Justus-Liebig-Universität Gießen Institut für Neurologie

Charakterisierung der B-Zell-Regulation und funktioneller Effekte von Autoantikörpern bei Kindern mit Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat)

Fachbereich Biologie und Chemie

Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Stefanie Altenkämper

(geborene Beck)

aus Dreihausen

Gießen im April 2009

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden vom Dezember 2005 bis April 2009 am Institut für Neurologie der Justus-Liebig-Universität Gießen unter der Leitung und in der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Franz Blaes durchgeführt. Die Betreuung am Fachbereich Biologie wurde von Herrn Prof. Dr. Clauss übernommen.

Vom Fachbereich Biologie und Chemie
Der Justus-Liebig-Universität Gießen als Dissertation am angenommen.

Dekan: Prof. Dr. V. Wolters
Erstgutachter: Prof. Dr. Clauss
Zweitgutachter: PD Dr. Franz Blaes

Tag der mündlichen Prüfung:

1. EINLEITUNG 1

1.1 Das Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom (OMS) 1
1.1.1 Krankheitsbild und Verlauf 1
1.1.2 Ursachen der Erkrankung 2
1.1.3 Neuroblastom 2
1.1.4 Behandlung des OMS 3
1.1.5 Autoimmunität und Auto-Antikörper bei OMS-Patienten 3
1.1.6 Das Kleinhirn / Granularis-Neurone 5

1.2 Immunglobulin G und seine Subklassen 8

1.3 Natürliche Killerzellen 11

1.4 B-Zell aktivierende Faktoren 13
1.4.1 B-Lymphozyten / B-Zellen 13
1.4.2 BAFF (B-Zell aktivierender Faktor aus der TNF-Familie) und seine Rezeptoren 14
1.4.3 APRIL (A proliferation inducing ligand) 19
1.4.4 BAFF-R (BAFF-Rezeptor) 21

2. ZIELSETZUNG 23

3. MATERIAL 25

3.1 Chemikalien und fertige Lösungen 25

3.2 Verbrauchsmaterial 27

3.3 Geräte 28

3.4 Molekularbiologische und biochemische Kits 30

3.5 Puffer und Lösungen 30

3.6 Medien und Lösungen zur Kultivierung von Zellen 33

3.7 Zelllinien 34

3.8 Antikörper 35

3.9 Primer 37
3.9.1 Oligonukleotide zur Durchführung von Realtime-PCRs 37

3.10 Software 37

4. PATIENTEN UND METHODEN 38

4.1 Patienten 38
4.1.1 Patientenmaterial – Gewinnung und Lagerung 38
4.1.2 Patientengruppen 39
4.1.2.1 Bestimmung der IgG-Subklassen-Verteilung 39
4.1.2.2 Untersuchung der IgG-Effekte auf die NK-Zell vermittelte Lyse von NB-Zellen 40
5.1.2.3 Bestimmung der BAFF- und APRIL-Konzentration 41

4.2 Molekularbiologische Methoden 43
4.2.1 RNA-Isolation 43
4.2.1.1 RNA-Isolierung mit dem QIAamp™ RNA Blood Mini Kit 43

4.2.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren ... 43
4.2.3 Reverse Transkription ... 44
4.2.4 Real Time-PCR ... 45
4.2.5 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren ... 46
4.2.5.1 Analytische Agarosegele ... 47
4.2.6 IgG- und Protein-Konzentrationsbestimmung ... 47
4.2.6.1 nephelometrische Konzentrationsbestimmung ... 47
4.2.6.2 photometrische Konzentrationsbestimmung mittels BCA-Kit ... 48
4.2.7 Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA) ... 49
4.2.7.1 BAFF-Konzentrationsbestimmung mit dem „Quantikine® Human BAFF/BLyS“ ELISA ... 49
4.2.7.2 APRIL-Konzentrationsbestimmung mit dem „human APRIL ELISA BMS2008“ ... 50

4.3 Zellbiologische Methoden ... **51**
4.3.1 Immunhistochemie ... 51
4.3.1.1 Auto-AK-Bestimmung mit dem Neurologie-Mosaik 13 Kit ... 51
4.3.2 Zellkultur ... 52
4.3.2.1 Langzeit-Lagerung von Säugerzellen ... 52
4.3.2.2 Einfrieren und auftauen von Säuger-Zelllinien ... 52
4.3.2.3 Mediumwechsel, Zell-Passage und Zellernte ... 53
4.3.2.5 Zellzahlbestimmung (Neubauer-Zählkammer) ... 55
4.3.2.6 Stimulation von Säugerzellen ... 55
4.3.3 Isolation von Primärkulturen ... 55
4.3.3.1 NK-Zell-Isolation aus Vollblut ... 55
4.3.3.2 Isolation von Granularis-Neuronen aus Säuger-Kleinhirnen ... 56
4.3.4 Durchflusszytometrie ... 58
4.3.4.1 Nachweis extrazellulärer AK-Bindung ... 59
4.3.4.2 Nachweis intrazellulärer AK-Bindung ... 59
4.3.4.3 Bindungsnachweis verschiedener AK ... 60
4.3.5 Zytotoxizitäts-Messung ... 60
4.3.4.1 LDH-Assay ... 60

4.4 Biochemische Methoden ... **63**
4.4.1 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen (SDS-PAGE) ... 63
4.4.1.1 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen aus primären Zellen ... 63
4.4.1.2 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen aus Zelllinien ... 63
4.4.2 Western Blot Analyse ... 64
4.4.3 Immunfärbung von Proteinen ... 66
4.4.3.1 Nachweis von AK gegen Granularis-Neurone ... 66
4.4.3.2 Protein-Nachweise in Zelllinien ... 66
4.4.4 Aufreinigung von Immunglobulin G aus Patienten-Seren und Plasma ... 67
4.4.4.1 IgG-Isolation mittels Affinitätschromatographie ... 67
4.4.4.2 IgG-Isolation mittels G-Sepharose ... 68

4.5 Statistische Auswertung ... **69**

5. ERGEBNISSE ... **70**

5.1 Bestimmung der IgG-Subklassen-Verteilung von Autoantikörpern bei Kindern mit OMS ... **70**
5.1.1 IgG-Subklassen Verteilung intrazellulär bindender Auto-AK ... 71
5.1.1.1 Immunhistochemie ... 71
5.1.1.2 Western Blot ... 73
5.1.2 IgG-Subklassen Verteilung an CGN-Oberfläche bindender Auto-AK ... 75
5.1.2.1 Durchflusszytometrie ... 75
5.1.3 Überprüfung der Gesamt-IgG3 Menge im Serum ... 78
5.1.4 Zusammenfassung ... 80

5.2 IgG-Effekt auf die NK-Zell vermittelte Lyse von NB-Zellen ... **82**
5.2.1 Etablierung der Versuchsbedingungen ... 82
5.2.1.1 Zellzahl, Verhältnis von Ziel- zu Effektor-Zellen, Inkubationszeiten ... 83
5.2.1.2 Wahl der Zellen ... 84
5.2.1.3 IgG-Konzentration ... 87

5.2.1.4 Bestimmung der Oberflächen-Bindung von Patienten-IgG an NB-Zellen ... 88
5.2.2 IgG-Effekte auf die NK-Zell vermittelte Lyse von NB-Zellen ... 90
5.2.2.1 LDH-Assay ... 90
5.2.3 Zusammenfassung ... 91

5.3 Die B-Zell aktivierenden Faktoren BAFF und APRIL in Serum und Liquor von OMS-Patienten ... 94
5.3.1 BAFF-Konzentrationen im Serum und im Liquor von Patienten ... 94
5.3.1.1 BAFF-Konzentrations Bestimmung ... 94
5.3.1.2 BAFF-Serumkonzentration ... 95
5.3.1.3 BAFF-Liquorkonzentration ... 96
5.3.1.4 BAFF- Liquor/Serum Ratio und Integrität der Blut-Hirn Schranke ... 97
5.3.1.5 Korrelation zwischen BAFF und Auto-AK ... 99
5.3.2 APRIL-Konzentration im Serum und Liquor von Patienten ... 100
5.3.2.1 APRIL-Konzentrations Bestimmung ... 100
5.3.2.2 APRIL-Serum Konzentration ... 101
5.3.2.3 APRIL-Liquor Konzentration ... 102
5.3.3 Zusammenfassung ... 103

5.4 Bestimmung der APRIL-, BAFF- und BAFF-R-Expression, sowie der APRIL- und BAFF- Sekretion von NB-Zelllinien ... 104
5.4.1 Basale APRIL-, BAFF- und BAFF-R Expression in NB-Zelllinien ... 104
5.4.1.1 Basale BAFF-Expression auf RNA-Ebene ... 105
5.4.1.2 Basale APRIL-Expression auf Protein-Ebene ... 107
5.4.1.3 Basale BAFF-Expression auf Protein-Ebene ... 110
5.4.1.4 Basale Expression on BAFF-R ... 112
5.4.2 Effekt von IFN-γ auf die APRIL-, BAFF- und BAFF-R-Expression in NB-Zelllinien ... 113
5.4.2.1 BAFF-RNA-Menge nach IFN-γ-Stimulation ... 114
5.4.2.2 APRIL-Expression nach IFN-γ-Stimulation ... 119
5.4.2.3 BAFF-Expression nach IFN-γ-Stimulation auf Protein-Ebene ... 121
5.4.2.4 BAFF-R Expression nach IFN-γ-Stimulation ... 124
5.4.3 APRIL- und BAFF- Sekretion von NB-Zelllinien ... 127
5.4.3.1 Basale APRIL- und BAFF- Sekretion ... 128
5.4.3.2 APRIL- Sekretion nach Stimulation mit IFN-γ ... 128
5.4.3.3 BAFF- Sekretion nach Stimulation mit IFN-γ ... 128
5.4.4 Zusammenfassung ... 129

6. DISKUSSION ... 132

6.1 IgG-Subklassen Verteilung der Auto-Antikörper von OMS-Patienten ... 132

6.2 Erhöhte NK-Zell vermittelte Lyse von NB-Zellen durch IgG von OMS-Patienten verglichen mit Kontroll-IgG ... 134
6.2.1 Etablierung eines Zytotoxizitäts-Assays zur Ermittlung der NK-Zell vermittelten Lyse von NB-Zellen ... 135
6.2.2 Veränderung der Zytotoxizität durch Zugabe von Patienten-IgG ... 137

6.3 BAFF- und APRIL-Konzentrationen im Serum und Liquor von OMS-Patienten ... 139

6.4 Expression und Synthese von BAFF, APRIL und BAFF-R durch Neuroblastomzellen ... 141

7. ZUSAMMENFASSUNG ... 144

8. LITERATURVERZEICHNIS ... 146

9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS ... 163

10. ANHANG ... 168

10.1 Vorbereitende Versuche für weiterführende Untersuchungen 168
6.2.2 Bestimmung der Oberflächen-Bindung von Patienten-IgG an NB-Zellen der Zelllinie Kelly mit zusätzlichen OMS- und Kontroll-Patienten 168

10.2 Lebenslauf ..... Fehler! Textmarke nicht definiert.

10.3 Publikationen 169

10.4 Ehrenwörtliche Erklärung 170

11. DANKSAGUNG 171

ABBILDUNG 1: SCHEMATISCHER AUFBAU DES KLEINHIRNS 7
ABBILDUNG 2: SCHEMATISCHER AUFBAU EINES IGG-MOLEKÜLS 9
ABBILDUNG 3: INTERAKTIONEN VON BAFF MIT SEINEN REZEPTOREN UND IHRE FUNKTION IM IMMUNSYSTEM 17
ABBILDUNG 4: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER ROLLE VON BAFF BEI DER ENTSTEHUNG VON AUTOIMMUNERKRANKUNGEN 19
ABBILDUNG 5: INTERAKTIONEN VON APRIL MIT SEINEN REZEPTOREN UND IHRE FUNKTION IM IMMUNSYSTEM 21
ABBILDUNG 6:LAGE DES KLEINHIRNS IM RATTENSCHÄDEL 57
ABBILDUNG 7: SCHEMATISCHER AUFBAU DES WESTERN BLOTS 65
ABBILDUNG 8: IMMUNFLUORESZENZ-FÄRBUNG VON PRIMATEN-KLEINHIRN SCHNITTEN 72
ABBILDUNG 9: BINDUNG VON OMS-IGG AN PROTEINE VON CGN`S 75
ABBILDUNG 10: FACS ANALYSE DER OBERFLÄCHENBINDUNG EINES OMS- UND EINES KONTROLL-SERUMS AN CGN´S 76
ABBILDUNG 11: OBERFLÄCHENBINDUNG DER VIER IGG-SUBKLASSEN AN CGN´S 77
ABBILDUNG 12: IGG-SUBKLASSEN ANALYSE DER GETESTETEN OMS-SEREN 78
ABBILDUNG 13: NEPHELOMETRISCH ERMITTELTE SERUM-KONZENTRATIONEN DER VIER IGG-SUBKLASSEN UND DES GESAMT-IGGS 79
ABBILDUNG 14: ETABLIERUNG DER VERSUCHSBEDINGUNGEN 83
ABBILDUNG 15: VERGLEICH ZWEIER ZIEL- ZELLINIEN 85
ABBILDUNG 16: FACS-ANALYSE DER REINHEIT DES NK-ZELL-ISOLATES 86
ABBILDUNG 17: VERGLEICH UNTERSCHIEDLICHER EFFEKTOR-ZELLEN 87
ABBILDUNG 18: BESTIMMUNG DER ZUR VERSTÄRKUNG DER LYSE GEEIGNETSTEN IGG-KONZENTRATION 88
ABBILDUNG 19: BESTIMMUNG DER IGG OBERFLÄCHEN-BINDUNG AN NB-ZELLEN 89
ABBILDUNG 20: BESTIMMUNG DER ZYTOTOXIZITÄT DER NB-ZELLEN NACH INKUBATION MIT IGG 91
ABBILDUNG 21: KORRELATION DER ZYTOTOXIZITÄT MIT DER OBERFLÄCHENBINDUNG AN NB-ZELLEN 93
ABBILDUNG 22: BAFF-STANDARD VERDÜNNUNGSREIHE 95
ABBILDUNG 23: BAFF-KONZENTRATION IN PATIENTENSEREN 96
ABBILDUNG 24: BAFF-KONZENTRATIONEN IM LIQUOR VON PATIENTEN 97
ABBILDUNG 25: VERGLEICH DER BAFF LIQUOR/SERUM RATIO 98
ABBILDUNG 26: VERGLEICH DER ALBUMIN LIQUOR/SERUM RATIO 99
ABBILDUNG 27: KORRELATION DER BAFF LIQUOR/SERUM RATIO MIT DER MENGE AN AUTO-AK 100
ABBILDUNG 28: APRIL-STANDARD VERDÜNNUNGSREIHE 101
ABBILDUNG 29: APRIL-KONZENTRATIONEN IN PATIENTENSEREN 102
ABBILDUNG 30: APRIL-KONZENTRATION IN PATIENTEN-LIQUOR 103
ABBILDUNG 31: TRANSKRIPTION DES BAFF-GENS, DETEKTION AUF RNA-EBENE 106
ABBILDUNG 32: APRIL-EXPRESSION IN VERSCHIEDENEN ZELLLINIEN 108
ABBILDUNG 33: ÜBERPRÜFUNG DER APRIL-EXPRESSION VERSCHIEDENER ZELLLINIEN 110
ABBILDUNG 34: BAFF-EXPRESSION IN VERSCHIEDENEN ZELLLINIEN 111
ABBILDUNG 35: ÜBERPRÜFUNG DER BAFF-EXPRESSION VERSCHIEDENER ZELLLINIEN 112
ABBILDUNG 36: BAFF-R EXPRESSION IN VERSCHIEDENEN ZELLLINIEN 113
ABBILDUNG 37: BERECHNUNG DER EFFIZIENZEN FÜR BAFF UND PBGD 115
ABBILDUNG 38: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER STIMULIERBARKEIT VON BAFF AUF RNA-EBENE 117
ABBILDUNG 39: ZEITVERLAUF DER APRIL-EXPRESSION NACH IFN-Γ-STIMULATION 119
ABBILDUNG 40: APRIL-EXPRESSION NACH 48 STD. IFN-Γ-STIMULATION 120
ABBILDUNG 41: APRIL-EXPRESSION NACH 72 STD. IFN-Γ-STIMULATION 121
ABBILDUNG 42: ZEITVERLAUF DER BAFF-EXPRESSION NACH IFN-Γ-STIMULATION 122
ABBILDUNG 43: BAFF-EXPRESSION NACH 48 STD. IFN-Γ-STIMULATION 123
ABBILDUNG 44: BAFF-EXPRESSION NACH 72 STD. IFN-Γ-STIMULATION 124
ABBILDUNG 45: ZEITVERLAUF DER BAFF-R EXPRESSION NACH IFN-Γ-STIMULATION 125
ABBILDUNG 46: BAFF-R EXPRESSION NACH 48 STD. IFN-Γ-STIMULATION 126
ABBILDUNG 47: BAFF-R EXPRESSION NACH 72 STD. IFN-Γ-STIMULATION 127
ABBILDUNG 48: BESTIMMUNG DER IGG OBERFLÄCHEN-BINDUNG AN NB-ZELLEN 168

TABELLE 1: AUFLISTUNG DER VERWENDETEN CHEMIKALIEN UND FERTIGEN LÖSUNGEN 27
TABELLE 2: AUFLISTUNG DER VERWENDETEN VERBRAUCHSMATERIALIEN 28
TABELLE 3: AUFLISTUNG DER VERWENDETEN GERÄTE 30
TABELLE 4: AUFLISTUNG DER VERWENDETEN MOLEKULARBIOLOGISCHEN UND BIOCHEMISCHEN KITS 30
TABELLE 5: AUFLISTUNG DER VERWENDETEN PUFFER UND LÖSUNGEN 33
TABELLE 6: AUFLISTUNG DER VERWENDETEN MEDIEN UND LÖSUNGEN ZUR KULTIVIERUNG VON ZELLEN 34
TABELLE 7: AUFLISTUNG DER VERWENDETEN ZELLLINIEN 35
TABELLE 8: VERWENDETE ANTIKÖRPER 36
TABELLE 9: AUFLISTUNG DER VERWENDETEN OLIGONUKLEOTIDE ZUR DURCHFÜHRUNG VON REALTIME-PCRS 37
TABELLE 10: PATIENTENDATEN DER OMS-PATIENTEN 40
TABELLE 11: PATIENTENDATEN DER OMS-PATIENTEN 41
TABELLE 12: PATIENTENDATEN DER OMS-PATIENTEN 42
TABELLE 13: ERGEBNISSE DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN UNTERSUCHUNGEN 73
TABELLE 14: ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE DER IGG-SUBKLASSEN BESTIMMUNG BEI OMS-PATIENTEN 80
TABELLE 15: GEGENÜBERSTELLUNG DER IGG-OBERFLÄCHENBINDUNG AN NB-ZELLEN UND DER ZYTOTOXIZITÄT NACH INKUBATION MIT GESAMT-IGG 92
TABELLE 16: ERGEBNISSE DER REALTIME-PCR 107
TABELLE 17: EFFIZIENZEN DER REALTIME-PCR FÜR BAFF UND PBGD 116
TABELLE 18: GEMITTELTE CT-WERTE DER STIMULATIONSVERSUCHE UND RATIO DER EINZELNEN VERSUCHE 118
TABELLE 19: ZUSAMMENFASSUNG DER VERSUCHS-ERGEBNISSE ZUR BESTIMMUNG DER EXPRESSION UND SEKRETION VON APRIL UND BAFF-R 130
TABELLE 20: ZUSAMMENFASSUNG DER VERSUCHS-ERGEBNISSE ZUR BESTIMMUNG DER EXPRESSION UND SEKRETION VON BAFF 131

1. Einleitung

1.1 Das Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom (OMS)

Das Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom (OMS) wurde zum ersten Mal 1962 von Kinsbourne beschrieben (Kinsbourne 1962). Daher wird es auch „Kinsbourne-Enzephalopathie“ genannt. Die Namen Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom und „dancing eyes syndrome“ gehen aus den Symptomen hervor. OMS ist eine seltene neurologische Erkrankung. Sie kann unterschiedliche Ursachen haben und ist nicht auf eine bestimmte Altersgruppe begrenzt. Das adulte OMS wird in dieser Arbeit nicht behandelt, weshalb nur am Rande darauf eingegangen wird.

