
50. Huygen FJP, de Bruijn AGJ, de Bruin MT, Groeneweg JG, Klein J, Zijlstra FJ. Evidence for local inflammation in complex regional pain syndrome type 1. *Med Inflamm* 2002; 11: 47-51
51. Huygen FJ, Ramdhani N, van Toorenenbergen A, Klein J, Zijlstra FJ. Mast cells are involved in inflammatory reactions during Complex Regional Pain Syndrome type 1. *Immunol Lett*. 2004 Feb 15; 91 (2-3) 147-54

52. Hughes RA, Hadden RD, Gregson NA, Smith KJ: Pathogenesis of Guillian-Barre syndrome. *J Neuroimmunol* 1999 Dec; 100 (1-29): 74-9752.
53. Huygen FJ, Niehof S, Zijlstra FJ, van Hagen PM, van Daele PL. Successful treatment auf CRPS 1 with ant-TNF. *J Pain Symptom Manage.* 2004 Feb; 27 (2): 101-3
54. Isumi H, Nunoue T, Nishida A, et al. Fetal brain infection with human parvovirus B19. *Pediatr Neurol* 1999; 21: 661-3
55. Janig W, Levine JD, Michaelis M. Interactions of sympathetic and primary afferent neurons following nerve injury and tissue trauma. *Prog Brain Res* 1996; 113: 161-184
56. Janeway AC, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Immunologie-5.Auflage.* Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin 2002; 1-92, 537-560
57. Jean WC, Dalmau J, Ho A, Posner JB. Analysis of the IgG subclass distribution and inflammatory infiltrates in patients with anti-Hu-associated paraneoplastic encephalomyelitis. *Neurology* 1994; 44: 140-147
58. Kemler MA, van de Vusse AC, Berg-Loonen EM, Barendse GA, van Kleef M, Weber WE. HLA-DQ1 associated with reflex sympathetic dystrophy. *Neurology* 1999; 53: 1350-51
59. Kemler MA, Barendse GA, Kleef M van, Vet HC de, Rijks CP, Furnee CA, Wildenberg FA van den. Spinal cord stimulation in patients with chronic reflex sympathetic dystrophy. *N Eng J Med* 2000; 343 (9). 618-624
60. Kerr JR, Boyd N. Autoantibodies following parvovirus B19 infection. *J Infect* 1996; 32: 41-7
61. Kischel N. Durchflußzytometrie, Westernblot und Agglutinationstest zum Nachweis von Serumantikörpern gegen Francisella tularensis. München 2002.
62. Kist M, Bereswill S. Molecular microbiology and pathogenesis of Helicobacter and Campylobacter updated a meeting report of the 11th conference on Campylobacter, Helicobacter and related organisms. *Mol Microbiol.* 2002 Jul; 45 (1): 255-62. Review
63. Köck FX, Borisch N, Köster B, Grifka J. Complex regional pain syndrome type 1 (CRPS 1) pathophysiology, diagnostics, and therapy. *Orthopäde* 2003 May 32 (5): 418-3163.
64. Kozin F, Soin JS, Ryan LM, Carrera GF, Wortmann RL. Bone scintigraphy in the reflex sympathetic dystrophy syndrome. *Radiology* 1981; 138 (2): 437-443