1.1.1 Krankheitsbild und Verlauf

Die dominierenden akuten Symptome der OMS-Patienten sind Opsoklonien, Myoklonien und Ataxien. Opsoklonien sind oszillierende, synchrone Augenbewegungen in alle Richtungen, welche nicht willkürlich beeinflusst werden können. Myoklonien sind spontane Zuckungen der Gesichts- und/oder Extremitäten-Muskeln und bei Ataxien handelt es sich um Koordinationsstörungen von Bewegungsabläufen. Im weiteren Verlauf der Erkrankung treten häufig Entwicklungsstörungen auf, bereits erlernte Fähigkeiten, wie z. B. Sprache und Koordination, können verloren gehen und bei den meisten Kindern zeigen sich Verhaltensstörungen (z.B. Schlafstörungen, Reizbarkeit) (Pranzatelli 1996).
Kinder erkranken an OMS durchschnittlich zwischen dem ersten und dritten Lebensjahr. Der klinische Verlauf ist von Kind zu Kind sehr unterschiedlich. In einzelnen Fällen kommt es zwar zu einer vollständigen Genesung, aber in den meisten Fällen behalten die Patienten Langzeitschäden zurück. Als Langzeitschäden treten z.B. Lernbehinderungen, Verhaltensauffälligkeiten, verzögerte Sprach- und motorische Entwicklung auf (Mitchell 2002, Pranzatelli 1996, Russo 1997, Koh 1994, Pohl 1996).

1.1.2 Ursachen der Erkrankung

Ausgelöst werden kann ein OMS durch Intoxikationen (z.B. mit Strychnin), durch bakterielle und virale Infektionen (z.B. Streptokokken und Mumps), Medikamentenüberdosierung (z.B. mit Lithium) oder durch einen Tumor (Blain 1982, Cohen 1974, Pranzatelli 1996, Kuban 1983, Dale 2003, Korfei 2005, Blaes 2005). Generell wird zwischen zwei Formen des OMS unterschieden: dem idiopathischen und dem paraneoplastischen OMS. Paraneoplastische Syndrome sind Erkrankungen, die gemeinsam mit einem Tumor auftreten. Die Symptome werden hierbei weder durch eine lokale Wirkung des Tumors oder seiner Metastasen, noch durch infektiöse oder therapiebedingte Ursachen ausgelöst. Von einem paraneoplastischen OMS spricht man demzufolge, wenn ein Tumor nachgewiesen wurde. Bei Kindern mit einem paraneoplastischen OMS wurde fast immer ein Neuroblastom, selten ein Nierentumor festgestellt (Rudnick 2001, Pranzatelli 1996, Dale 2003, De Luca 2002). Etwa 50 % der pädiatrischen OMS-Fälle sind mit einem Neuroblastom assoziiert (Solomon 1968). Der Tumor bei Patienten mit einem paraneoplastischen OMS ist häufig lokalisiert und einige Studien zeigten, dass diese Patienten eine bessere Überlebenschance haben, als Patienten mit demselben Tumortyp, aber ohne OMS (Altman 1976). Eine neuere Studie konnte unter Einbeziehung des Tumorstadiums und weiterer Daten allerdings nur einen geringen Unterschied zwischen Neuroblastom-Patienten mit und ohne OMS zeigen (Rudnick 2001).

1.1.3 Neuroblastom

Das Neuroblastom ist der häufigste maligne Tumor, der im Kleinkindalter auftritt. 90 % aller Neuroblastom-Patienten sind unter sechs Jahren. Das Neuroblastom geht aus undifferenziertem Gewebe hervor und resultiert aus einer Entartung oder fehlenden Ausdifferenzierung von Nervenzellen des sympathischen Nervensystems. Am häufigsten entstehen Neuroblastome im Nebennierenmark sowie im Bereich des sympathischen Grenzstranges. In der Mehrzahl der Fälle befindet es sich im Bauchraum. 50-60 % der Patienten haben bereits Metastasen, wenn der Tumor diagnostiziert wird, da es überwiegend erst durch die Raumforderung im Abdomen auffällig wird (Hero 2002). Patienten ohne

Metastasen (Stadien 1-3) haben eine deutlich bessere 10-Jahres–Überlebensrate als Patienten mit metastasiertem Neuroblastom (Stadium 4) (Erttmann 1998).

1.1.4 Behandlung des OMS

Das OMS wird medikamentös mit immunsuppressiven oder immunmodulatorischen Substanzen behandelt. Als Therapie werden Korikosteroide und/oder Adreno-Kortikotrope-Hormone (ACTH) eingesetzt (Rostasy 2006, Ertle 2008). Auch intravenöse Immunglobuline (IVIG) werden zu Therapiezwecken verabreicht und in Einzelfällen wird eine Plasmapherese-Behandlung durchgeführt (Pranzatelli 1996). Bei Kindern mit einem paraneoplastischen OMS wird der Tumor chirurgisch entfernt. Im Anschluss daran erhalten viele Patienten eine Chemotherapie, deren immunsuppressiver Effekt sich auch positiv auf die Symptomatik des OMS auswirkt (Rudnick 2001, Russo 1997). Zur symptomatischen Therapie der Myoklonien und des Opsoklonus werden zudem Valproinsäure und Propranolol eingesetzt (Russo 1997).

1.1.5 Autoimmunität und Auto-Antikörper bei OMS-Patienten

Das Immunsystem eliminiert im gesunden Menschen körperfremde Zellen und Partikel sowie entartete Zellen, um den Körper vor Schaden zu bewahren. Es gibt eine humorale und eine zelluläre Immunantwort. Zu den Zellen des Immunsystems gehören u.a. antigenpräsentierende Zellen (APC), dendritische Zellen / Astrozyten, Monozyten / Makrophagen, T- und B-Lymphozyten, sowie Natürliche Killerzellen. Es gibt eine unspezifische und eine spezifische Immunabwehr gegen bestimmte Antigene. Die Natürlichen Killerzellen gehören beispielsweise u.a. zur unspezifischen Immunabwehr, da sie ihre Zielzellen auch ohne vorherige Antikörperbildung erkennen und abtöten können (Barao 1998, Biron 1999). Zur spezifischen Immunabwehr gehören die T-Lymphozyten und die Antikörper-produzierenden B-Zellen. Im gesunden Menschen findet während der Entwicklung und Ausdifferenzierung der T- und B-Zellen im Thymus bzw. im Knochenmark eine „negative Selektion“ statt. Dabei werden all die Zellen durch die Induktion von Apoptose eliminiert, die funktionsuntüchtig sind oder Antigen-Rezeptoren für körpereigene Strukturen exprimieren (Nossal 1994, Linette 1994, Rajewsky 1996). Eine Ursache durch die

Autoimmunität ausgelöst wird, ist das Überleben autoreaktiver T- und B-Zellen. Überstehen autoreaktive T- und B-Zellen durch Umgehung oder Störung die „negative Selektion", kann sich die Immunantwort auch gegen körpereigene Zellen richten, welche dann genau wie körperfremde und entartete Zellen von den Immunzellen als schädlich erkannt und zerstört werden. Autoimmune B-Zellen produzieren Auto-Antikörper, welche an körpereigene Zellen binden und diese für die Immunzellen markieren. Es können auch Antikörper gebildet werden, welche sich gegen ein Fremdprotein und zugleich gegen ein körpereigenes Protein richten, was zu einer Kreuzreaktion führt. Hierzu kommt es, wenn beide Proteine gewisse Strukturähnlichkeiten aufweisen (molekulare Mimikry), sich aber gleichzeitig noch genug unterscheiden, um nicht bei der „negativen Selektion" eliminiert zu werden.

Wie bereits erwähnt sind Neuroblastome von Patienten mit paraneoplastischem OMS häufig nur sehr klein und nach der Gabe von Immunsuppressiva tritt eine Verbesserung der akuten Symptome des OMS auf. Diese Tatsachen deuten darauf hin, dass eine Immunantwort auf den Tumor sowohl das Tumorwachstum limitiert, als auch die neurologischen Störungen auslöst (Pranzatelli 1996). In Seren von OMS-Patienten konnten unterschiedliche antineuronale Auto-Antikörper nachgewiesen werden, wodurch die Autoimmun-Hypothese noch untermauert wird (Hersh 1994, Noetzel 1987, Luque 1991, Antunes 2000, Bataller 2003).

Bei wenigen Kindern mit paraneoplastischem OMS, aber auch bei Neuroblastom-Patienten ohne OMS, wurden anti-Hu Antikörper gefunden (Fisher 1994, Antunes 2000). Anti-Hu Antikörper binden an eine Gruppe RNA-bindender Proteine der Neuronen (Dalmau 1992). Hu-Antigene werden nicht nur von Neuronen, sondern u.a. auch von Neuroblastomzellen exprimiert (Marusich 1994). Im Serum einiger OMS-Kinder, allerdings auch bei Patienten mit anderen neurologischen und auch rheumatologischen Erkrankungen sowie bei gesunden Spendern, wurden Auto-Antikörper gegen Proteine des Neurofilamentes gefunden (Noetzel 1987, Connolly 1997, Stefansson 1985, Braxton 1989, Salih 1998). Des Weiteren wurden antineuronale IgG und IgM-Antikörper bei einigen OMS-Patienten nachgewiesen (Rudnick 2001). Ein gemeinsames Autoantigen konnte bei OMS-Kindern bis jetzt noch nicht identifiziert werden (Antunes 2000, Bataller 2003). Kürzlich konnten aber Auto-Antikörper gegen die Oberfläche von Neuroblastom-Zellen und gegen Granularis-Neurone des Kleinhirns detektiert werden (Blaes 2005, Korfei 2005). Diese Autoantikörper inhibierten die Proliferation von Neuroblastom-Zellen *in vitro* und hatten pro-apoptotische Effekte.

Es wird vermutet, dass OMS-Patienten Antikörper gegen den Tumor bilden und diese in Kreuzreaktion mit neuronalen Zellen die akuten neurologischen Dysfunktionen bedingen (Rudnick 2001). Einige Daten weisen darauf hin, dass das Ziel der Autoimmun-Reaktion

möglicherweise Strukturen des Kleinhirns sind (Blaes 2005). Eine histopathologische Untersuchung des Kleinhirns eines Kindes mit OMS zeigte u.a. einen Verlust von Purkinjezellen und Granularisneuronen (Tuchman 1989).

1.1.6 Das Kleinhirn / Granularis-Neurone

Das Kleinhirn (Cerebellum) von Säugetieren hat große Bedeutung bei der Planung, Koordination und Feinabstimmung, sowie dem Erlernen von Bewegungsabläufen. Mit Hilfe sensibler Nerven werden ständig die Körperbewegungen kontrolliert und Impulse ausgesandt, die zu Muskelkontraktionen führen. Zum Kleinhirn gelangen auch alle Informationen, die unsere Sinnesorgane weiterleiten, wodurch eine Feinabstimmung und Koordination der Motorik erst möglich wird. Seit kurzem wird dem Kleinhirn des Menschen auch eine Rolle bei zahlreichen höheren kognitiven Prozessen zugeschrieben, u.a. beim Sprechen. Dies zu beweisen ist allerdings nicht ganz einfach, weil das Kleinhirn auch für die Koordination der Gesichtsmuskulatur beim Sprechen zuständig ist und somit beim Sprechen in jedem Fall aktiv ist. Eine Unterscheidung zwischen der Kleinhirn-Aktivität aufgrund von Funktionen bei der Sprachbildung und aufgrund höherer kognitiver Prozesse lässt sich schwer treffen. Von besonderer Bedeutung sind die vielfältigen wechselseitigen Verbindungen zwischen dem Kleinhirn und den sensorischen und motorischen Bereichen der Großhirnrinde.
Das Kleinhirn gliedert sich in den im äußeren Bereich liegenden Cortex (graue Rinde) und der im Inneren liegenden Medulla (weiße Substanz / Mark) (siehe auch Abb.1). Die Medulla enthält afferente und efferente Nervenfasern, sowie die Kleinhirnkerne (Ansammlungen von Nervenzellkörper / Nuklei). Der Cortex ist mit Furchen und Windungen durchzogen, welche der Oberflächenvergrößerung dienen. Der Cortex wird in drei Schichten aufgeteilt, wobei jede Schicht durch spezielle Neurone gekennzeichnet ist. Die äußerste Schicht ist die Molekularschicht (Stratum moleculare), in ihr enthalten sind große Stern- und kleine Korbzellen und sie wird von den Dendritenbäumen der Purkinjezellen durchzogen. Darunter befindet sich die Purkinje-Zellschicht (Stratum ganglionare), in der sich die Perikarien der Purkinjezellen befinden. Die unterste Schicht der Kleinhirnrinde ist die Körnerzellschicht (Stratum granulare). Diese Schicht besteht hauptsächlich aus Körnerzellen (Granularisneurone) und Golgi-Zellen. Neben den ubiquitär vorkommenden Gliazellen gibt es im Kleinhirn zusätzlich die Bergmann-Stützzellen, deren Zellkerne sich in der

Körnerzellschicht und ihre Ausläufer in der Molekularschicht befinden (Aufbau des Kleinhirns siehe auch Abb.1).

Die Axone der Purkinjezellen bilden den einzigen Ausgang aus der Kleinhirnrinde. Sie projizieren inhibitorisch auf verschiedene Kleinhirnkerne (Ito 1984). Die sensorischen Eingänge laufen sowohl zur Kleinhirnrinde als auch zu den Kleinhirnkernen. Die Kleinhirnrinde ist somit ein System, das kontinuierlich und selektiv die permanente Aktivität der Kleinhirnkerne moduliert, die auf die motorischen Systeme des Gehirns einwirken.

Es gibt zwei Haupteingangswege in das Kleinhirn: die Kletter- und die Moosfasern. Die Kletterfasern stammen aus einem Kerngebiet des Hirnstammes, der Olive (Oliva inferior). Die Olive empfängt Informationen aus mehreren Hirnregionen und Rückenmarksbahnen. Die Moosfasern kommen aus verschiedenen Arealen des Gehirns und Rückenmarks. Die Kletterfasern ziehen zu den Dendriten der Purkinjezellen in der Kleinhirnrinde. Sie werden besonders dann aktiv, wenn Bewegungen falsch ausgeführt werden, leiten also Fehlermeldungen weiter. Die Moosfasern ziehen zu den Körnerzellen der Kleinhirnrinde, aus denen die Parallelfasern hervorgehen. Die Parallelfasern aktivieren Stern- und Korbzellen, sowie die Golgi-Zellen. Die Stern- und Korbzellen wirken inhibitorisch auf die Purkinjezellen, die Golgi-Zellen auf die Körnerzellen (Eingangs- und Ausgangswege, sowie exzitatorische und inhibitorische Einflüsse der einzelnen Fasern siehe auch Abb.1). Über die Moosfasern erhält das Kleinhirn Informationen über die Lage und Bewegung der Gliedmaßen und über Hautstimulationen, sowie akustische und optische Reize.

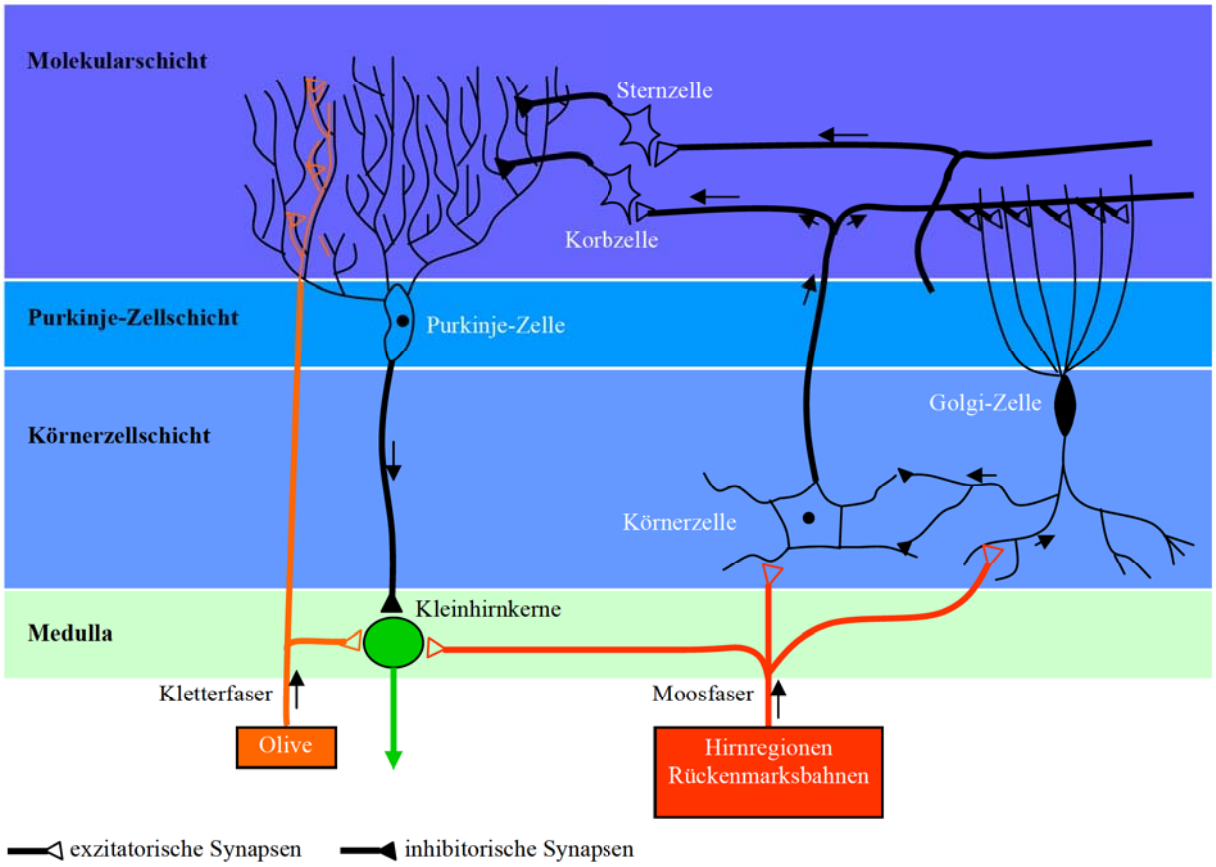

Abbildung 1: Schematischer Aufbau des Kleinhirns
Hier werder die einzelnen Schichten des Kleinhirn mit den typischen Neuron-Typen sowie deren Verbindungen miteinander und mit Regionen außerhalb des Kleinhirns dargestellt. Dabei wird zwischen exzitatorischen und inhibitorischen Synapsen unterschieden.

Die Körnerzellen sind mit die kleinsten Zellen des Körpers (Durchmesser ca. 5 µm), stellen aber die größte Anzahl aller Neurone im Säugetiergehirn. Jede Körnerzelle verfügt über vier kurze, unverzweigte Dendriten und sendet jeweils ein Axon in die Molekularschicht. Dort verzweigen sich die Axone und bilden die sogenannten Parallelfasern, welche exzitatorische Synapsen mit den Dendriten der Stern-, Korb- und Golgi-Zellen bilden (Thompson 2001, Trepel 2004).

Abhängig von der geschädigten Region des Kleinhirns treten unterschiedliche Funktionsstörungen auf. Es kann zu einer zerebellären Ataxie, zu einer mangelhaften Blickstabilisierung und zu einem herabgesetzten Muskeltonus kommen. Ataxien sind Störungen in der Gleichgewichtsregulation und der Koordination von Bewegungen. Die mangelhafte Blickstabilisierung äußert sich in einem Nystagmus (Thompson 2001, Trepel 2004). Nystagmen sind ruckartige Blickfolgebewegungen und Augenzittern.

1.2 Immunglobulin G und seine Subklassen

Immunglobuline werden von aktivierten B-Zellen (Plasmazellen) in großen Mengen ins Blut abgegeben. Es handelt sich um Glykoproteine, die in monomerer Form vorliegen und aus zwei identischen leichten und zwei identischen schweren Ketten bestehen, die in einer Y-förmigen Grundstruktur angeordnet sind (Edelman 1991). Je eine leichte Kette ist mit einer schweren Kette über Disulfidbrücken verbunden und bildet einen der beiden Arme des Ypsilons, einen Fab-Teil (Porter 1991, Yamaguchi 1995). Die beiden schweren Ketten sind im „unteren" Teil ebenfalls miteinander verbunden und bilden den Fc-Teil (Porter 1991, Yamaguchi 1995). Immunglobuline bestehen demnach aus zwei Fab-Teilen und einem Fc-Teil (Porter 1991, Yamaguchi 1995) (IgG-Aufbau siehe auch Abb.2). Die oberen Bereiche der Fab-Teile sind hochvariabel und interagieren spezifisch mit dem entsprechenden Epitop eines Antigens (Han 1995, Poljak 1991). Der Fc-Teil ist bei allen Immunglobulinen identisch. Mit ihm binden sie an Fc-Rezeptoren, welche von Immuneffektorzellen (z.B. Makrophagen, Monozyten, NK-Zellen und neutrophilen Granulozyten) auf ihrer Oberfläche exprimiert werden (Han 1995, Jefferis 1995). Diese Bindung induziert die Phagozytose der Antigen-Antikörper-Komplexe. Die Fc-Anteile der Antigen-Antikörper-Komplexe binden auch an Komplementproteine und lösen so die Komplementkaskade aus (Sensel 1997). Die Komplementkaskase aktiviert Phagozyten, hilft ihnen beim Aufnehmen von infizierten Zellen und Mikroben und kann Krankheiterreger auch direkt zerstören. Der Fc-Teil kann außerdem einen spezifischen Rezeptor aktivieren, der den aktiven Transport des Immunglobulins durch Zellen in andere Bereiche des Körpers steuert (Jefferis 1995). Anhand der unterschiedlichen schweren Ketten lassen sich die Immunglobuline in die Klassen IgM, IgG, IgA, IgD un IgE einteilen (Davies 1983). Im Serum gesunder Menschen sind die Ig-Klassen IgG, IgA, IgM IgD und IgE in abnehmender Konzentration vorhanden (Thomas 1984).

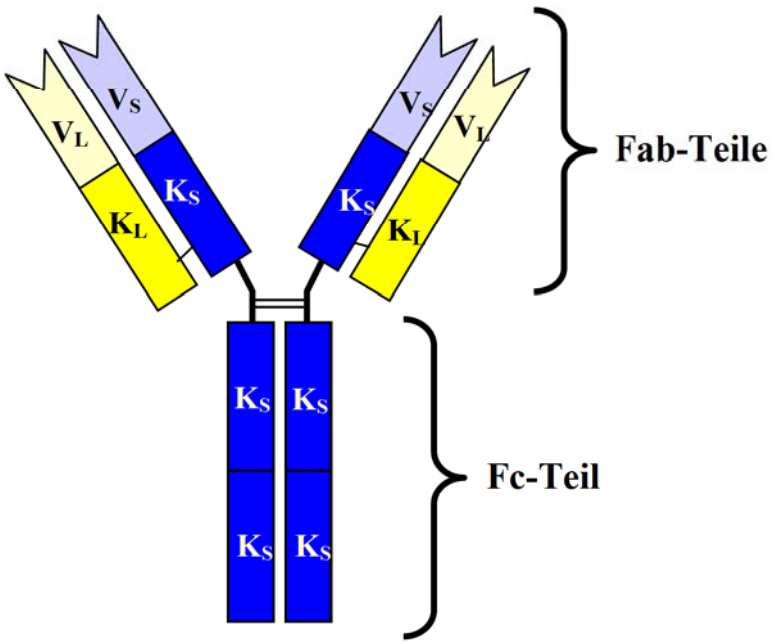

Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines IgG-Moleküls
V_L= variabler Bereich der leichten Kette, K_L= konstanter Bereich der leichten Kette, V_S= variabler Bereich der schweren Kette, K_S= konstanter Bereich der schweren Kette

IgGs stellen mit 75 % den größten Anteil der Immunglobuline im Serum. Sie sind die kleinsten der Immunglobuline, zirkulieren im Blutplasma und sind in Körpersekreten vorhanden. Außerdem können sie in unterschiedliche Epithel-Gewebe eindringen, wie z.B. in die Plazenta (Mostov 1994). Antigene werden von IgGs sehr spezifisch gebunden. IgGs werden bei einer Erstinfektion mit einem bestimmten Erreger erst nach ungefähr drei Wochen gebildet. Bei einer erneuten Infektion mit demselben Erreger werden IgGs allerdings sehr schnell und in großen Mengen produziert.

Es gibt vier verschiedene IgG-Subklassen mit unterschiedlichen Funktionen, welche in Abhängigkeit vom Erreger- und Antigentyp gebildet werden. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass jede IgG-Subklasse unterschiedliche biologische Funktionen aktivieren kann. Dies ist abhängig von verschiedenen Parametern wie z.B. der Epitopendichte und dem Verhältnis von Antigenen zu Antikörpern (Voice 1997, Lucisano Valim 1991). Die menschlichen IgG-Subklassen werden entsprechend ihrer Menge im Serum bezeichnet, IgG1 ist das häufigste, es umfasst ca. 70 % der IgGs (Davies 1983). Sie haben verschiedene Fc-Regionen, was zu unterschiedlichen funktionellen Effekten der IgG-Subklassen führt, u.a. weil sie von unterschiedlichen Immuneffektorzellen erkannt werden (Jefferis 1994, Burton 1986). IgG2 ist weniger effektiv in der Komplementaktivierung und in der Bindung an Fc-Rezeptoren wie IgG1, IgG3 hat eine noch stärkere aktivierende Wirkung wohingegen IgG4

das Komplementsystem gar nicht aktivieren kann (Lucisano Valim 1991, Maguire 2002). Die Fc-Bereiche von IgG1 und IgG3 werden u.a. von Fc-Rezeptoren der Phagozyten erkannt (z.B. Makrophagen und neutrophilen Granulozyten) (Jefferis 1995). Diese Zellen binden an IgG-markierte Krankheitserreger und nehmen diese auf.

Die Synthese der IgG-Subklassen im Verlauf einer Immunantwort ist abhängig von der Natur der Antigene, ihrer Eintrittspforte und der Dauer der Antigenexposition (Thomas 1984, Maguire 2002). Bei Protein-Antigenen, wie Bakterien und Viren, wird vermehrt IgG1 und IgG3 synthetisiert. An Polysaccharid-Antigene, z.B. bekapselte Bakterien, binden vorwiegend IgG2- und teilweise IgG1-Antikörper. IgG4 richtet sich gegen polyvalente, Allergen-spezifische Antigene, wie Parasiten, Insekten, Schlangengifte und Nahrungsmittel bei chronischer Antigenstimulation.

Die klinische Relevanz eines IgG-Subklassenmangels ist nicht immer klar und gilt nur als Indikator für ein gestörtes Immunsystem (Thomas 1984). Bei Mangel an einer bzw. mehrerer IgG-Subklassen können unterschiedliche Symptome auftreten. Niedrige IgG1-Konzentrationen führen zur allgemeinen Immundefizienz. Ein Mangel an IgG2 führt überwiegend zu Infektionen mit bekapselten Bakterien. Im Kindesalter liegt häufig ein IgG2 und IgG4-Mangel vor. Ein Mangel an IgG3-Antikörpern verursacht u.a. Fieberschübe, Durchfälle und ist oft kombiniert mit einem IgG1-Mangel. Ein IgG4 Mangel ist meist kombiniert mit einem IgG2- und/oder IgA-Mangel. Die Ursache eines IgG-Subklassenmangels ist meist ein Regulationsdefekt.

Pathologisch erhöhte IgG-Subklassen sind häufig bei chronischer Antigenstimulation. Eine erhöhte IgG4-Konzentration tritt beispielsweise bei Allergikern auf.

Immunglobulin G von gesunden Spendern wird auch zu therapeutischen Zwecken intravenös verabreicht (IVIG). Es wird z.B. bei Antikörpermangel sowie zur Modulation des Immunsystems bei Autoimmunerkrankungen eingesetzt.

1.3 Natürliche Killerzellen

10 – 15 % der im Blut zirkulierenden Lymphozyten sind Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) (Robertson 1990). Morphologisch werden sie definiert durch die Anwesenheit des Oberflächenmoleküls CD 56 (neural-cell adhesion molecule (N-CAM)) bei gleichzeitigem Fehlen des T-Zell-Markers CD 3 (Cooper 2001). Neben CD 56 besitzen NK-Zellen viele weitere Oberflächenmoleküle, z.B. CD 16 (FcγIII-Rezeptor). Anhand der Anzahl der CD 16 und CD 56 Molekülen auf der Oberfläche der NK-Zellen können diese in zwei Subpopulationen unterteilt werden (Lanier 1986, Cooper 2001). 90 % der NK-Zellen besitzen eine hohe Dichte an CD 16 auf ihrer Oberfläche, exprimieren aber nur im geringen Maß CD 56. Diese Zellen haben primär zytotoxische Funktionen (Lanier 1986). 10 % der NK-Zellen exprimieren nur wenig CD 16 auf ihrer Oberfläche, dafür aber eine große Anzahl CD 56. Sie wirken hauptsächlich immunregulatorisch durch Zytokinsekretion (Lanier 1986). Die beiden NK-Zell-Subpopulationen unterscheiden sich in ihrer zytotoxischen Aktivität, Rezeptorexpression und Zytokin-Sekretion (Cooper 2001).

Wie B- und T-Zellen entwickeln sich NK-Zellen im Knochenmark aus lymphatischen Vorläuferzellen. Sie sind größer als B- und T-Zellen und enthalten toxische Granulen in ihrem Zytoplasma. NK-Zellen exprimieren keine Antigen-spezifischen Rezeptoren. Sie gehören zum angeborenen Immunsystem und sind besonders in der frühen Phase der Immunantwort wichtig, weil sie ihre Zielzellen ohne vorherige Aktivierung und Antikörperbildung erkennen und abtöten können (Barao 1998, Biron 1999). Zur Lyse der Zielzellen werden zytotoxische Granula an der Oberfläche der gebundenen Zielzellen freigesetzt. Die in der Granula enthaltenen Effektorproteine durchdringen die Zellmembran und lösen den programmierten Zelltod (Apoptose) aus (Yoon 1998). Zu ihren Zielzellen gehören infizierte Zellen und Tumorzellen, sowie körperfremde Zellen und Bakterien. Bei der Zerstörung infizierter Zellen werden Viren bzw. Bakterien freigesetzt und bieten so bessere Angriffspunkte z.B. für Makrophagen. Im Normalfall werden Tumorzellen und infizierte Zellen von T-Zellen durch die Präsentation von Fremd-Antigenen durch MHC-I-Moleküle erkannt und eliminiert. Einige Viren und Tumorzellen können jedoch die MHC-I Expression unterdrücken, wodurch sie der T-Zell-Antwort entgehen. NK-Zellen erkennen infizierte Zellen und Tumorzellen an Veränderungen der Zelloberfläche, vor allem am Verlust oder an Modifikationen der MHC-I-Moleküle (Missing-self-Theorie) (Ljunggren 1985, Bubenik 2004). Auch Zellen, die mit Antikörpern bedeckt sind, werden von NK-Zellen erkannt und abgetötet. NK-Zellen werden

somit zu einem Bindeglied zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem (Trinchieri 1989). Zur Identifikation und Lyse von schädlichen Zellen verwenden sie zwei verschiedene Mechanismen, die natürliche Zytotoxizität und die Antikörper-abhängige, zelluläre Zytotoxizität (ADCC). Bei der natürlichen Zytotoxizität sind zum Erkennen und Abtöten der Zielzellen keine Antikörper nötig. Sie spielt bei der physiologischen Abwehr von Tumorerkrankungen eine wichtige Rolle (Wu 2003). Bei der ADCC erkennt und bindet der FcγIII-Rezeptor (CD 16) den Fc-Teil des Immunglobulin G der Subklassen 1 und 3, wodurch die NK-Zelle aktiviert wird (Graziano 1987).

Wie bereits erwähnt exprimieren NK-Zellen neben CD 16 noch viele weitere Rezeptoren. Die NK-Zell-Rezeptoren werden näherungsweise in hemmende und aktivierende Rezeptoren unterteilt und verschiedenen Subklassen zugeordnet (Moretta 2001). Die meisten NK-Zell-Rezeptoren binden an MHC-I-Moleküle und ihre Anzahl auf der Oberfläche einer NK-Zelle korreliert mit der zytotoxischen Aktivität der Zelle (Moretta 2001, Sivori 1999, Renard 1997). Ob die NK-Zelle durch die Bindung an eine Zelle aktiviert wird und diese lysiert oder ob sie inaktiv bleibt, hängt von der Anzahl gebundener inhibitorischer und aktivierender Rezeptoren ab (Farag 2002, Renard 1997).

Die Aktivität von NK-Zellen kann durch verschiedene Zytokine zusätzlich erhöht werden, z.B. durch Interleukin-12 (IL-12) oder durch Interferon alfa und beta (IFNα und IFNβ), welche von Makrophagen sezerniert werden (Cooper 2001, Biron 1999).

Werden NK-Zellen aktiviert, lysieren sie nicht nur ihre Zielzelle, sondern produzieren und sezernieren auch selbst Zytokine. Dadurch haben NK-Zellen Einfluss auf die Regulation der Immunantwort, können Entzündungen auslösen und Tumorwachstum reduzieren. Sie beeinflussen die Aktivierung und Entwicklung der folgenden erworbenen Immunantwort (Horwitz 1997, Fearon 1996, Kos 1998, Zitvogel 2002). Zu den von NK-Zellen sezernierten Zytokinen gehören u.a. Interferon gamma (IFNγ), Tumor-Nekrose-Faktor alfa (TNF-α), Granulocyte-Macrophage Colony stimulating factor (GM-CSF) und verschiedene Interleukine (IL) (Saikali 2007, Salazar-Mather 2000, Cooper 2001 (Blood)). IFNγ spielt beispielsweise eine Rolle bei der Kontrolle malignen Wachstums und fördert die Expression von MHC-I-Molekülen bzw. deren modifizierten Varianten der Tumorzellen, wodurch diese besser erkannt werden können (Lee 2000, Gobin 2000, Yao 1999).

1.4 B-Zell aktivierende Faktoren

1.4.1 B-Lymphozyten / B-Zellen

B-Lymphozyten stehen im Zentrum der humoralen Immunantwort. Sie entwickeln sich im Knochenmark aus Stammzellen über verschiedene Vorläuferzellen zu unreifen B-Zellen (Hardy 1991, Rosenberg 1994, Kee 1995, Loffert 1994). Bevor die unreife B-Zelle in die Peripherie entlassen wird, findet eine positive Selektion statt bei der die Bindungsfähigkeit, die Überlebensfähigkeit und die Selbst-Toleranz der unreifen B-Zellen überprüft wird (Nossal 1994, Linette 1994, Rajewsky 1996). Auf dem Weg durch die Peripherie in die peripheren Lymphorgane findet eine negative Selektion an Auto-Antigenen statt. B-Zellen, die körpereigene Antigene erkennen und binden, werden durch Apoptose eliminiert (Rolink 1999). In peripheren Lymphorganen, wie z.B. der Milz, erreichen B-Zellen ihre volle Reife. Dort wird u.a. BAFF (**B**-Zell **a**ktivierender **F**aktor aus der Tumor Nekrose Faktor (TNF)-**F**amilie) ausgeschüttet, wodurch bei einer Interaktion von BAFF mit seinen Rezeptoren das Überleben der B-Zellen und ihre Differenzierung zu reifen B-Zellen und nach Aktivierung zu Plasmazellen reguliert wird (Mackay 2003, Thompson 2000). Reife B-Zellen exprimieren Immunglobulin-Moleküle (B-Zell Rezeptoren) auf ihrer Oberfläche, mit denen sie jeweils an ein bestimmtes Antigen binden können. Sie zirkulieren im Blut durch den Körper in sekundäre lymphatische Organe (Milz, Lymphknoten). Dort treffen sie auf fremde Antigene und können durch diese aktiviert werden. Jede B-Zelle bindet nur an ein einziges Antigen-Epitop und sezerniert nur Antikörper gegen das gebundene Antigen (Rajewsky 1996). Um eine effektive Immunantwort zu gewährleisten, ist die Variabilität der B-Zellen sehr groß, jeder Mensch besitzt B-Zellen gegen ca. 10^{11} verschiedene Antigen-Epitope (Schatz 1992, Melchers 2000). Wie bereits unter 1.2 erwähnt, sezernieren B-Zellen verschiedene Isotypen von Immunglobulinen. Im Frühstadium der Antikörperreaktion überwiegen IgM-Antikörper, aber auch wenige IgD-Antikörper werden sezerniert. Später kommt es zu einem Isotypenwechsel und IgG und IgA sind die vorherrschenden Isotypen, ebenfalls wird in geringem Maße IgE sezerniert (Stavnezer 1996).

B-Zellen sind relativ langlebig, sie haben eine Halbwertszeit von ein bis zwei Monaten (Linette 1994). Werden B-Zellen durch die Bindung an ein Antigen und teilweise von T-Helferzellen aktiviert, teilen sie sich, damit genügend Effektorzellen zur Bekämpfung der

Infektion vorhanden sind (Liu 1991, Parker 1993, Anderson 1977). Die Nachkommen differenzieren zu Plasma- und Gedächtniszellen (Coico 1983, Takahashi 1998). Plasmazellen sezernieren ca. 2.000 Antikörper pro Sekunde, leben aber nur vier bis fünf Tage (Manz 1997). Ein wichtiger Produktionsort für Antikörper ist das Knochenmark (Tew 1992, Benner 1981). Gedächtniszellen sind extrem langlebig, teilen sich aber bis zu einem Zweitkontakt mit dem Antigen nicht mehr. Beim Erstkontakt mit einem Antigen kommt es erst mit einer Verzögerung von einigen Tagen zu einer adaptiven Immunantwort, weil die Proliferation und Differenzierung zu Effektorzellen Zeit braucht. Wie bereits erwähnt haben Plasmazellen nur eine begrenzte Lebensdauer. Wenn das Antigen eliminiert wurde, gehen sie in Apoptose. Durch die Bildung von Gedächtniszellen können bei einem Zweitkontakt wesentlich schneller Antikörper gebildet werden, welche zudem noch eine höhere Affinität zum Antigen haben und der Schutz wesentlich länger anhält (Coico 1983, Slifka 1998).

Es gibt verschiedene Effektormechanismen auf die humorale Immunantwort. Bei der Neutralisation blockiert der Antikörper eine bestimmte Stelle des Antigens, wodurch dieses unwirksam wird. Der Antikörper-Antigen-Komplex wird durch phagozytierende Zellen beseitigt. Bei der Agglutination werden benachbarte Antigen-Moleküle, z.B. Bakterien, vernetzt, wodurch diese leichter durch phagozytierende Zellen gefunden werden. Bei der Präzipitation werden lösliche Antigene vernetzt, wodurch immobile Präzipitate gebildet werden, die ebenfalls von Phagozyten aufgenommen werden. Antikörper-Antigen-Komplexe können auch das Komplementsystem aktivieren, was zur Lyse der Zelle führt.