65. Lang B, Dale RC, Vincent A. New autoantibody mediated disorders of the central nervous system. *Curr Opin Neurol* 2003; 16: 351-357
66. Lee KH, Cho HJ, Kim HS, Lee WJ, Lee S, Bang D. Activation of extracellular signal regulated kinase 1/2 in human dermal microvascular endothelial cells stimulated by anti-endothelial cell antibodies in sera of patients with Behcet's disease. *J Dermatol Sci* 2002; 30: 63-72
67. Leis S, Weber M, Isselmann A, Schmelz M, Bircklein F. Substance P-induced protein extravasation is bilaterally increased in complex regional pain syndrome. *Exp Neurol* 2003; 183: 197-204
68. Levine JD, Dardick SJ, Roizen MF, Helms C, Basbaum AI. Contribution of sensory afferents and sympathetic efferents to joint injury in experimental arthritis. *J Neurosci* 1986; 6 (12): 3423-3429
69. Levine JD, Taiwo YO, Collins SD, Tam JK. Noradrenaline hyperalgesia is mediated through interaction with sympathetic postganglionic neurone terminals rather than activation of primary afferent nociceptors. *Nature* 1986; 323 (6084): 158-160
70. Lothe F, Guillevin L. Polyarteritis nodosa, microscopic polyangiitis, and Churg-Strauss syndrome. Clinical aspects and treatment. *Rheum Dis Clin North Am* 1995; 21: 911-47
71. Lunardi C, Tiso M, Borgato L, et al. Chronic parvovirus B19 infection induces the production of anti-virus antibodies with autoantigen binding properties. *Eur J Immunol* 1998; 28:936-48
72. Magro CM, Nuovo G, Ferri C, Crowson AN, Giuggioli, Sebastiani M. Parvoviral infection of endothelial cells and stromal fibroblasts: a possible pathogenetic role in scleroderma. *J Cutan Pathol* 2004; 31: 43-50
73. Maier C, Gleim M. Diagnostik und Therapie des chronisch unterhaltenen Schmerzes. *Schmerz* 1998; 12: 282-302
74. Maihofner C, Handwerker HO, Neundorfer B, Bircklein F. Mechanical hyperalgesia in complex regional pain syndrome: a role for TNF-alpha?. *Neurology*. 2005 Jul 26; 65(2): 311-3
75. McLachlan EM, Jänig W, Devor M, Michaelis M. Peripheral nerve injury triggers noradrenergic sprouting within dorsal root ganglia. *Nature* 1993; 363 (6429): 543-546

76. Mitchell SW. Injuries auf Nerves and their Consequences. New York: Dover, 1865
77. Moll JW, Hooijkaas H, van Goorbergh BCM, Roos LGE, Henzen-Logmans SC, Vecht CJ. Systemic and anti-neuronal autoantibodies in patients with paraneoplastic neurological disease. *J Neurol* 1995; 243: 51-56
78. Murray B, Alessandrini A, Cole AJ, Yee AG, Furshpan EJ. Inhibition of the p44/42 MAP kinase pathway protects hippocampal neurons in a cell-culture model of seizure activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 11975-11980
79. Nachamkin I, Ung H, Moran AP, Yoo D, Prendergast MM, Nicholson MA, Sheikh K, Ho T, Asbury AK, McKhann GM, Griffin JW. Ganglioside GM1 mimicry in *Campylobacter* strains from sporadic infections in the united states. *J Infect Dis* 1999 May, 179 (5): 1183-9
80. Newsom-Davis J, Murray N, Wrang D, Lang B, Prior C, Gwilt M, Vincent A. Lambert-Eaton myastehnic syndrome: electrophysiological evidence for a humoral factor. *Muscle nerve*. 1982; 5 (9s): S 17-20
81. Niethard FU, Pfeil J. *Duale Reihe-Orthopädie*, 5.Auflage. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart 2005: 318-319
82. Oaklander AL, Rissmiller JG, Gelman LB, Zheng L, Chang Y, Gott R. Evidence of focal small-fiber axonal degeneration in complex regional pain syndrome-I (reflex sympathetic dystrophy). *Pain* 2006 Feb; 120 (3): 235-43
83. Oerlemans HM, Oostendorp RA, Boo T de, Perez RS, Goris RJ. Signs and symptoms in complex regional pain syndrome type 1/reflex sympathetic dystrophy: judgment of the physician versus objective measurement. *Clin J Pain* 1999; 15 (3): 224-232
84. Okumura A, Ichikawa T. Aseptic meningitis caused by human parvovirus B19. *Arch Dis Child* 1993; 68: 784-5
85. Oyen WJ, Arntz IE, Claessens RM, Meer JW van der , Corstens FH, Goris RJ. Reflex sympathetic dystrophy auf the hand: an excessive inflammatory response? *Pain* 1993; 55 (2): 151-157
86. Pellas F, Olivares JP, Zandotti C, et al. Neuralgic amyotrophy after parvovirus B19 infection. *Lancet* 1993; 342:503-4
87. Perez RS, Zuurmond WW, Bezemer PD, Kuik PJ, Loenen AC van, Lange JJ de, Zuidhof AJ. The treatment of complex regional pain syndrome type 1 with free radical scavengers: a randomized controlled study. *Pain* 2003; 102 (3): 297-307