Neben der Antikörperproduktion fungieren B-Zellen auch als Antigen-präsentierende-Zellen. Wenn sie ein Antigen gebunden haben, nehmen sie dieses auf und präsentieren Peptidfragmente als Peptid-MHC-Komplexe auf ihrer Oberfläche.

1.4.2 BAFF (B-Zell aktivierender Faktor aus der TNF-Familie) und seine Rezeptoren

BAFF wurde erst vor wenigen Jahren entdeckt. Es ist ein Mitglied der Familie der Tumor Nekrose Faktoren (TNF) und gilt als essentieller Überlebensfaktor für B-Zellen (Schneider 1999). Weil das Protein zeitgleich von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben wurde, ist es unter verschiedenen Namen bekannt. Weitere Namen sind BlyS (B Lymphocyte Stimulator), TALL-1 (TNF- and ApoL related leukocyte-expressed ligand 1), THANK (TNF Homolog activates apoptosis, nuclear factor-κB und c-Jun NH_2-terminal kinase), zTNF4 (z-tumor

necrosis factor 4) und TNFSF13b (TNF-Superfamily Member 13b) (Moore 1999, Shu 1999, Mukhopadhyay 1999, Gross 2000).

Die TNF-Familie wurde nach dem ersten entdeckten Mitglied benannt, welches eine zytotoxische Wirkung auf Tumorzellen hat (Carswell 1975). Die Zytokine dieser Familie spielen u.a. eine wichtige Rolle in der Regulation von Entzündungsreaktionen, bei der Immunantwort auf Infektionen und der Aufrechterhaltung der Gewebehomöostase (Smith 1994). Sie können sowohl die Proliferation, das Überleben und die Differenzierung von Zellen als auch Apoptose beeinflussen und induzieren (Aggarwal 2003, Gaur 2003). Eine Störung ihrer Funktion kann zu Krankheiten wie Krebs und Autoimmunität führen.

BAFF wurde bei der Suche nach TNF-homologen DNA-Sequenzen entdeckt (Schneider 1999). Es tritt in der für Mitglieder der TNF-Familie typischen (homo-) trimeren Struktur auf und hat die größte Proteinsequenz-Homologie mit APRIL (A proliferation inducing ligand), einem weiteren Mitglied dieser Familie auf das weiter unten näher eingegangen wird (Bodmer 2002, Karpusas 2002, Oren 2002). Neben einer membrangebundenen und einer löslichen, sezernierten Form, welche beide biologisch aktiv sind, ist auch eine Splice-Variante von BAFF bekannt, das ΔBAFF (Schneider 1999). BAFF wird an Membranen gebunden exprimiert, bevor es proteolytisch freigesetzt wird (Nardelli 2001). ΔBAFF kommt nur membrangebunden vor und kann Heteromultimere mit BAFF bilden. Durch die Bildung dieser Komplexe wird die Freisetzung von löslichem BAFF verhindert. ΔBAFF kann auf diese Weise die Bioaktivität von BAFF negativ regulieren (Gavin 2003, Gavin 2005). BAFF bildet aber nicht nur mit ΔBAFF Heteromultimere, besonders während einiger Autoimmunerkrankungen bildet es auch Heterotrimere mit APRIL (Roschke 2002). Allerdings ist nicht bekannt, welchen Rezeptor diese Heterotrimere binden und an welchem Ort sie synthetisiert werden. Bei der löslichen Form von BAFF können sich durch Interaktionen zwischen BAFF-Trimeren geordnete und symmetrische Oligomere aus bis zu 20 BAFF-Trimeren bilden (Zhukovsky 2004, Pelletier 2003, Liu 2002). Durch diese „virus-like Cluster“ kann die Signalübermittlung am Rezeptor gesteigert werden (Schneider 1998). BAFF bindende Rezeptoren sind BAFF-R (BAFF-Rezeptor, TNFRSF 13C), BCMA (B cell maturation antigen, TNFRSF 17) und TACI (transmembran activator and CAML interactor, TNFRSF 13B), wobei BAFF nur eine geringe Affinität zu BCMA hat (Marsters 2000). BCMA und TACI binden neben BAFF auch APRIL, aber für BAFF-R ist BAFF der einzige bisher bekannte Ligand (Masters 2000, Yan 2000, Thompson 2001) (Interaktion von BAFF mit seinen Rezeptoren siehe auch Abb.3). BAFF-R und BCMA werden fast ausschließlich auf reifen B-Zellen exprimiert, eine schwache Expression von BAFF-R wurde zusätzlich bei

ruhenden T-Zellen nachgewiesen (Yan 2001, Marsters 2000, Laabi 1992, Yan 2000). TACI wird von B-Zellen sowie von ruhenden und aktivierten T-Zellen exprimiert (Wu 2000, Yan 2001). TACI ist genau wie BAFF-R ein Membranprotein, BCMA ist hauptsächlich im Golgi-Apparat lokalisiert (Gras 1995, Novak 2004). Für die Funktion von BAFF als B-Zell-Überlebensfaktor wird allein die Interaktion zwischen BAFF und BAFF-R verantwortlich gemacht (Mackay 2003) (Hauptfunktionen von BAFF im Immunsystem vermittelt durch die Rezeptoren siehe Abb.3). Dabei hat BAFF eine verstärkende Wirkung auf die Expression anti-apoptotischer Proteine und wirkt hemmend auf die Expression pro-apoptotischer Gene der B-Zellen ein (Craxton 2005, Batten 2000, Do 2000, Amanna 2001). BAFF hat allerdings nicht auf alle Stadien in der B-Zell-Reifung Einfluss, es wirkt selektiv auf bestimmte Reifungsstadien (Mackay 2003, Hsu 2002). Bei der Entwicklung von Stammzellen zu unreifen B-Zellen scheint BAFF keine Rolle zu spielen. Erst während der Reifung und der Differenzierung zu Plasmazellen ist BAFF von Bedeutung (Schiemann 2001, Schneider 2001, Gross 2001). So treten z.B. bei BAFF-knockout Mäusen starke Verluste der peripheren B-Zellpopulationen auf, die B-Zellentwicklung ist ohne die Anwesenheit von BAFF blockiert (Schiemann 2001, Gross 2001, Rolink 2002). Dies zeigt, dass BAFF die Überlebensrate von B-Zellen steigert, es erhöht aber auch die Überlebensrate von aktivierten B-Gedächtniszellen (Avery 2003). Es wurde gezeigt, dass BAFF allein nicht in der Lage ist eine B-Zell-Proliferation zu induzieren. Die Steigerung der Proliferation scheint eine Konsequenz der höheren Zahl lebender, in den Zellzyklus eintretender B-Zellen zu sein (Schneider 1999). Eine Inhibition von BAFF löst eine Reduktion der B-Zellzahl und Antikörperproduktion aus (Yan 2000, Yu 2000). Während der Differenzierung zu Plasmazellen verändert sich die Expression einiger Oberflächenrezeptoren. Wie bereits erwähnt, wird die Wirkung von BAFF auf die B-Zell-Reifung hauptsächlich durch seine Bindung an BAFF-R vermittelt (Mackay 2003). Plasmazellen exprimieren nur geringe Mengen BAFF-R, dagegen in verstärktem Maße BCMA. Außerdem kann die Überlebensrate von Plasmazellen auch durch die Stimulation mit APRIL gesteigert werden. Deshalb wird vermutet, dass die Wirkung von BAFF auf das Überleben der Plasmazellen eher über BCMA als durch BAFF-R vermittelt wird (Avery 2003, Tarte 2002). Die bisherigen Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass TACI ein inhibitorischer BAFF-Rezeptor ist, der bei der Regulation der B-Zell-Funktion eine Rolle spielt und einen Beitrag zur Beendung der B-Zellantwort leistet (Seshasayee 2003). Durch BAFF und APRIL kann auch ein Antikörper-Isotypenwechsel in B-Zellen bewirkt werden, welcher durch TACI und BAFF-R vermittelt wird (Schneider 2005, Litinskiy 2002, Castigli 2005). Einige Veröffentlichungen legen zusätzlich die Vermutung nahe, dass BAFF auch eine

wichtige Rolle bei der Regulation der T-Zell-Antwort spielt (Huard 2001, Huard 2004, Ng 2004, Sutherland 2005).

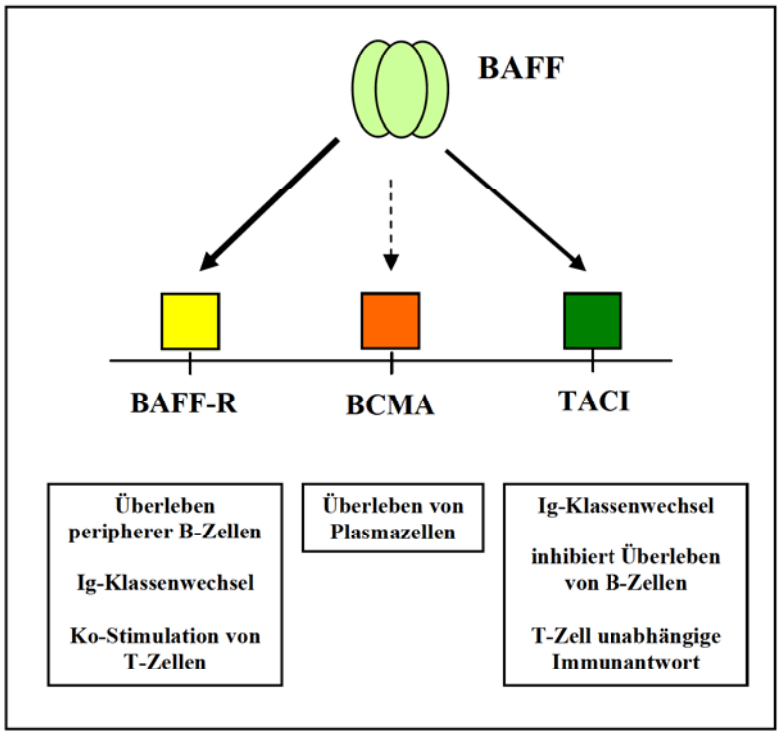

Abbildung 3: Interaktionen von BAFF mit seinen Rezeptoren und ihre Funktion im Immunsystem
In dieser Abbildung ist dargestellt an welche Rezeptoren BAFF bindet und wie stark seine Affinität zu dem jeweiligen Rezeptor ist (Pfeildicke). Des Weiteren sind die Funktionen aufgelistet, welche BAFF durch seine Bindung an den jeweiligen Rezeptor vermittelt.

BAFF wird hauptsächlich in der Milz, den Lymphknoten und in peripheren Blutleukozyten expimiert. Eine schwache Expression konnte auch in Thymus, Herz, Plazenta, Dünndarm und Lunge gezeigt werden (Schneider 1999, Moor 1999). Exprimiert wird BAFF von Zellen myeloiden Ursprungs, wie Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen (Moor 1999). Aber auch neutrophile Granulozyten und Astrozyten exprimieren BAFF und in geringen Mengen auch T-Zellen (Scapini 2003, Krumbholz 2005, Farina 2007). Im Gegensatz zu Monozyten und Dendritischen Zellen wird BAFF von ihnen aber nicht in die Membran eingebaut und dann proteolytisch gespalten, sondern bereits intrazellulär prozessiert und sofort sezerniert (Scapini 2003). Die Produktion von BAFF wird durch verschiedene Zytokine beeinflusst. In myeloiden Zellen, Speicheldrüsen-Epithelzellen und Astrozyten konnte die BAFF-Expression u.a. durch Stimulation mit IFNγ erhöht werden (Nardelli 2001, Craxton 2003, Scapini 2003, Litinskiy 2002, Ittah 2006, Krumbholz 2005). Dies war einer der Gründe warum in dieser Arbeit IFNγ zur Stimulation von verschiedenen Zellen verwendet

wurde. Die bisher genannten BAFF-produzierenden Zellen sind nicht in direkter Nähe zu den meisten B-Zellen lokalisiert und Untersuchungen zeigten, dass aus dem Knochenmark stammende Zellen nicht genug BAFF produzieren, um die physiologische Zahl peripherer B-Zellen aufrecht zu erhalten. Vermutlich wird BAFF zusätzlich noch von spezialisierten Stromazellen der Milz und der Lymphknoten exprimiert, den follikulären Dendritischen Zellen, welche in der Nähe von sich differenzierenden B-Zellen zu finden sind (Hase 2004, Gorelik 2003, Cyster 2000). Von gesunden B-Zellen wird BAFF nicht exprimiert, aber unter pathologischen Bedingungen, z.B. bei malignen B-Zellen, kann BAFF auch von B-Zellen exprimiert werden (Ng 2004, Novak und Grote 2004, Fu 2006). Dadurch erhöht sich nicht nur die Zahl maligner B-Zellen, sondern auch die autoreaktiver B-Zellen.

Besonders wichtig bei der Vermeidung von Autoimmunerkrankungen ist die Regulierung des Überlebens von Zellen. Wie bereits beschrieben ist BAFF ein Zytokin, welches Einfluss auf das Überleben von B-Zellen hat. Bei einer Überexpression von BAFF, wie es bei einigen BAFF transgenen Mäusestämmen der Fall ist, treten Symptome von Autoimmunerkrankungen auf, welche teilweise auch auf pathogene Auto-Antikörper zurückzuführen sind (Gross 2000, Mackay 1999, Khare 2000). Die Tiere entwickeln z.B. Symptome des auch beim Menschen bekannten Sjörgen´s Syndroms, bei dem aufgrund der Zerstörung der Drüsenzellen nur noch geringe Mengen an Speichel produziert werden (Groom 2002). Bei Patienten mit dem Sjörgren´s Syndrom und auch bei Patienten mit anderen autoimmunen Erkrankungen konnte eine erhöhte Menge an BAFF im Serum nachgewiesen werden (Zhang 2001, Matsushita 2006). Die Höhe der BAFF-Spiegel bei Sjögren´s Syndrom-Patienten korreliert sowohl mit der Schwere der Krankheit als auch mit der Menge an Auto-Antikörpern, die produziert werden (Zhang 2001, Mariette 2003). Die Aktivierung und Selektion von B-Zellen werden durch verschiedene Signale reguliert, u.a. durch BAFF. Wie bereits erwähnt, beeinflusst BAFF die Expression von pro- und anti-apoptotischen Proteinen durch B-Zellen. Wenn eine B-Zelle nur schwache Apoptose-Signale erhält, z.B. durch die sehr schwache Bindung an ein körpereigenes Antigen, so verhindert eine physiologische BAFF-Konzentration die Apoptose, so dass die B-Zelle heranreifen kann (Abb.4A) (Bannish 2001). Bindet eine B-Zelle hochaffin an ein Auto-Antigen, bekommt sie ein starkes Apoptose-Signal, welches physiologische BAFF-Konzentrationen nicht ausgleichen können, und die Zelle geht in Apoptose (Abb.4B). Wenn allerdings eine Überproduktion von BAFF stattfindet können auch starke Apoptose-Signale unterdrückt werden, wodurch autoreaktive B-Zellen heranreifen und Autoimmunerkrankungen auftreten (Abb.4C) (Mackay 2002).

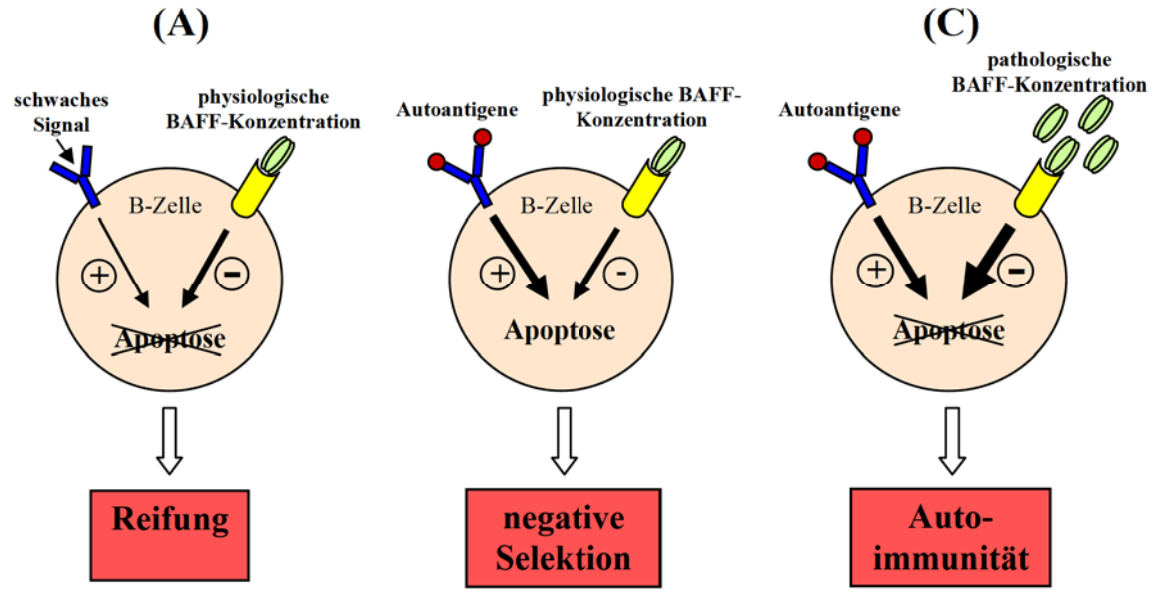

Abbildung 4: Schematische Darstellung der Rolle von BAFF bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen

Auf das Überleben einer B-Zelle haben während der „negativen Selektion" unterschiedliche Rezeptoren und ihre Liganden Einfluss. Bindet an das Oberflächen-exprimierte Immunglobulin ein Ligand wirkt sich dies je nach stärke der Ligandenbindung schwach bzw. stark Apoptose-auslösend aus. Bindet BAFF an einen BAFF-Rezeptor auf der Oberfläche der B-Zelle kann dies bei einer physiologischen BAFF-Konzentration ein schwaches pro-apoptotisches Signal ausgleichen, so dass die B-Zelle reifen kann. Ist die BAFF-Konzentration pathologisch erhöht, wird auch das pro-apoptotische Signal eines Auto-Antigens unterdrückt, so dass sich autoreaktive B-Zellen entwickeln können.

Weil BAFF bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen eine Rolle spielt, bietet es ein Ziel für therapeutische Behandlungsansätze. Behandlungen mit neutralisierenden Antikörpern gegen BAFF-Rezeptoren zeigten im Tiermodell bereits Behandlungserfolge und erste klinische Studien werden bereits durchgeführt (Gross 2000, Gross 2001, Mackay 2002, Seyler 2005, Liu 2004, Baker 2003).

1.4.3 APRIL (A proliferation inducing ligand)

Den Namen APRIL bekam dieses Mitglied der TNF-Familie, weil es das Wachstum von Tumorzellen stimuliert (Hahne 1998, Rennert 2000). Auch für APRIL gibt es noch weitere Synonyme, es wird TALL-2 (TNF- and ApoL-related leukocyte-expressed ligand-2), TRDL-1

(TNF-related death ligand-1) und auch TNFSF13 (TNF superfamily member 13) genannt (Shu 1999, Hahne 1998, Kelly 2000). Die physiologische Funktion von APRIL und seine Rolle im Immunsystem sind noch nicht vollständig verstanden.