88. Pinto A, Gillard S, Moss F Whyte K, Brust P, Williams M, Stauderman K, Harpold M, Lang B, Newsom-Davis J, Bleakman D, Lodge D, Boot J. Human autoantibodies specific for the alpha1a calcium channel subunit reduce both P-type and Q-type calcium currents in cerebellar neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 8328-8333
89. Puechal X, Hilliquin P, Kahan A, et al. Neuralgic amyotrophy and polyarthritits caused by parvovirus infection. *Ann Rheum Dis* 1998; 57:262
90. Rose NC, Bona C. Defining criteria for autoimmune diseases. *Immunol Today* 1993; 14: 426-430
91. Ruocco I, Cuello AC, Ribeiro-Da-Silva A. Peripheral nerve injury leads to the establishment of a pattern of sympathetic fibre innervation in the rat skin. *J Comp Neurol* 2000; 422 (2): 287-296
92. Runden E, Seglen PO, Haug FM, Ottersen OP, Wieloch T, Shamloo M, Laake JH. Regional selective neuronal degeneration after protein phosphatase inhibition in hippocampal slice cultures: evidence for a MAP kinase-dependent mechanism. *J Neurosci* 1998; 18: 7296-7305.
93. Sarchielli P, Orlacchio A, Vicinanza F, Pelliccioli G, Tognoloni M, Saccardi C, Gallai V. Cytokine secretion and nitric oxide production by mononuclear cells in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1992; 80: 76-86
94. Schäfer KH, Klotz M, Mergner D, Mestres P, Schimrigk K, Blaes F. IgGmediated cytotoxicity to myenteric plexus cultures in patients with paraneoplastic neurological syndromes. *J. Autoimmunity* 2000; 15: 479-484
95. Schattschneider J, Hartung K, Stengel M, Ludwig J, Binder A, Wasner G, Baron R. Endothelial dysfunction in cold type complex regional pain syndrome. *Neurology*. 2006 Aug 22; 67 (4): 673-5
96. Schattschneider J, Wasner G, Binder A, Baron R. Pathophysiologie und Behandlung des komplexen regionalen Schmerzsyndroms. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2003; 38: 547-564
97. Schober E, Schernthaner G, Mayr WR. HLA-DR antigens in insulin-dependent diabetes. *Arch Dis Child*. 1981 Mar; 56 (3): 227-9
98. Schreiber AD, Frank MM. Role of antibody and complement in the immune clearance and destruction of erythrocytes. In vivo effects of IgG and IgM complement-fixing sites. *J Clin Invest* 1972;51:575.

99. Schroers R, Dührsen U. Idiopathische thrombozytopenische Purpura (ITP). *Dtsch med Wochenschr* 2007; 132: 383-390
100. Sherry DD, Wallace CA, Kelley C, Kidder M, Sapp L. Short- and long-term outcomes of children with complex regional pain syndrome type 1 treated with exercise therapy. *Clin J Pain* 1999; 15 (3): 218-223
101. Sieweke N, Birklein F, Riedl B, Neundorfer B, Handwerker HO. Patterns of hyperalgesia in complex regional pain syndrome. *Pain* 1999; 80: 171-177
102. Sokol RJ, Hewitt S, Stamps BK, Hitchen PA. Autoimmune Haemolysis in Childhood and Adolescence. *Acta haemat* 1984;72:245-257.
103. Stanton-Hicks M, Janig W, Hassenbusch S, Haddock JD, Boas R, Wilson P. Reflex sympathetic dystrophy: changing concepts and taxonomy. *Pain* 1995; 63 (1): 127-133
104. Su B, Karin M. Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. *Curr Opin Immunol* 1996; 8: 402-411
105. Sudeck P. Über die akute Knochenatrophie nach Entzündungen und Traumen der Extremitäten. *Deut Med Wschr* 1902; 28: 336-342
106. Tanaka A, Sugawara A, Sawai K, et al. Human parvovirus B19 infection resembling systemic lupus erythematosus. *Intern Med* 1998; 37: 708-10
107. Tibbles LA, Woodgett JR. The stress-activated protein kinase pathways. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55: 1230-1254
108. Toyoda M, Petrosian A, Jordan SC. Immunological characterization of anti-endothelial cell antibodies induced by cytomegalievirus infection. *Transplantation* 1999; 68: 1311-8
109. Torebjork E, Wahren L, Wallin G, Hallin R, Koltzenburg M. Noradrenaline-evoked pain in neuralgia. *Pain* 1995; 63 (1): 11-20
110. Treede RD, Davis KD, Campell JN, Raja SN. The plasticity of cutaneous hyperalgesia during sympathetic ganglion blockade in patients with neuropathic pain. *Brain* 1992; 115: 607-621
111. Tschernatsch M. Effekte von IgG-Fractionen von Patienten mit paraneoplastischer Polyneuropathie auf neuronale Zellen in vitro. Giessen, 2005, nicht publiziert.
112. Umene K, Nunoue T. A new genome type of human parvovirus B19 present in sera of patients with encephalopathy. *J Gen Virol* 1995; 76: 2645-51

113. Van de Beek WJ, Roep BO, van der Silk AR, Giphart MJ, van Hilten BJ. Susceptibility loci for complex regional pain syndrome. *Pain* 2003; 103: 93-97
114. Van Hilten JJ, van de Beek WJ, Roep BO. Multifocal or generalized tonic dystonia auf complex regional pain syndrome: a distinct clinical entity associated with HLA-DR 13. *Ann Neurol* 2000, 48: 113-116
115. Van Hilten BJ, van de Beek WJ, Hoff JL, Voormolen JH, Delhaas EM. Intrathecal baclofen for the treatment of dystonia in patients with reflex sympathetic dystrophy. *N Engl J Med* 2000; 343: 625-30
116. Van de Vusse AC, Goossens VJ, Kemler MA, Weber WE. Screening auf patients with complex regional pain syndrome for antecedent infections. *Clin J Pain* 2001; 17: 110-114
117. Varena M, Zucchi F, Ghiringhelli D, Binelli L, Bevilacqua M, Bettica P, Sinigaglia L. Intravenous clodronate in the treatment of reflex sympathetic dystrophy syndrome. A randomized, double blind, placebo controlled study. *J Rheumatol* 2000; 27 (6): 1477-1483
118. Veldman PH, Reynen HM, Arntz IE, Goris RJ. Signs and symptoms of reflex sympathetic dystrophy: prospective study auf 829 patients. *Lancet* 1993; 342: 1012-1016
119. Vega-Ostertag M, Harris EN, Pierangeli SS. Intracellular events in platelet activation induced by antiphospholipid antibodies in the presence of low doses of thrombin. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 2911-2919.
120. Vernino S, Lennon VA. New Purkinje cell antibody (PCA-2): marker of lung cancer-related neurological autoimmunity. *Ann Neurol* 2000; 47: 297-305
121. Vernino S, Lindstrom J, Hopkins S, Wang Z, Low PA; the muscle Study Group. Characterization of ganglionic acetylcholine receptor autoantibodies. *J Neuroimmunol*. 2008 May 14.
122. Verschuuren J, Dalmau J, Hoard R, Posner JB. Paraneoplastic anti-Hu serum: studies on human tumor cell lines. *J Neuroimmunol* 1997; 79: 202-210
123. Vincent A, Jacobson L, Plested P, Polizzi A, Tang T, Riemersma S, Newland C, Ghorazian S, Farrar J, MacLennan C, Willcox N, Beeson D, Newsom-Davis J. Antibodies affecting ion channel function in acquired neuromyotonia, in seropositive and seronegative myasthenia gravis, and in antibody-mediated arthrogryposis multiplex congenita. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 841: 482-496
124. Vincent A, Honnorat J, Antoine JC, Giometto B, Dalmau J, Lang B.