In geringen Mengen wird APRIL von den meisten gesunden Geweben exprimiert, eine hohe APRIL-Expression wurde u.a. in Tumorzellen gezeigt (Kelly 2000, Moreaux 2005, Rennert 2000, Roth 2001, Stein 2002). Wie BAFF wird auch APRIL hauptsächlich von Zellen myeloiden Ursprungs exprimiert (Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen), aber auch u.a. von B-Zellen und vermutlich auch von Stromazellen des Knochenmarks (Craxton 2003, Huard 2004, Bonci 2004, Kern 2004, Litinskiy 2002, Moreaux 2005, O´Connor 2004, Pradet-Balade 2002, Shu 1999, Stein 2002). Makrophagen exprimieren allerdings wesentlich mehr APRIL als Monozyten und Dendritischen Zellen, was durch eine posttranskriptionelle Regulation bei Monozyten und Dendritischen Zellen oder durch unterschiedliche Prozessierung und Sekretion bedingt sein kann (Craxton 2003). Auch die APRIL-Expression kann durch verschiedene Stimulantien, wie z.B. IFNγ, gesteigert werden (Craxton 2003, Litinskiy 2002).

APRIL ist ein lösliches Protein, eine membrangebundene Form ist nicht bekannt. Es wird intrazellulär im Golgi-Kompartiment prozessiert und danach als Homotrimer sezerniert (Loprz-Fraga 2001, Wallweber 2004). Anders als bei BAFF existieren allerdings keine geordneten und symmetrischen Oligomere von APRIL (Bossen 2006). Es gibt drei APRIL-Isoformen: APRIL-α, -β und –γ. Die Isoform-α enthält den kompletten Leserahmen von APRIL, bei APRIL-β und –γ handelt es sich um Splice-Varianten, deren funktionelle Bedeutung noch nicht geklärt ist (Kelly 2000). Das Gen eines weiteren Mitglieds der TNF-Familie, TWEAK, ist neben dem Gen von APRIL lokalisiert. Durch einen alternativen Spleißvorgang kann APRIL auch als Transmembran-Hybridprotein vorliegen, welches TWE-PRIL genannt wird (Chicheportiche 1997, Pradet-Balade 2002). TWE-PRIL konnte in T-Zellen und Monozyten detektiert werden (Pradet-Balade 2002).

APRIL bindet an drei verschiedene Rezeptoren: BCMA, TACI und Proteoglykan (Interaktion von APRIL mit seinen Rezeptoren siehe auch Abb.5) (Marsters 2000, Bischof 2006, Hendriks 2005, Ingold 2005). BCMA bindet APRIL mit einer höheren Affinität als TACI, TACI bindet BAFF mit einer 10-20-fach höheren Affinität als APRIL (Marsters 2000, Wu 2000).

Wie bereits erwähnt, ist die Rolle von APRIL im Immunsystem noch nicht vollständig verstanden, aber u.a. durch Untersuchungen transgener- und knockout-Mäusen, konnten einige Aufgaben von APRIL identifiziert bzw. ausgeschlossen werden (Bisher bekannte Funktionen von APRIL im Immunsystem vermittelt durch seine Rezeptoren siehe auch

Abb.5). Es deutet einiges darauf hin, dass APRIL die T-Zell-abhängige Immunantwort unterdrückt und den Ig-Isotypenwechsel fördert (Castigli 2004, Stein 2002, Balazs 2002). Es könnte sein, dass erhöhte Mengen an APRIL die BAFF/TACI-Interaktion verhindern, so dass mehr BAFF an BAFF-R bindet und die B-Zellzahl erhöht wird (Varfolomeev 2004). Durch Gabe von APRIL kann aber bei BAFF-knockout-Mäusen die B-Zellzahl nicht normalisiert werden und APRIL knockout Mäuse zeigen eine normale Immunantwort (Varfolomeev 2004, Gross 2001, Schiemann 2001). Plasmazellen exprimieren hauptsächlich BCMA und Proteoglykan und nur in sehr geringen Mengen BAFF-R und TACI. Ihrer Überlebensrate kann sowohl durch BAFF als auch durch APRIL verstärkt werden (O´Connor 2004, Avery 2003, Ingold 2005).

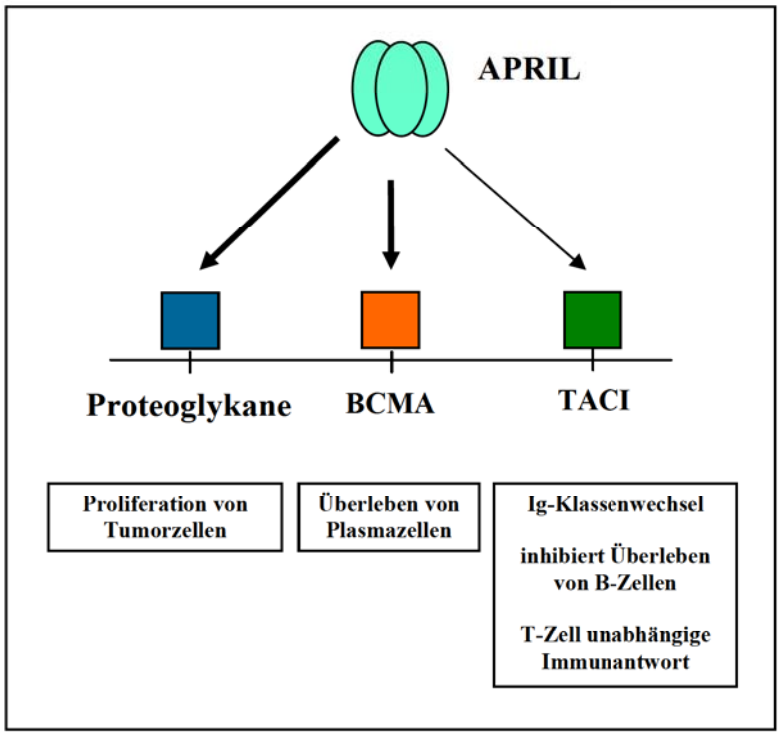

Abbildung 5: Interaktionen von APRIL mit seinen Rezeptoren und ihre Funktion im Immunsystem
In dieser Abbildung ist dargestellt an welche Rezeptoren APRIL bindet und wie stark seine Affinität zu dem jeweiligen Rezeptor ist (Pfeildicke). Des Weiteren sind die Funktionen aufgelistet, welche APRIL durch seine Bindung an den jeweiligen Rezeptor vermittelt.

1.4.4 BAFF-R (BAFF-Rezeptor)

Wie bereits erwähnt, ist BAFF der einzige bisher bekannte Ligand des BAFF-R, der sehr wichtig für das Überleben und die Reifung von B-Zellen ist. BAFF-R leitet aber auch Signale

für den Ig-Isotypenwechsel weiter (Yan 2000, Thompson 2001, Mackay 2003). Neben BAFF-R gibt es noch weitere Synonyme für diesen Rezeptor: BR3 (BLyS receptor 3), TNFRSF17 (TNF receptor superfamily member 17) (Thompson 2001, Yan 2001, Bossen 2006). BAFF-R wird (abgesehen von einer schwachen Expression auf T-Zellen) ausschließlich auf bestimmten B-Zellen-Reifungsstadien exprimiert (Yan 2001, Yan 2000). Es wird vermutet, dass seine Expression mit der Expression von IgM in der Zellmembran korreliert (Mackay 2003, Hsu 2002, Gorelik 2004). Bei BAFF-R-knockout-Mäusen kommt es zu einer Blockade in der B-Zell-Entwicklung (Shulga-Monskaya 2004, Thompson 2001).

2. Zielsetzung

Das kindliche Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom (OMS) ist ein seltenes neurologisches Syndrom, welches unter anderem paraneoplastisch auftritt. Die paraneoplastische OMS Form steht fast immer im Zusammenhang mit einem Neuroblastom. Ziel der vorliegenden Arbeit war eine genauere Untersuchung der Ursachen sowie des Verlaufes der Erkrankung.

Im Serum einiger Kinder mit OMS konnten verschiedene antineuronale Auto-Antikörper nachgewiesen werden, ein gemeinsames Auto-Antigen konnte bisher aber noch nicht identifiziert werden. Welche Substanz-Klasse (Polysaccharide, Proteine, Lipide) die einzelnen IgG-Subklassen hauptsächlich binden ist hingegen bekannt. Durch eine Analyse der Auto-Antikörper bezüglich der dominierenden IgG-Subklassen sollten in dieser Arbeit die Ziel-Antigene weiter eingegrenzt werden.
Dazu sollte die Bindung der Auto-Antikörper an Körnerzellen des Kleinhirns überprüft und die IgG-Subklassen Verteilung der intrazellulär und der extrazellulär bindenden Auto-Antikörper untersucht werden. Um auszuschließen, dass die IgG-Subklassen Verteilung aufgrund einer veränderten Konzentration der Subklassen im Gesamt-IgG zustande kommt, wurden auch die Subklassen des Gesamt-IgGs bestimmt.

In früheren Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass Auto-Antikörper von einigen OMS-Patienten an Neuroblastom-Zellen binden und somit einen Einfluss auf die NK-Zell vermittelte Lyse von Neuroblastom-Zellen haben könnten. Deshalb sollte der Effekt des IgGs von OMS-Patienten auf die NK-Zell vermittelte Lyse von Neuroblastom-Zellen untersucht werden.

Einige Daten deuten darauf hin, dass B-Zellen an der Erkrankung mit OMS beteiligt sind. BAFF und APRIL sind zwei Proteine, die an der Entwicklung und dem Überleben von B-Zellen in der Peripherie maßgeblich beteiligt sind. Eine pathogen erhöhte Konzentration dieser Proteine kann zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen beitragen. Deshalb sollte in dieser Arbeit die Konzentration von BAFF und APRIL im Serum und im Liquor von OMS-Patienten gemessen werden. Um eine Störung der Blut/Hirn-Schranke und damit eine Beeinflussung der Konzentrationen im Liquor auszuschließen, sollte die Albumin-

Konzentration in Serum und Liquor bestimmt werden. Am Ende dieses Versuchsteils sollte überprüft werden, ob die BAFF Liquor/Serum Ratio und die Antikörperbindungen an Körnerzellen des Kleinhirns in einem Zusammenhang stehen.

In einer Studie von 2003 wurden B-Zell-Follikel im Neuroblastom eines OMS-Patienten nachgewiesen, welche normalerweise nur in Lymphknoten vorkommen. Aufgrund dessen und in Anlehnung an die Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung von BAFF und APRIL im Serum und Liquor von OMS-Patienten sollte im letzten Teil dieser Arbeit überprüft werden, ob Neuroblastom-Zellen BAFF, APRIL oder BAFF-R exprimieren können. Weil Zytokine (besonders IFNγ) die Expression von BAFF und APRIL in verschiedenen Zellen beeinflussen, sollte dieser Effekt auch bei Neuroblastom-Zellen überprüft werden.

3. Material

3.1 Chemikalien und fertige Lösungen

Acetic Acid 100%	Merck
Agarose multiporpose	Bioline GmbH
Ammoniumpersulfat APS	Roth
Antioxidant	Invitrogen
5-bromo 4-chloro 3-indolyl phosphate / nitro-blue tetrazolium chloride (BCIP/NBT)-Blue Liquid Substrate	Sigma Aldrich
BDH crystalline Trypsin (bovine pancreas)	Sigma Aldrich
Bovine Serum Albumine, Fraction V (BSA)	Sigma Aldrich
Bromphenolblau	Neolab
β-Mercaptoethanol	Fluka
CelLytic™ M Cell Lysis Reagent	Sigma
Deoxiribunuclease 1, Type 4 bovine pancreas	Sigma Aldrich
Destilliertes Wasser „Aqua ad injectabilia“	Braun
D(+)Glucose	Gibco
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) 0,5M	Roth
Ethanol 100 %	Sigma Aldrich
Ethanol für Molekularbiologie 100%	Merck
Ethidiumbromid	Merck
Ficoll-PaqueTM Plus	Amersham
5-Fluoro-2´-deoxyuridine	Merck
Glycerol	Roth
Glycin	Merck
H-EBSS	Gibco
Hepes	Sigma
Interferon γ (IFN-γ)	Provitro
IgG-Standard	Sigma
Isopropanol	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck

4x LDS sample Buffer (für WB)	Invitrogen
Liquichek Immunology Control Levels 1 und 2	Bio Rad
Liquichek™ Spinal Fluid Control Levels 1 und 2	Bio Rad
Methanol	Merck
Magnesiumsufat ($MgSO_4$)	Sigma
Milchpulver	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	Merck
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck
Natriumdihydrogenphoaphat (NaH_2PO_4)	Merck
Natriumazid (NaN_3)	Merck
N Antiserum gegen Human-IgG	Dade Behring
N Antiserum gegen Human-Albumin	Dade Behring
N Diluens	Dade Behring
Non-fat dry milk, blotting grade (Milchpulver)	Bio-Rad
N Protein-Standard-SL (human)	Dade Behring
NuPage SDS MOPS Running Buffer	Invitrogen
N Reaktionspuffer	Dade Behring
PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Proteinmarker)	Fermentas
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma Aldrich
Phosphate Buffered Saline (PBS) 10x (für Zellkultur!)	Gibco
Poly-L-lysin-hydrobromide	Sigma
Ponceau S	Sigma / Roth
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma
Protein G-Sepharose	GE Healthcare Bio-Science AB
Quick Load 1kb DNA Ladder (DNA-Längenmarker)	Biolabs
RLT-buffer (Zelllyse-Puffer)	Qiagen
RNAse freies Wasser	Applichem
Rotiphorese Gel 30 = 30 % Acrylamid-Mix	Roth
Sample reducing Agent (10x)	Invitrogen
Saponin	Sigma
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Neolab
Tris-Acetat-EDTA Puffer (TAE) 10x	Roth
Trichloressigsäure (20%)	Roth
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Sigma
Tris-HCl	USB

Trypanblau	Roth
Trypsin (2,5g/l)	Gibco
5% Trypsin-EDTA (10x)	Gibco
Trypsin inhibitor Type I-S: from Soybean	Sigma Aldrich
Trypsin Type XII-S	Sigma Aldrich
Tween20	Merck

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Chemikalien und fertigen Lösungen

3.2 Verbrauchsmaterial

Cellstar® 6 Well Cell Culture Plate	Geiner bio-one
Cellstar® Plastikpipetten (5 ml, 10 ml)	Geiner bio-one
Cellstar® U-shape with Lid, TC-Plate, 96 well, sterile	Greiner Bio-one
Cellstar® 75 cm^2 Zellkulturflaschen	Greiner Bio-one
Cryobox 136x136x130 mm	Ratiolab GmbH
Cryo Tube™ vials (1,8 ml; 4,5 ml)	Nunc
Disposable scalpel, steril	Feather safity razorco
2D-well Gradientengel NuPage 4-12% (1,0 mm dick)	Invitrogen
Einmalküvette	Ratiolab
Einmalspritzen Injekt® Luer Solo (5 ml, 20 ml)	Braun
FACS-Röhrchen 0,5 ml 38x6,5 mm PS	Sarstedt
Falcon 5ml Polystyrene Round-Bottom Tube	Becton Dickinson
Falcon® Plastikpipetten 25 ml	Becton Dickinson Labware
Falconröhrchen (15 und 50 ml)	Becton Dickinson
Geldokumentation Thermal Image System FTI-500	Fuji Film
Gewebekulturschale steril 35,0 / 10 mm mit Nocken	Greiner bio-one
Glaswaren (verschiedene)	Fisherbrand; IDL; Schott&Gen; Simax
Kodan® Tinktur Forte (alkohholische Hautantiseptik)	Schülke & Mayr
LightCycler® Capillaries [20 µl] (für Realtime-PCR)	Roche
Minisart single use filter (0,2 µm, 0,45 µm)	Biotech
Neubauer improved	Brand
Nitra-Tex® puderfrei	Ansell

Nitrocellulosemembran	Biometra
NobaGlove® –Latex puderfrei	NOBA GmbH
Nunclon™ surface 96-Well Platten mit flachem Boden	Nunc™
Parafilm	American National Can
Pasteurpipetten aus Glas ca./approx. 150 mm	Brand
Pipettenspitzen (10µl, 100µl, 1000µl)	Sarstedt
PP-PCR-Gefäß 0,2ml dünnwandig	Greiner bio-one
Rastereinsatz für Cryobox	Ratiolab GmbH
Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt
Safety-Multifly®–Set, steril, pyrogenfrei (Kanülen)	Sarstedt
Servapor® dialysis tubing (6mm, 25mm)	Serva Electrophoresis GmbH
S-Monovette® 7,5 ml Z (Serum-Röhrchen)	Sarstedt
S-Monovette® EDTA KE 7,5 ml (Vollblut-Röhrchen)	Sarstedt
Stau-Schlauch	Nebilet®
Sterile Pipettenspitzen mit Filter	Nerbe Plus
UV-durchlässige Küvetten	Bio-Rad
Vlieskompressen steril 5x5 cm	Fuhrmann® Verbandstoffe GmbH
Whatmann-Filterpapier 3 mm	A. Hartenstein
Zellschaber	Geiner bio-one

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

3.3 Geräte

Air Liquide (Stickstoff-Tank)	Arpege 75
BEP 2000 Advance (ELISA-Reader)	Dade Behring
Blotapparatur	Invitrogen
„Blutrährchen-Roller“ RM5	Assistent
ClasII Type A/B3 (Sterilbank)	Nuaire Biological Safety Cabinets
Digitalkamera DFC 300 FX	Leica
Easia shaker	Medgenix diagnostics
FACSCalibur	Becoton Dickinson
Fluoreszenzmikroskop DM RB	Leitz

Geldokumentationsanlage Image Masters VDS	Pharmacia Biotech
Gelelektrophoresekammer	Peqlab
Gelschlitten und Gelkamm	Peqlab
Heizblock / Thermoshaker	Peqlab
HiTrapTM Protein G HP (1ml und 5ml Protein G Säule)	Amersham Biosciences
Inverses Lichtmikoskop MBL 3100	A.Krüss Optronic
Kühl- und Gefrierschränke	Bosch, Liebherr, Nuaire, Santo, Premium
Light Cycler 1.5	Roche Diagnostics
LightCycler Zentrifugen Adapter	Roche Diagnostics
Magnetrührer	IKA® Werke
Mikrowelle	SHARP Electronics
Multiskan Ex (ELISA-Reader)	Thermo Electron Corporation
Nalgene™ Cryo 1 °C Freezing Container	Nalgene®
NOVEX Xcell surelock Blotkammer	Invitrogen
PC-System, Printer	Hewlett Packard
pH-Meter	Schott Geräte
Pipetten (verschiedene Volumina)	Gilson, Eppendorf
Pipettierhilfe „Pipetboy acu“	Integra Biosciences
ProSpec (Nephelometer)	Dade Behring
Pump P-1 (Pumpe für die IgG-Aufreinigung)	Pharmacia Biotech
Rotamax 120 (Rüttler)	Heidolph
Schwenktisch	Peqlab
SmartSpec™ Plus Spectrophotometer	Bio-Rad
Sonopuls HD 2070 (Ultraschallhomogenisator)	Bandelin Elektronik
Spannungsquellen	Peqlab
Steri-Cult 200 Inkubator (Brutschrank)	Labotec GmbH
Sterilbank	Köttermann
Thermocycler	Biometra
Tischzentrifuge EBA 20	Hettich
Tischzentrifuge Mikro 120	Hettich
Universal 32 R (Zentrifuge)	Hettich
Vortex Minishaker	IKA® Werke
Vortexer Vortex-Genie2	Scientific Industries
Waage	Sartorius AG
Wasserbad	Memmert

Zentrifuge Typ 2-6	Sigma
Zentrifuge Universal 32 R (Zellkultur)	Hettich

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Geräte

3.4 Molekularbiologische und biochemische Kits

Bicinchoninsäure (BCA) Protein Assay Kit	Thermo Scientific
BNII™ Latex Combi kit: Non-latex IgG1 and IgG2 Latex IgG3 and IgG4	Dade Behring
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche Applied Science
human APRIL ELISA BMS2008	Bender MedSystems®
IIFT: Neurologie-Mosaik 13 Kit	EuroImmun
QIAamp® RNA Blood Mini Kit	Qiagen
Quanti Fast™ SYBR Green PCR Kit	Qiagen
Quantikine® Human BAFF/BLyS	R&D Systems
Ravo PNS-Blot	Ravo Diagnostika GmbH
RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas
RosetteSep® human NK Cell Enrichment Cocktail	StemCell Technologies

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten molekularbiologischen und biochemischen Kits

3.5 Puffer und Lösungen

$BSA_{4\%}$	5 ml	H-EBSS
	0,2 g	BSA
	40 µl	$MgSO_4$-Lösung
DNA-loading buffer (10x):	250 mg	Bromphenolblau
	33 ml	Tris (150 mM, pH 7,6)
	60 ml	Glycerol
	7 ml	H_2O
		pH 7,6

Ethidiumbromid-Färbelösung	2,5 mg	Ethidiumbromid
	1 L	1x TAE
FACS Puffer	500 ml	1x PBS
	5 ml	10 % NaN_3
	5 ml	Fötales Kälberserum (FCS)
Glucose-Lösung (1,33 M)	10 ml	dH_2O
	2,394 g	Glucose
Glycinpuffer	3,75 g	Glycin
	In 500 ml	dH_2O lösen
		auf pH 9 bzw. 2,7 einstellen
H-EBSS	2,02 g	NaCl
	0,1 g	KCl
	1,49 g	Hepes (pH 7,4)
	0,0875 g	$NaHCO_3$
	0,039 g	NaH_2PO_4 x 2 H_2O
	(oder 0,037 g	NaH_2PO_4 x 1 H_2O)
	in 250 ml	dH_2O lösen
		auf pH 7,4 einstellen
IgG-Elutionspuffer	0,75 g	Glycin
	100 ml	dH2O
		pH 2,7 einstellen
		(= 0,1 M)
Konzentrierte DNaseI / Trypsin Inhibitor – Lösung (Konz. D/T-I Lsg)	10 ml	Solution 1H
	0,1 ml	$MgSO_4$-Lösung
	0,54 mg	DNase (1.300 kunits / 10 ml)
	8 mg	Trypsin Inhibitor
$MgSO_4$-Lösung	7,81 g	$MgSO_4$ x 7 H_2O
	in 100 ml	dH_2O lösen
Milchpulver-Lösung	0,4 g	Milchpulver
	10 ml	PBS_{Tween}
1 % Paraformaldehyd (PFA)	1 g	PFA
	100 ml	1x PBS
		unter Erhitzen lösen
PBS (10x)	85 g	NaCl
	14,2 g	Na_2 H PO_4
	2,9 g	Na H_2 PO_4
	in 1 l	dH_2O lösen

1x PBS	900 ml	dH_2O
	100 ml	PBS (10x)
$PBS_{2\%FCS}$	49 ml	1x PBS
	1 ml	FCS
PBS_{Tween}	1 L	1x PBS
	500 µl	Tween 20
Permeabilisierungspuffer	500 ml	FACS Puffer
	0,5 g	Saponin
Poly-L-Lysin	60 ml	dH_2O
	3 mg	Poly-L-Lysin
Ponceau S-Färbelösung	0,25 g	Ponceau S
	15 ml	Trichloracetat (TCA)
	auf 100 ml	mit H_2O auffüllen
		Lichtgeschützt lagern
Protein (SDS)-loading-Buffer 4x	25 ml	1M tris pH 6,8
	4 g	SDS
	40 ml	Glycerin
	0,8 ml	0,5 EDTA (pH zw. 7,5 und 8,5)
	20 ml	Methanol
	2 Spatelspitzen	Bromphenolblau
	auf 100 ml	mit dH_2O auffüllen
		zum Gebrauch bei 4 °C
		Lagerung bei -20 °C
Sammelgel-Puffer	9,09 g	Tris-HCl
	in 50 ml	dH_2O lösen
		auf pH 6,8 einstellen
SDS (10%)	100 g	SDS
	in 900 ml	dH_2O lösen
		erhitzen (68°C)
		pH=7,2 einstellen
	auf 1 L	mit dH_2O auffüllen
SDS-Laufpuffer (10x)	10 g	SDS
	30,3 g	Tris
	144,1 g	Glycin
	in 1 L	H_2O lösen

Solution 1H	50 ml	H-EBSS
	0,125 g	Glucose
	0,15 g	BSA
	0,5 ml	$MgSO_4$-Lösung
TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer (50x)	242 g	Tris
	57,1 ml	Acetic Acid
	100 ml	0,5M EDTA
	Auf 1 L	mit dH_2O auffüllen
		pH 8,5 einstellen
TBS-Puffer	4,5 g	NaCl
	0,71 g	Na_2HPO_4
	0,15 g	NaH_2PO_4
	5,5 g	Milchpulver
	2,5 ml	Tween 20
	500 ml	dH_2O
Transfer-Puffer	1,513 g	Tris (25 mM)
	5,63 g	Glycin (150 mM)
	50 ml	Methanol (10 %)
		pH 8,3 eistellen
Trenngel-Puffer	18,17 g	Tris-HCl
	in 100 ml	dH_2O lösen
		auf pH 8,8 einstellen
Trypsin-Lösung	10 ml	Solution 1H
	2,5 mg	Trypsin
verdünnte DNaseI / Trypsin Inhibitor – Lösung	10 ml	Solution 1H
	1,6 ml	Konz. D/T-I Lsg

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen

3.6 Medien und Lösungen zur Kultivierung von Zellen

Granularis-Neurone	$DMEM_{10\%FCS}$	87,4 ml	Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco
		10 ml	Fötales Kälberserum (FCS)	Hyclone
		1 ml	Glutamin (200 mM)	Gibco
		0,1 ml	Pen Strep (Penicillin/	Gibco

			Streptomycin)	
		2,5 ml	Glucose-Lösung$_{(1,33\ M)}$	
		1 ml	KCl (2 M, in DMEM)	
NK-92 Zelllinie	α-MEM$_{25\%Serum}$	360 ml	α-MEM-Medium	Gibco
		62,5 ml	FCS	Hyclone
		62,5 ml	Horse Serum	BioWest
		5 ml	Glutamin (2 mM)	Gibco
		0,1 ml	IL-2 (50 µg/ml)	Provitro
		2,5 ml	Pen Strep	Gibco
	α-MEM$_{1\ \%Serum}$	44 ml	α-MEM-Medium	Gibco
		0,25 ml	FCS	Hyclone
		0,25 ml	Horse Serum	BioWest
		0,5 ml	Glutamin	Gibco
		10 µl	IL-2 (50 µg/ml)	Provitro
		0,25 ml	Pen Strep	Gibco
Adhärente Zelllinien	RPMI$_{10\%FCS}$	500 ml	RPMI-1640	Gibco
		50 ml	FCS	Hyclone
		2,5 ml	Pen Strep	Gibco
	DMSO$_{10\%}$	10 ml	DMSO	Roth
		90 ml	FCS	Hyclone

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Medien und Lösungen zur Kultivierung von Zellen

3.7 Zelllinien

Name der Zelllinie	Ursprung	Herkunft
ACN	Neuroblastom	Pädiatrische Onkologie Genua, Prof. Pistoia
CHP212	Neuroblastom	Pädiatrische Onkologie Genua, Prof. Pistoia
GIMEN	Neuroblastom	Pädiatrische Onkologie Genua, Prof. Pistoia
HEK 293	Fibroblasten	sehr lang in der AG Blaes vorhanden
H460	Bronchialkarzinom	Hämatologie und Onkologie Marburg, PD Jacques
IMR 32	Neuroblastom	Pädiatrische Onkologie Köln, Prof. Berthold
IMR 5-75	Neuroblastom	Pädiatrische Onkologie Köln, Prof. Berthold

Kelly	Neuroblastom	Pädiatrische Onkologie Genua, Prof. Pistoia
LAN5	Neuroblastom	Pädiatrische Onkologie Genua, Prof. Pistoia
NK-92	Natürliche Killerzellen	Biochemie Giessen, Prof. Preissner
NMB	Neuroblastom	Pädiatrische Onkologie Köln, Prof. Berthold
SKN-AS	Neuroblastom	Pädiatrische Onkologie Köln, Prof. Berthold
SKN-BE	Neuroblastom	Pädiatrische Onkologie Köln, Prof. Berthold
SKN-SH	Neuroblastom	sehr lang in der AG Blaes vorhanden
SKN-SY5Y	Neuroblastom	sehr lang in der AG Blaes vorhanden

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Zelllinien

Prof. Dr. Vito Pistoia
Laboratory of Oncology
Gaslini Childrens Hospital
Genua University
Genua, Italien

Prof. Dr. F. Berthold & Dr. B. Hero
Leitung der Deutschen Neuroblastom-Studiengruppe
Zentrum für Kinderonkologie und -hämatologie
Universität zu Köln
Joseph-Stelzmann-Straße 9
50924 Köln

PD Dr. G. Jacques
Hämatologie und Onkologie
Universität Marburg

Prof. Dr. K.T. Preissner
Biochemie
Universität Giessen

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien handelt es sich ausschließlich um menschliche Zellen.

3.8 Antikörper

AK-Name	gegen	gewonnen in	Markiert	Firma
CD 11b	human	mouse	PerCP-Cy5	BD
CD 16	human	mouse	PerCP-Cy5	BD
CD 19	human	mouse	PerCP-Cy5	BD

CD 56 (N-CAM)	human	mouse	-	Dako
CD 256 (APRIL)	human	mouse	PE	Biozol (BioLegend)
CD 256 (APRIL)	human	rabbit	-	Serotec
CD 268 (BAFF-R)	human	mouse	FITC	BD
CD 257 (BAFF)	human	mouse	FITC	R&D Systems
CD 257 (BAFF)	human	rabbit	-	Serotec
GAPDH	human	mouse	-	Chemicon
HLA-ABC (MHC I)	human	mouse	-	Dako
IgG	human	rabbit	AP	Dako
IgG	mouse	rabbit	AP	Dako
IgG	rabbit	swine	AP	Sigma
IgG	human	rabbit	FITC	Dako
IgG	mouse	rabbit	FITC	Dako
IgG	mouse	rabbit	RPE	Dako
IgG 1	human	mouse	FITC	Sigma
IgG 2	human	mouse	FITC	Sigma
IgG 3	human	mouse	FITC	Sigma
IgG 4	human	mouse	FITC	Sigma
IgG1-Isotyp-Kontrolle		mouse	FITC	BD
IgG1-Isotyp-Kontrolle	mouse		PE	R&D Systems
IgG1-Isotyp-Kontrolle		mouse	FITC	R&D Systems
IgG2bκ -Isotyp-Kontrolle	mouse		PerCP-Cy5	BD
Isotyp-Kontrolle		mouse	FITC	R&D Systems
Isotyp-Kontrolle		mouse	-	Dako
Neurofilament	human	mouse	-	Dako
ch14.18	human			Merck

Tabelle 8: verwendete Antikörper

AP = Alkalische Phosphatase; FITC = Fluoroisothiozyanat; PE / RPE = Phytoerytrin; PerCP-Cy5 = Peridinin-Chlorophyll-Protein-Cyanine 5

3.9 Primer

3.9.1 Oligonukleotide zur Durchführung von Realtime-PCRs

Bezeichnung	Nukleotidsequenz
PBGD 8F (fwd)	5´-TGCAACGGCGGAAGAAAAC-3´
PBGD 3.1 R (rev)	5´-GGCTCCGATGGTGAAGCC-3´
BAFF (fwd)	5´-CTCCCACGGAAGGAAAGCC-3´
BAFF (rev)	5´-TCTGGACCCTGAACGGCAC-3´

Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide zur Durchführung von Realtime-PCRs
(fwd): Oligonukleotide amplifizieren den Genanfang
(rev): Oligonukleotid amplifizieren das Genende

3.10 Software

BEP® 2000 SW V.1.23.4 (ELISA-Reader)

CellQuest® von BD (FACSCalibur)

Excel 2002 Microsoft

Graph Pad Prism Software Version 4.02 (Statistische Auswertungen + Grafiken)

Microsoft Office PowerPoint 2003

Microsoft Office Word 2003

QC-Net (Unity Real Time) von Bio Rad (Auswertung Nephelometer)

Roche Molecular Biochemicals Light Cycler Software Version 3.5 (LightCycler)

Windows 2002 Microsoft

WinMDI 2.9 (Auswertung durchflußzytometrischer Daten)

4. Patienten und Methoden

4.1 Patienten

4.1.1 Patientenmaterial – Gewinnung und Lagerung

In dieser Arbeit wurde mit Patienten-Seren, -Plasmapherat und Liquor, sowie mit Vollblut gearbeitet. Einverständniserklärungen der Patienten bzw. deren Erziehungsberechtigter lagen vor, sodass das Patientenmaterial für die Versuche der vorliegenden Arbeit verwendet werden konnte. Für das Projekt lag auch ein positives Votum der Ethikkommission des FB Medizin vor.

Für die Serum-Gewinnung wurde den Patienten durch Venenpunktion Blut in Serum-Röhrchen entnommen. Anschließend wurde das Blut 10 Min. bei 4.000 rpm zentrifugiert, wobei sich feste Blutbestandteile absetzten. Das Serum wurde hauptsächlich zur Routine-Diagnostik entnommen. Nach der Routine-Diagnostik wurde der Rest des Serums portioniert, beschriftet und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

Das Plasmapherat wurde den Patienten zu therapeutischen Zwecken im Krankenhaus entnommen, portioniert, beschriftet und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert. Vor dem Gebrauch wurde das Plasma 10 Min. bei 4.000 rpm zentrifugiert.

Der Liquor wurde den Patienten für diagnostische Untersuchungen im Krankenhaus durch eine Lumbal-Punktion entnommen. Der restliche Liquor wurde nach der Routine-Diagnostik portioniert, beschriftet und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

Das Vollblut wurde ausschließlich für diese Arbeit entnommen. Es wurde einem gesunden Spender mittels Venenpunktion in EDTA-Vollblut-Röhrchen entnommen und sofort weiterverarbeitet.

Das Patientenmaterial stammte nicht ausschließlich aus dem Universitäts-Klinikum Giessen, sondern wurde auch von anderen Kliniken aus ganz Deutschland zur Verfügung gestellt. Dafür wurde es nach Zentrifugation bei Raumtemperatur (RT) verschickt. Das Material wurde nach der Ankunft bei 4 °C gelagert, bis es portioniert und zu -20 °C überführt wurde.

4.1.2 Patientengruppen

In dieser Arbeit wurden vier verschiedene Patientengruppen verwendet: Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom (OMS)-Patienten, Neuroblastom (NB)-Patienten, Patienten mit entzündlicher, neurologischer Erkrankung (ENE) und gesunde Kontroll-Patienten (GK). Die drei letztgenannten Gruppen dienten als Kontrolle zu den OMS-Patienten. Die Patienten der Kontroll-Gruppen wurden so ausgewählt, dass sie in Alter, Geschlecht und Tumorstadium den OMS-Patienten entsprachen.

4.1.2.1 Bestimmung der IgG-Subklassen-Verteilung

Für diese Studie wurden Seren von 16 Kindern mit OMS (13 weiblich, 3 männlich; 12 mit NB, 4 ohne NB) verwendet. Ihr durchschnittliches Alter betrug 30,7 ± 17,1 Monate. Die 15 Kinder mit NB aber ohne OMS (10 weiblich, 5 männlich), deren Seren als Kontrolle verwendet wurden, waren bei der Blutentnahme durchschnittlich 26,2 ± 10,5 Monate alt. Als gesunde Kontrolle wurden Seren von 12 Kindern (8 weiblich, 4 männlich) verwendet, welche zu diagnostischen Zwecken entnommen wurden, die nicht unter einer Autoimmun- oder Tumorerkrankungen litten. Die „gesunden“ Kinder waren durchschnittlich 34 ± 12,6 Monate alt. In Tab.10 sind die genauen Daten der einzelnen OMS-Patienten aufgeführt.

Patient	Alter [Monate] / Geschlecht	Serum-Entnahme	Diagnose	Tumorstadium
1	51 / w	vor Behandlung	OMS-NB	II
2	30 / w	vor Behandlung	OMS-NB	IV
3	16 / w	vor Behandlung	OMS-NB	II
4	15 / w	vor Behandlung	OMS-NB	I
5	35 / m	8 m[a]	OMS-NB	II
6	49 / w	13 m[a]	OMS-NB	III
7	16 / w	vor Behandlung	OMS-NB	I
8	18 / w	vor Behandlung	OMS-NB	I
9	12 / w	vor Behandlung	OMS-NB	IV
10	24 / w	vor Behandlung	OMS-NB	III
11	18 / w	vor Behandlung	OMS-NB	III
12	18 / w	vor Behandlung	OMS-NB	II
13	30 / w	vor Behandlung	OMS	kein Tumor
14	40 / w	vor Behandlung	OMS	kein Tumor
15	48 / m	7 m[b]	OMS	kein Tumor
16	72 / m	vor Behandlung	OMS	kein Tumor

Tabelle 10: Patientendaten der OMS-Patienten

OMS = Opsoklonus–Myoklonus Syndrom; OMS-NB = OMS mit Neuroblastom

[a] Monate nach Beginn der Behandlung, keine Behandlung zur Zeit der Blutentnahme

[b] Monate nach Beginn der Behandlung, Dexamethason-Puls-Therapie zur Zeit der Blutentnahme

4.1.2.2 Untersuchung der IgG-Effekte auf die NK-Zell vermittelte Lyse von NB-Zellen

Bei diesen Experimenten wurden aus dem Serum von 11 OMS-Patienten und sieben gesunden Kontroll-Patienten alle Immunglobuline der Klasse G (IgG) isoliert. Die OMS-Patienten waren bei der Blutentnahme durchschnittlich 25,45 ± 8,43 Monate alt, sechs waren weiblich und fünf männlich. In der Kontroll-Gruppe waren drei weiblich und vier männlich und bei der Blutentnahme lag das durchschnittliche Alter bei 35,57 ± 14,98 Monaten. In Tab.11 sind die genauen Daten der einzelnen OMS-Patienten aufgeführt.

Patient	Alter [Monate] / Geschlecht	Serum-Entnahme	Diagnose	Tumorstadium
1	24 / w	vor Behandlung	OMS-NB	III
2	18 / w	vor Behandlung	OMS-NB	I
3	18 / w	vor Behandlung	OMS-NB	III
4	23 / m	vor Behandlung	OMS-NB	I
5	28 / m	vor Behandlung	OMS-NB	II
6	24 / w	vor Behandlung	OMS	kein Tumor
7	23 / w	vor Behandlung	OMS	kein Tumor
8	12 / m	vor Behandlung	OMS	kein Tumor
9	36 / m	vor Behandlung	OMS	kein Tumor
10	34 / m	vor Behandlung	OMS	kein Tumor
11	40 / w	vor Behandlung	OMS	kein Tumor

Tabelle 11: Patientendaten der OMS-Patienten

OMS = Opsoklonus–Myoklonus Syndrom; OMS-NB = OMS mit Neuroblastom

[a] Monate nach Beginn der Behandlung, keine Behandlung zur Zeit der Blutentnahme

[b] Monate nach Beginn der Behandlung, Dexamethason-Puls-Therapie zur Zeit der Blutentnahme

5.1.2.3 Bestimmung der BAFF- und APRIL-Konzentration

Um die BAFF- und APRIL-Konzentration zwischen OMS-Patienten und Kontroll-Patienten zu vergleichen, wurde das Serum von 17 OMS-Patienten verwendet. Davon waren 11 weiblich, sechs männlich und das durchschnittliche Alter dieser Patienten-Gruppe betrug 29,2 ± 17,6 Monate. Bei acht der 17 Patienten wurde ein Neuroblastom festgestellt, bei neun Patienten wurde keines gefunden. Als Kontrollen wurden Seren von 16 Patienten mit Neuroblastom, aber ohne OMS, von 13 gesunden Kontroll-Patienten und 12 Patienten mit entzündlichen, neurologischen Erkrankungen verwendet. Die NB-Patienten waren durchschnittlich 33,5 ± 17,6 Monate alt, 12 waren weiblich und vier männlich. Die NB-Patienten, wie auch die paraneoplastischen OMS-Patienten dieser Studie befanden sich in unterschiedlichen Tumorstadien (Tab.12): sieben NB-Patienten waren im Stadium I, vier in Stadium II, vier im Stadium III und ein Patient war im Stadium IV. Die gesunden Kontroll-Patienten waren durchschnittlich 37,8 ± 19,4 Monate alt, neun waren weiblich und vier

männlich. Keiner dieser Patienten zeigt Anzeichen einer entzündlichen, neurologischen Erkrankung, weder klinisch noch durch Laborwerte. Die Patienten mit einer entzündlichen, neurologischen Erkrankung waren durchschnittlich in einem Alter von 70,0 ± 33,6 Monaten, fünf von ihnen waren weiblich und sechs männlich.