- Autoimmunity in paraneoplastic neurological disorders. Conference report. *J Neuroimmunol* 1998; 84: 105-109
125. Wallace MS, Ridgeway BM, Leung AY, Gerayli A, Yaksh TL. Concentration-effect relationship of intravenous lidocaine on the allodynia of complex regional pain syndrome types 1 and 2. *Anesthesiology* 2000; 92 (1): 75-83
126. Walsh KJ, Armstrong RD, Turner AM. Brachial plexus neuropathy associated with human parvovirus infection. *Br Med J* 1988; 296: 896
127. Wasner G, Backonja MM, Baron R. Traumatic Neuralgias: Complex Regional Pain Syndromes (Reflex Sympathetic Dystrophy and Causalgia): Clinical Characteristics, Pathophysiological Mechanisms and Therapy. *Neurol Clin* 1998; 16 (4): 851-868
128. Wasner G, Heckmann K, Maier C, Baron R. Vascular abnormalities in acute reflex sympathetic dystrophy (CRPS 1)- complete inhibition of sympathetic nerve activity with recovery. *Arch Neurol* 1999; 56: 613 -620
129. Wasner G, Schattschneider J, Heckmann K, Maier C, Baron R. Vascular abnormalities in reflex sympathetic dystrophy (CRPS 1): mechanisms and diagnostic value. *Brain* 2001; 124 (Pt 3): 587-599
130. Waterman SA. Autonomic dysfunction in Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Clin Auton Res* 2001; 11: 154 – 54
131. Werner GT et al. Behandlung beim Komplexen Regionalen Schmerzsyndrom. Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Physikalische Medizin und Rehabilitation, AMWF Leitlinien 1999, Register-Nr.:036/006
132. White JC, Sweet WH. Pain and the neurosurgeon. Springfield Illinois: Charles C. Thomas, 1969
133. Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 1999; 79: 143-180
134. Wilkinson PC: Serologic findings in carcinomatous neuromyopathy. *Lancet* 1965 1: 1301-1303.
135. Witebsky E, Rose NR, Terplan K, Paine JR, Egan RW. Criteria for autoimmune diseases. *J Am Med Assoc* 1957; 164: 1439-1447
136. Yamamoto T, Sawada Y, Katayama I, Nishioka K. Increased production of nitric oxide stimulated by interleukin-1 β in peripheral blood mononuclear cells in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1998; 37: 1123-1125

137. Zyluk A. The usefulness of quantitative evaluation of three-phase scintigraphy in the diagnosis of post-traumatic reflex sympathetic dystrophy. *J Hand Surg* 1999; 24:16–21

6. Anhang

Erklärung

Ich erkläre: Ich hab die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis niedergelegt sind, eingehalten.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Vor- und Nachname: Oliver Matz
Geburtsdatum: 30. März 1980 in Herborn
Anschrift: Westanlage 32
35390 Gießen
Familienstand: ledig, keine Kinder

Schulbildung

1986-1990 Dernbach-Grundschule Herbornseelbach
1990-1999 Johanneum-Gymnasium Herborn
Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

08/1999-09/2000 Zivildienst in einem Alten- und Pflegeheim in Herborn

Studium

10/2000-09/2001 Lehramtsstudium Sekundarstufe 2 (Mathematik und Geschichte) an der Justus-Liebig-Universität in Gießen
04/2001-11/2007 Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität in Gießen
Absolvierung des Praktischen Jahres (PJ) am Universitätsklinikum Giessen, Wahlfach: Neurologie
11/2007 Staatsexamen
Seit 02/2004 Erstellung der Promotionsarbeit zum Thema „Autoantikörper und deren pathogene Effekte auf sympathische Nervenzellen beim Komplexen Regionalen Schmerzsyndrom“ in der Neurologie am Universitätsklinikum Gießen

Berufliche Ausbildung

Seit 01/2008

wissenschaftlicher Angestellter der Neurologischen
Universitätsklinik Giessen

Publikationsverzeichnis

Aus Teilen der vorliegenden Dissertation wurde folgende Arbeit publiziert:

F. Blaes, M. Tschernatsch, M.E. Braeu, O. Matz, K. Schmitz, D. Nascimento, M. Kaps, F. Bircklein. Autoimmunity in Complex-Regional Pain Syndrome. Ann. N.Y. Acad. Sci.1107: 168-173 (2007)

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. M. Kaps danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an der Neurologischen Klinik der Justus-Liebig-Universität Giessen durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. F. Blaes für die Überlassung des Themas sowie die jederzeit gewährte engagierte Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Weiterhin danke ich Herrn PD Dr. M. Bräu für die Hilfe bei der Bereitstellung des Zellmaterials sowie Frau Dr. M. Korfei für die Einarbeitung bei den Funktionsassays.

Insbesondere danke ich meiner Familie, die mich all die Jahre hindurch unterstützt hat.