Auch der Liquor der Patienten wurde soweit vorhanden untersucht. Bei Patienten mit NB lag kein Liquor vor, weil bei dieser Erkrankung keine Lumbalpunktionen zur Routinediagnostik durchgeführt werden. Bei neun der 17 OMS-Patienten (alle Patienten mit * in Tab.12), sowie von allen gesunden Kontroll-Patienten und allen Patienten mit einer entzündlichen, neurologischen Erkrankung war Liquor vorhanden.

Patient	Alter [Monate] / Geschlecht	Serum-Entnahme	Diagnose	Tumorstadium
1*	30 / m	30 m[a]	OMS-NB	II
2*	30 / w	vor Behandlung	OMS-NB	III
3*	13 / w	vor Behandlung	OMS-NB	II b
4*	18 / w	vor Behandlung	OMS-NB	I
5*	24 / w	vor Behandlung	OMS-NB	II
6*	16 / w	vor Behandlung	OMS-NB	II
7	38 / w	vor Behandlung	OMS-NB	I
8	29 / w	vor Behandlung	OMS-NB	III
9	68 / w	vor Behandlung	OMS-NB	II
10	66 / w	vor Behandlung	OMS	kein Tumor
11	17 / m	vor Behandlung	OMS	kein Tumor
12	52 / m	vor Behandlung	OMS	kein Tumor
13*	7 / w	vor Behandlung	OMS	kein Tumor
14*	24 / w	vor Behandlung	OMS	kein Tumor
15*	15 / m	vor Behandlung	OMS	kein Tumor
16	26 / m	vor Behandlung	OMS	kein Tumor
17	24 / m	vor Behandlung	OMS	kein Tumor

Tabelle 12: Patientendaten der OMS-Patienten

OMS = Opsoklonus–Myoklonus Syndrom; OMS-NB = OMS mit Neuroblastom

[a] Monate nach Beginn der Behandlung, keine Behandlung zur Zeit der Blutentnahme

[b] Monate nach Beginn der Behandlung, Dexamethason-Puls-Therapie zur Zeit der Blutentnahme

* Liquor wurde mit untersucht

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 RNA-Isolation

Eine Bestimmung der RNA-Menge eines bestimmten Genes ist anhand einer realtime-PCR möglich. Dafür wird die Gesamt-RNA extrahiert, in DNA revers transkribiert und danach mit entsprechenden Primern in die realtime-PCR eingesetzt. Zur effizienten RNA-Isolation unter Verwendung des QIAamp™ RNA Blood Mini Kits wurden bis zu 10^7 Zellen verwendet.

4.2.1.1 RNA-Isolierung mit dem QIAamp™ RNA Blood Mini Kit

Nach Ernte mit Trypsin wurden die Zellen 4 Min. bei 1.200 rpm zentrifugiert, mit 1x PBS gewaschen, mit einem die Zellen lysierendem Puffer (RLT-Lysis-buffer) aufgeschlossen (4.3.2.3) und die RNA vom Rest des Zell-Lysates getrennt und gereinigt.
Mit dem QIAamp™ RNA Blood Mini Kit (Qiagen) wurden die Zellen unter stark denaturierenden Bedingungen effizient lysiert, wobei RNasen umgehend inaktiviert wurden. Dies ermöglichte eine Isolation intakter RNA. Die Isolation wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die RNA wurde in 30 µl RNase-freiem H_2O eluiert und bei -80°C aufbewahrt.

4.2.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Konzentration wässriger Nukleinsäurelösungen wurde mit dem Smart Spec™ Plus Spectrophotometer deren Absorptionsvermögen bei 260 / 280 nm photometrisch bestimmt. Für die Messung wurde die Gesamt-RNA-Lösung 1:10 verdünnt.

4.2.3 Reverse Transkription

Zur Amplifikation der cDNA von einer RNA-Matrize wurde das RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit verwendet.

2 µg	Gesamt-RNA
auf 11 µl	mit DEPC-behandeltem H_2O (im Kit enthalten) aufgefüllt
1 µl	oligo $(dT)_{18}$ Primer (0,5 ng/µl)
Σ 12 µl	

Die RNA wurde 5 Min. bei 70 °C denaturiert und auf Eis schockgekühlt bevor folgende Reagenzien in der angegebenen Reihenfolge dazugegeben wurden:

4,0 µl	5x Reaktionspuffer
0,5 µl	RiboLock™ Ribonuklease Inhibitor
2,0 µl	dNTPs (10 mM)
Σ 18,5 µl	

Dieser Reaktionsansatz wurde vorsichtig vermischt und 5 Min. bei 37 °C inkubiert. Danach wurde 1µl RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (200 U/µl) dazugegeben (Endvolumen = 19,5 µl). Es folgte eine Inkubation für 1 Std. bei 42 °C. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 70 °C für 10 Min. gestoppt. Die cDNA wurde bei 4°C gelagert.

4.2.4 Real Time-PCR

Nach der reversen Transkription wurde die cDNA, sowie spezifische Primer in die Real Time-PCR mit dem Quanti Fast™ SYBR Green PCR Kit (Qiagen) eingesetzt. Der fluoreszierende Farbstoff *SYBR Green* I lagert sich unspezifisch in die kleine Furche doppelsträngiger DNA. Dadurch kommt es mit fortschreitender PCR-Reaktion zu einem Fluoreszenzanstieg. Die Fluoreszenz wird vom Light Cycler 1.5 im geschlossenen Reaktionsgefäß Zyklus für Zyklus erfasst und mit einem angeschlossenen Computer und der Roche Molecular Biochemicals Light Cycler Software Version 3.5 ausgewertet.
Weil das Fluorophor nicht spezifisch an die Ziel-DNA bindet, ist keine Unterscheidung zwischen korrektem Produkt und Artefakt oder Primer-Dimeren möglich, welche während der PCR-Reaktion ebenfalls einen Fluoreszenzanstieg verursachen können. Eine Differenzierung zwischen spezifischem Produkt und Primer-Dimeren war im Anschluss an den PCR-Lauf durch eine Schmelzkurven-Analyse möglich. Für das Erstellen der Schmelzkurven der einzelnen Proben wurde die Temperatur schrittweise erhöht, wodurch es zur Auftrennung der DNA-Doppelstränge in ihre Einzelstränge an ihren jeweiligen Schmelzpunkten kam. Die daraus resultierende Fluoreszenz-Abnahme wurde aufgezeichnet. Anhand der ermittelten Schmelztemperatur konnte zwischen spezifischen Produkten und Primer-Dimeren unterschieden werden, weil Primer-Dimere bei geringeren Temperaturen schmelzen als die spezifischen, größeren PCR-Produkte.

Ansatz der PCR pro Reaktionsgefäß:

10 µl	Mastermix (fertig im Kit)
1 µl	Vorwärtsprimer (20 pmol/µl)
1 µl	Rückwärtsprimer (20 pmol/µl)
1 µl	cDNA
7 µl	H_2O
Σ 20 µl	

Als Reaktionsgefäße wurden für den Light Cycler 1.5 geeignete Glaskapillaren verwendet. Bevor die Kapillaren in den Light Cycler 1.5 eingesetzt wurden, wurden sie 10 Sekunden bei

1.000 rpm zentrifugiert und mit einem Deckel verschlossen. Zur Aktivierung der Polymerase wurde eine "Hot-Start"-PCR durchgeführt.

PCR-Bedingungen:

Aktivierung der Polymerase	95°C	10 Min.	
Denaturierung	95°C	10 s	45 Zyklen
Anlagerung	60°C	10 s	
Amplifikation	72°C	16 s	

Im Anschluss an die Real Time-PCR wurde mit den Proben eine Gelelektrophorese durchgeführt. Diese diente, wie die Schmelzkurvenbesimmung der Überprüfung der Spezifität der PCR-Produkte. Die Real Time-PCR-Verlaufskurven gaben Aufschluss über die Effizienz der PCR für die einzelnen Proben. Die CT-Werte wurden mit der Roche Molecular Biochemicals Light Cycler Software Version 3.5 berechnet. Die CT-Werte spiegeln die relative Menge der cDNA des amplifizierten Gens wieder. Je niedriger der CT-Wert, desto mehr cDNA ist in der Probe vorhanden.

4.2.5 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren können auf Grund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen im elektrischen Feld entsprechend ihrer Molekülgröße aufgetrennt werden. Durch die Siebstruktur der Agarose wandern dabei größere DNA-Fragmente langsamer als kleinere.
Eine effiziente Auftrennung der Fragmente wurde durch eine Agarosekonzentration von 1 % erreicht. Um die DNA-Fragmente sichtbar zu machen, wurden die Gele im Anschluss in einer Ethidiumbromidlösung geschwenkt. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und kann dann unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

4.2.5.1 Analytische Agarosegele

Analytische Agarosegele wurden zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten und zur Qualitäts-Kontrolle der PCR (4.2.4) verwendet.
0,9 g Agarose wurden durch Erhitzen in einer Mikrowelle in 90 ml frischem 1 x TAE-Puffer gelöst (-> 1 %ige Agarosegele) und in eine Gel-Gießvorrichtung mit einem Kamm gegossen. Nach dem Aushärten des Gels wurde es mit Laufpuffer (1x TAE) bedeckt und die DNA-Proben aufgetragen. Die Proben wurden vorher mit 1/5 bis 1/10 Volumen (je nach Angabe des Herstellers) Probenpuffer versetzt. Zusätzlich wurde noch ein DNA-Längenmarker (Quick-Load 1kb DNA Ladder) aufgetragen, um später die DNA-Länge der einzelnen Proben bestimmen zu können. Zum Einlaufen der Proben in das Gel wurde eine Spannungsstärke von 130 Volt (V) eingestellt (ca. 10 Min.), welche danach auf 150 V erhöht wurde.
Nach der Auftrennung der Fragmente im Gel wurde diese 10-15 Min. mit einer wässrigen Ethidiumbromidlösung angefärbt, 10 Min. in 1x TAE ungebundenes Ethidiumbromid weggewaschen und unter UV-Licht (365 nm) die Ethidiumbromid-markierte DNA sichtbar gemacht. Schließlich wurde zur weiteren Auswertung ein Bild des Gels mit dem Gel-Dokumentations-System ausgedruckt.

4.2.6 IgG- und Protein-Konzentrationsbestimmung

4.2.6.1 nephelometrische Konzentrationsbestimmung

Die Nephelometrie wurde zur Bestimmung der Konzentrationen von aufgereinigten IgG-Proben (4.4.4), zur Konzentrationsbestimmung der einzelnen Gesamt-IgG-Subklassen, zur Bestimmung des Gesamt-Eiweiß-Gehaltes von Proteinlösungen für eine spätere Western Blot Analyse (4.4.1 – 4.4.3) und zur Bestimmung des Liquor/Serum-Albuminquotienten zur Überprüfung der Blut-Liquor-Schrankenfunktion verwendet.
Die Nephelometrie beruht auf dem gleichen Prinzip, wie die Fluoreszenzphotometrie. An Antigen-Antikörper-Komplexen, wird eingestrahltes Licht gestreut. Die Intensität des

Streulichtes, welche mit dem Nephelometer gemessen wird, ist abhängig von der Konzentration des jeweiligen Proteins in der Probe. Um die genaue Konzentration einzelner Proben bestimmen zu können, wird zusammen mit diesen eine Verdünnungsreihe des Standards (N Protein-Standard-SL (human), Dade Behring) gemessen. Anhand der Standardkurve des Standards kann die Konzentration des Proteins in den Proben ermittelt werden.

Zur Bestimmung des IgG-Gehaltes wurde zu den Proben im Verhältnis 1:2 Antiserum (N Antiserum gegen Human-IgG, Dade Behring) gegeben und eine Kontrolle (Liquichek Immunology Control Levels 1 und 2, Bio Rad) mitgeführt. Zur Bestimmung des Gesamt-Eiweiß-Gehaltes wurden die Proben mit 20 %iger Trichlor-Essigsäure versetzt, als Kontrolle diente „Liquichek™ Spinal Fluid Control Levels 1 und 2“ (Bio Rad). Bei der Bestimmung des Liquor/Serum-Albuminquotienten wurden die Proben mit einem Antiserum gegen Albumin (N Antiserum gegen Human-Albumin, Dade Behring) versetzt und ebenfalls eine Kontrolle mitgeführt (Liquichek Immunology Control Levels 1 und 2, Bio Rad) verwendet. Zur Konzentrationsbestimmung der Gesamt-IgG-Subklassen wurde ein Kit der Firma Dade Behring verwendet (BNII™ Latex Combi it: Non-latex IgG1 and IgG2; Latex IgG3 and IgG4).

Bei der Durchführung wurde das Protokoll des jeweiligen Herstellers und zur Auswertung der gemessenen Werte wurde die Software „QC-Net (Unity Real Time)“ (Bio Rad) verwendet.

4.2.6.2 photometrische Konzentrationsbestimmung mittels BCA-Kit

Die Konzentrationsbestimmung nach der BCA-Methode beruht auf einer Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{+} durch Proteine in alkalischem Medium mit Hilfe von Bicinchoninsäure. Bei dieser Reaktion entsteht ein lila Produkt (Kupferkationen). Die Farbintensität kann photometrisch bei 600 nm gemessen werden. Die Intensität der Farbe korreliert mit der IgG-Konzentration, wodurch diese anhand einer Standard-Verdünnungsreihe errechnet werden kann.

Zuerst wurde mit 1x PBS eine Verdünnungsreihe mit einem IgG-Standard (2 µg/µl) hergestellt. Hierzu wurden 11 Verdünnungen zwischen 1 µg/µl und 50 ng/µl gewählt. Von jeder Probe, der Verdünnungsreihe und der Leerkontrolle (nur 1x PBS) wurde jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die zu bestimmenden IgG-Proben wurden 1:2 verdünnt und zusammen mit der Verdünnungsreihe und einer Leerkontrolle (nur PBS) jeweils 10 µl pro Well in eine 96 Well-Platte mit flachem Boden gegeben. Zu den Proben wurde pro Well 50 µl

BCA (BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific) gegeben und 30 Min. bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 600 nm in einem ELISA-Reader gemessen. Die IgG-Konzentration der Proben wurde von der ELISA-Reader-Software anhand einer errechneten Ausgleichsgerade der Verdünnungsreihe berechnet. Bei der Berechnung wurde die Verdünnung der Proben berücksichtigt.

4.2.7 Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)

Der ELISA wurde zur quantitativen Konzentrationsbestimmung verschiedener Proteine verwendet. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Sandwich-ELISA Technik, wird eine Mikroplatte mit Antikörpern beschichtet, an die Proteine binden können, welche dann mit einem markierten Zweit-AK nachgewiesen werden. Für die BAFF-Konzentrationsbestimmung wurde das ELISA-Kit „Quantikine® Human BAFF/BLyS“ der Firma R & D Systems, für die Bestimmung der APRIL-Konzentration wurde das ELISA-Kit „human APRIL ELISA BMS2008“ der Firma Bender MedSystems® verwendet.

4.2.7.1 BAFF-Konzentrationsbestimmung mit dem „Quantikine® Human BAFF/BLyS“ ELISA

Die im Kit enthaltene 96-Well-Platte ist mit einem monoklonalen anti-BAFF AK beschichtet. Als erstes wurde, wie im beiliegenden Protokoll beschrieben, eine BAFF-Standard-Verdünnungsreihe hergestellt und diese zusammen mit den Proben (ggf. verdünnt) in die Mikroplatte gegeben. Von jeder Probe und jedem Standard wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.
Während der Inkubation der Proben und Standards in den beschichteten Wells wird jedes BAFF-Protein durch die immobilen AK gebunden. Nachdem alle ungebundenen Substanzen weggewaschen wurden, wird ein Enzym-gekoppelter polyklonaler BAFF-AK zugegeben. Anschließend wurde ungebundenes AK-Enzym-Reagenz weggewaschen und eine Substratlösung zugegeben. Die Farbentwicklung ist proportional zur gebundenen BAFF-Menge. Die Reaktion wird gestoppt und die Farb-Intensität in einem ELISA-Reader bei 450

nm gemessen. Mit den Messergebnissen der BAFF-Standard-Verdünnungen wird eine Standardkurve gebildet anhand derer die BAFF-Konzentration der Proben bestimmt wird.

4.2.7.2 APRIL-Konzentrationsbestimmung mit dem „human APRIL ELISA BMS2008“

Die im Kit enthaltene 96-Well-Platte ist mit einem polyklonalen anti-APRIL AK beschichtet. Die Wells der 96-Well Platte wurden zunächst gewaschen und die zu messenden Proben wurden gegebenenfalls verdünnt. Daraufhin wurden die Proben in die Wells gegeben und eine APRIL-Standard-Verdünnungsreihe nach Angabe des Herstellers direkt in der Platte hergestellt. Von jeder Probe und jedem Standard wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Durchführung des ELISA-Kits erfolgte anhand des beiliegenden Protokolls des Herstellers.

Zu den Proben, den Standards und der Leerkontrolle wurde ein Biotin-konjugierter polyklonaler anti-APRIL AK gegeben und alles inkubiert. Während der Inkubation binden die APRIL-Proteine an den an die Platte gebundenen AK und der Biotin-konjugierte AK bindet an die gebundenen Proteine. Nachdem alle ungebundenen Substanzen weggewaschen wurden, wird Streptavidin-HRP zugegeben, welches an den Biotin-konjugierten AK bindet. Zur Entfernung von ungebundenem Streptavidin-HRP folgt ein weiterer Waschschritt. Danach wird eine Substratlösung zugegeben, welche mit HRP reagiert und entsprechende der APRIL-Menge in der Probe ein farbiges Produkt bildet. Die Reaktion wird durch die Zugabe einer Säure gestoppt und die Absorption wird bei 450 nm gemessen. Mit den Messergebnissen der APRIL-Standard-Verdünnungen wird eine Standardkurve gebildet mit der die APRIL-Konzentration den Proben bestimmt wird.

4.3 Zellbiologische Methoden

4.3.1 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie wurde in dieser Arbeit verwendet, um neuronale Auto-AK im Serum und im Liquor von Patienten nachzuweisen und zu identifizieren.

4.3.1.1 Auto-AK-Bestimmung mit dem Neurologie-Mosaik 13 Kit

Das Neurologie-Mosaik 13 Kit der Firma EuroImmun enthält Objektträger auf denen Primaten-Kleinhirn-Schnitte, Primaten-Darm-Schnitte und Hep2-Zellen (eine Fibroblasten-Zelllinie) aufgebracht sind. Die Schnitte/Zellen wurden mit Patienten-Seren (Verdünung 1:50) bzw. mit Liquor von Patienten (unverdünnt) 30 Min. bei 4 °C inkubiert. Nach einem Waschschritt mit PBS/Tween (im Kit vorhanden) folgte die Inkubation (30 Min., 4 °C) mit einem fluoreszenzmarkierten Zweit-AK (rabbit anti-human IgG), welcher an gebundenes humanes IgG bindet. Nach einem weiteren Waschschritt wurden Glasplättchen mit Glycerol auf dem Objektträger befestigt, damit die Schnitte für die Beurteilung mit dem Fluoreszenz-Mikroskop geschützt waren. Als Positivkontrolle wurde ein Patienten-Serum mit anti-Hu-AK verwendet.

Die neuronalen Auto-AK in den Serum- und Liquor-Proben binden an Epitope der Schnitte/Zellen und werden mit dem fluoreszenzmarkierten Zweit-AK sichtbar gemacht. Anhand des individuellen Bindungsmusters der verschiedenen neuronalen Auto-AK können diese identifiziert werden.

4.3.2 Zellkultur

In dieser Arbeit wurden immortalisierte, adhärente und Suspensions-Zellkulturen, sowie primäre Zellen (Primärkulturen) verwendet. Alle Zellkulturen wurden bei 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert. Für die Kultivierung wurde bei adhärenten Zelllinien das Medium $RPMI_{10\%FCS}$, bei der Suspensions-Zellkultur NK-92 das Medium α-$MEM_{25\%Serum}$ und bei den primären Granularis-Neuronen das Medium $DMEM_{10\%FCS}$ verwendet. Die aus Vollblut isolierten NK-Zellen wurden ohne vorherige Kultivierung umgehend in den Versuch eingesetzt (verwendetes Medium: RPMI-Medium ohne Zusätze). Alle Zellen mit Ausnahme der Primärkultur wurden in 75 cm^2 Zellkulturflaschen kultiviert. Die primären Zellen wurden in kleinen Petrischalen (Gewebekulturschale steril 35,0 / 10 mm) kultiviert.

4.3.2.1 Langzeit-Lagerung von Säugerzellen

Primärkulturen sind nicht unsterblich und wurden nicht längere Zeit gelagert, sondern schnellstmöglich verwendet.
Alle Zelllinien wurden erst bei -80 °C eingefroren und zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff (-196 °C) überführt. Um eine Kontamination mit Mykoplasmen zu verhindern, welche bei -196 °C überleben, wurden die Zellen in Folie eingeschweißt. Als Schutzsubstanz diente 10 % Dimethylsulfoxid ($DMSO_{10\%}$), welches die Kristallbildung innerhalb und außerhalb der Zellen, sowie partielle Dehydration des Zytoplasmas verhindert.

4.3.2.2 Einfrieren und auftauen von Säuger-Zelllinien

Eingefroren wurden die Zellen von einer oder zwei 70-90 % konfluenten Flaschen. Alle adhärent wachsenden Zelllinien mussten zuerst vom Zellkultur-Flaschenboden gelöst werden. Dazu wurde das Medium abgenommen und pro Flasche 4-5 ml 1x Trypsin auf die Zellen gegeben. Wenn sich nach 5 – 15 Min. alle Zellen vom Boden gelöst hatten, wurden 8 - 10 ml Medium zugegeben (doppelte Menge der Trypsin-Lösung), um die Wirkung des Trypsins zu stoppen. Die Zellsuspension (vom Boden gelöste Zellen, wie auch die Zellen der

Flüssigkultur) wurde in 50 ml Falconröhrchen überführt und für 4 Min. bei 1.200 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1–2 ml $DMSO_{10\%}$ resuspendiert und in 2 ml Kryoröhrchen überführt (je 500 µl pro Röhrchen). Die Zellen wurden in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox bei -80 °C langsam eingefroren, bevor sie zu -196 °C überführt wurden.
Aufgetaut wurden die Zellen langsam bei RT. Auf die Zellen wurden vorsichtig 500 µl vorgewärmtes Medium gegeben, dann wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Falconröhrchen überführt. 10 ml Medium wurden langsam in die Zellsuspension getropft und weitere 10 ml Medium etwas schneller zugegeben. Dann wurde die Zellsuspension 4 Min. bei 1.200 rpm zentrifugiert, das Zellpellet in 20 ml Medium resuspendiert und ein weiteres Mal 4 Min. bei 1.200 rpm zentrifugiert. In zwei Zellkultur-Flaschen wurden je 15 ml Medium vorgelegt, das Zellpellet wurde in 10 ml Medium resuspendiert und die Zellsuspension wurde in die Zellkultur-Flaschen aufgeteilt. Nach ein bis zwei Tagen wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und erst nach der zweiten Passage wurden die Zellen für Versuche verwendet.

4.3.2.3 Mediumwechsel, Zell-Passage und Zellernte

Bei adhärenten Zellen wurde bei einem Mediumwechsel das Medium in der Zellkultur-Flasche entfernt und 20 ml frisches Medium zugegeben. Bei der Suspensionskultur wurde die Zellsuspension komplett in ein 50 ml Falconröhrchen überführt, 4 Min. bei 1.200 rpm zentrifugiert, das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und wieder in dieselbe oder eine neue Zellkultur-Flasche gegeben.
Ein- bis dreimal pro Woche wurden die Zelllinien passagiert. Hierzu wurde das Medium entfernt und die konfluent gewachsenen Zellen durch die Zugabe von 4-5 ml 1x Trypsin vom Flaschenboden gelöst. Wenn sich nach 5–15 Min. alle Zellen vom Boden gelöst hatten, wurden 8-10 ml Medium zugegeben (doppelte Menge der Trypsin-Lösung), um die Wirkung des Trypsins zu stoppen. Die Zellsuspensionen wurden in 50 ml Falconröhrchen überführt und für 4 Min. bei 1.200 rpm zentrifugiert. In eine 75 cm^2 Zellkultur-Flasche wurden 20 ml Medium vorgelegt und das Zellpellet wurde in 2-10 ml Medium resuspendiert. Entsprechend der benötigten Zelldichte und Zellmenge wurde 1/2 bis 1/20 stel der Zellen zurück in die Zellkultur-Flasche gegeben. Zum Aussäen der Zellen in Zellkultur-Platten wurde die Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt.
Bei der Zellernte wurde mit den Zelllinien genauso verfahren, wie bei der Zell-Passage. Der einzige Unterschied bestand darin, dass ein Teil der Zellsuspension nicht wieder zurück in die

Flasche gegeben wurde. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert (4 Min. bei 1.200 rpm) und entsprechend dem anschließenden Versuch in unterschiedliche Puffer aufgenommen wurden. Wenn die Zellen in 6-Well-Platten kultiviert worden waren, wurden die Zellen mit 500 µl 1x Trypsin vom Boden gelöst. Anschießend wurden sie 4 Min. bei 1.200 rpm zentrifugiert und im entsprechenden Puffer aufgenommen

Sollte mit den Zellen eine durchflusszytometrische Untersuchung durchgeführt werden, wurden sie in 1x PBS aufgenommen und bis zum Beginn des Versuches bei 4 °C gelagert.

Für eine anschließende Western Blot-Analyse wurden die Zellen je nach Zellpellet-Größe in 300-500 µl „Cell Lysis Reagent" aufgenommen und bei -20 °C weggefroren. Am nächsten Tag wurden die Zell-Lysate wieder aufgetaut und 15 Min. bei 25 °C in einem Thermoshaker inkubiert. Danach wurde 1 Min. bei 14.000 rpm zentrifugiert, wobei sich Zellschrott-Schleim am Boden des Reaktionsgefäßes absetzte. Der klare Überstand, die Proteinlösung, wurde er in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C weggefroren.

Wenn aus den Zellen die RNA isoliert werden sollte, wurden die Zellen in 350 µl (bei einer Zellzahl unter 5x 10^6) bzw. in 600 µl (bei 5x 10^6 - 10^7 Zellen) RLT-Lysis-buffer aufgenommen. Bis zur RNA-Isolation wurden die Proben bei 4 °C gelagert, wurde diese nicht innerhalb der nächsten 2 Std. durchgeführt konnten die Proben bei -20 °C weggefroren werden.

Bei der Ernte der primären Granularis-Neuronen wurde kein Trypsin, sondern Zellschaber verwendet. Sonst wurde alles wie oben beschrieben durchgeführt.

Sollte mit den Granularis-Neuronen eine durchflusszytometrische Untersuchung durchgeführt werden, wurden sie ebenfalls in 1x PBS aufgenommen und bis zum Beginn des Versuches bei 4 °C gelagert.

Für eine Western Blot-Analyse wurden die Zellen mit 100 µl Protease Inhibitor Cocktail gemischt und 400 µl 1x PBS zugegeben. Danach wurde die Zellsuspension in ein Reagenzglas gefüllt und mit einem Stößel mechanisch zerkleinert. Im Anschluss daran erfolgte ein weiterer Zellaufschluss mit dem Ultraschallhomognisator (3x 15 Sek.). Die Zellsuspension wurde 3-10 Min. mit der Tischzentrifuge zentrifugiert und der klare Überstand, in dem sich die Proteinfraktionen befanden, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Als nächstes wurde die Gesamt-Eiweiß Konzentration nephelometrisch bestimmt (4.2.6.1) und 1:4 mit 4x LDS sample Buffer gemischt. Danach wurde die Proteinlösung 5 Min. bei 80-90 °C inkubiert, portioniert und bei -20 °C gelagert

4.3.2.5 Zellzahlbestimmung (Neubauer-Zählkammer)

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde zunächst das Deckgläschen auf der Zählkammer angebracht. Dazu wurde die Zählkammer angehaucht und das Deckgläschen so lange auf der Zählkammer hin- und hergeschoben, bis es nur noch schwer zu bewegen war. Im Randbereich des Deckgläschens hatten sich jetzt die sogenannte „Newtonsche Ringe“ gebildet. So wurde ein definierter Raum von 0,1 mm^3 = 0,1 µl pro Großquadrat geschaffen, in den die Zellsuspension (1:10 verdünnt) durch Adhäsionskräfte eingebracht wurde. Unter Verwendung eines Mikroskops wurde die Zellzahl bei 10-facher Vergrößerung bestimmt: Alle vier Großquadrate wurden ausgezählt (1 Großquadrat = 16 Kleinquadrate) und deren Durchschnittswert errechnet. Dieser Wert mal 10 (Verdünnung) gibt die Zellzahl pro 0,1 µl Volumen wieder und wurde auf Zellen pro ml umgerechnet (x 10.000).

4.3.2.6 Stimulation von Säugerzellen

Zur Stimulation von Zellkultur-Zellen wurden diese in Zellkultur-Platten ausgesät und die errechnete Menge des Stimulus (IFN-γ) zugegeben.

4.3.3 Isolation von Primärkulturen

Als Primärkultur bezeichnet man eine nicht immortalisierte Zellkultur, die direkt aus einem Gewebe gewonnen wurde.

4.3.3.1 NK-Zell-Isolation aus Vollblut

Zur Vollblutentnahme wurden EDTA-Röhrchen verwendet und für die NK-Zell-Isolation das RosetteSep®-Kit „Human NK Cell Enrichment Cocktail“ der Firma StemCell Technologies. In 10 ml Vollblut wurden 500 µl des AK-Cocktails gegeben, gut gemischt und 20 Min. bei

RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Blut 1:2 mit $PBS_{2\%FCS}$ verdünnt, gemischt und über 20 ml Ficoll-Lösung geschichtet, welche in einem 50 ml Falconröhrchen vorgelegt worden war. Bei der anschließenden 20-minütigen Zentrifugation bei 1.200 x g (ohne Bremse!!) wurden die NK-Zellen vom Rest der Blutzellen getrennt. Bei einer Ficollierung ohne den Human NK Cell Enrichment Cocktail werden alle mononukleären Zellen von Erythrozyten und Granulozyten isoliert. Die im RosetteSep® Cocktail enthaltenen AK binden an alle mononukleären Zellen, außer an NK-Zellen, und vernetzen diese mit den roten Blutzellen, wodurch sie bei der Ficollierung zusammen mit diesen pellettiert werden. In der Zell-Phase, die entnommen wird befinden sich so hauptsächlich NK-Zellen. Das NK-Zell-Isolat wurde zweimal mit $PBS_{2\%FCS}$ gewaschen, wobei jeweils 10 Min. bei 1.800 rpm zentrifugiert wurde (mit Bremse). Zum Schluss wurden die Zellen in Medium aufgenommen, gezählt und sofort verwendet.

4.3.3.2 Isolation von Granularis-Neuronen aus Säuger-Kleinhirnen

Beschichtung von Petrischalen zur Kultivierung der Granularis-Neurone: Für die Kultivierung der Granularis-Neurone wurden Petrischalen mit Poly-L-Lysin (PLL, steril filtriert) beschichtet. Dazu wurde in jede Petrischale (Ø 35 mm) 2 ml PLL (50 µg/ml) gegeben. Diese wurden eine Stunde oder über Nacht bei RT inkubiert, bevor der Überstand abgenommen und einmal mit 3 ml destilliertem Wasser gespült wurde. Das Wasser wurde sorgfältig abgenommen und die Petrischalen bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert.

Präparation des Kleinhirns: Die 5-9 Tage alten Ratten wurden getötet, indem ihnen der Kopf mit einer großen Schere dicht am Körper abgetrennt wurde (das Kleinhirn liegt relativ „tief"). Die Köpfe wurden großzügig mit 70 %igem Ethanol abgesprüht. Der Kopf wurde mit Daumen und Zeigefinger der linken Hand gehalten, wobei die Schnauze nach links und der Bereich des Kleinhirns nach rechts zeigten. Mit einer kleinen scharfen Schere wurde die Kopfhaut über den Schädel bis zur Schnauze aufgeschnitten, die Hautlappen zur Seite geklappt und somit die Schädeldecke freigelegt. Als nächstes wurde die Schädeldecke aufgeschnitten. Dazu wurde die Scherenspitze in das Foramen magnum eingeführt (einzige weiche Stelle im „Halsbereich") und die Schädeldecke in einem Halbkreis so weit rechts und links wie möglich aufgeschnitten. Mit einer spitzen, gebogenen Pinzette wurde die Schädeldecke von vorne nach hinten abgezogen, sodass das Gehirn frei lag.

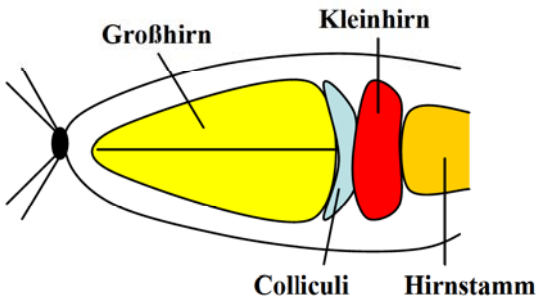

Abbildung 6:Lage des Kleinhirns im Rattenschädel

Die geschlossene Pinzette wurde direkt oberhalb des Kleinhirns eingestochen und langsam geöffnet. Dieselbe Prozedur wurde unterhalb des Kleinhirns wiederholt. Im Anschluss daran wurde das Kleinhirn mit der Pinzette vorsichtig gefasst (längs), langsam herausgezogen und das Kleinhirn in eine Petrischale mit Solution 1H gelegt.

Entfernung der Meningen: Das Kleinhirn wurde auf einen Petrischalendeckel gelegt und ein bis zwei Tropfen Solution 1H darauf getropft (das Kleinhirn darf nicht wegschwimmen, aber auch nicht zu trocken liegen.). Die Meningen wurden unter einem Binokular entfernt, indem mit der stumpfen Seite eines Skalpells oder einer Pinzette vorsichtig an der Oberfläche entlang gestrichen wurde. Meningeales Gewebe: rosa bis rote Fasern und Punkte auf dem Kleinhirn, welche nicht glänzen. Nach dem „Säubern“ wurde das Kleinhirn in eine Petrischale mit Solution 1H gelegt und steril weitergearbeitet. Nach der Präparation jedes Kleinhirns wurden die Scheren, Pinzetten, Skalpelle und die Oberfläche des Petrischalendeckels mit 70 % Ethanol gereinigt, damit es keine Kontaminationen mit Bindegewebe gab.

Zellseparation: Die Solution 1H wurde vorsichtig abgesaugt, 5-10 Kleinhirne wurden mit zwei sterilen Skalpellen zerkleinert. Die sterile Trypsin-Lösung (10 ml) wurde dazugegeben und alles in ein steriles Falconröhrchen überführt, kurz geschüttelt und 15 Min. bei 37 °C inkubiert, während dessen ab und zu sanft geschüttelt wurde. Nach der Inkubation wurde die verdünnte DNase/Trypsin-Inhibitor-Lösung (11,6 ml) zugegeben, geschüttelt und für 2 Min. bei 200 x g zentrifugiert. Wenn kein Pellet zu sehen und/oder der Überstand nicht klar war, wurde die Zentrifugation wiederholt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und 5 ml konzentrierte DNase/Trypsin-Inhibitor-Lösung zugegeben. Die Zellsuspension wurde mit einer Pasteur-Pipette mindestens 30-mal resuspendiert, bis keine Zellklumpen mehr zu sehen waren. Nach 2 Min. oder wenn nötig länger, in denen sich noch verklumptes Gewebe absetzte, wurde der trübe Überstand wurde abgenommen und in ein neues Falconröhrchen gegeben. Diese Prozedur wurde mit den abgesunkenen Zellklumpen wiederholt, der trüben Überstand wurde abgenommen und zur bereits erhaltenen

Zellsuspension gegeben. Die Zellsuspension wurde über 5 ml $BSA_{4\%}$ geschichtet und durch dieses hindurch zentrifugiert (4 Min. bei 200 x g), wobei der Zellschrott im BSA verblieb. Wenn der Überstand noch sehr trüb und/oder das Pellet sehr klein war, wurde erneut zentrifugiert (5 Min. bei 250 x g). Zum Schluss wurde der Überstand abgenommen, das Zell-Pellet in 3 ml Medium resuspendiert und die Zellen gezählt. Zum Zählen wurden die Zellen 1:10 verdünnt und zur Unterscheidung von toten und vitalen Zellen mit Trypanblau angefärbt (20 µl Zellsuspension + 20 µl Trypanblau). In jede beschichtete Petrischale wurden bei einem Endvolumen von 3 ml 1-3 x 10^6 Zellen ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von ca. 48 – 72 Std. im Inkubator wurde in jedes Petrischälchen 10 µl 5-Fluoro-2`-deoxyuridine (FDU; 8 mMolar) zugegeben, um eventuell mitisolierte Fibroblasten zu eliminieren. Bei FDU handelt es sich um ein Zellgift für sich teilende Zellen.

4.3.4 Durchflusszytometrie

Mit einer durchflusszytometrischen Messung können einzelne Zellen untersucht werden. Die Zellen passieren separiert einen Laserstrahl, wobei sie einen Teil des Lichtes streuen. Das Streulicht wird detektiert, da es mit der Größe und der Komplexität der Zelle korreliert. Neben der Größe und der Granularität von Zellen können im Durchflusszytometer auch Fluoreszenzfarben gemessen werden. So können durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion mit Fluoreszenz-markierten AK quantitativ Oberflächenmoleküle und intrazelluläre Proteine auf und in einzelnen Zellen detektiert werden. Binden mehrere AK an eine Zelle, wird eine stärkere Fluoreszenz gemessen als bei Zellen, an die nur ein AK gebunden hat. Auch die gleichzeitige Detektion verschiedener Proteine ist bei der Verwendung unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe mit dem Durchflusszytometer möglich. Die eingesetzten Farbstoffe lassen sich zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen, verfügen aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emissionsspektren, wodurch sie separat detektiert werden können.

In dieser Arbeit wurde das Durchflusszytometer zum Nachweis von AK im Serum, zur Reinheitsbestimmung von Zellisolaten aus Vollblut und zur Bestimmung der extrazellulären und intrazellulären Expression verschiedenen Proteine verwendet.

4.3.4.1 Nachweis extrazellulärer AK-Bindung

Nach der Zellernte wurden die Zellen auf die gewünschte Anzahl Wells einer 96-Well Platte mit rundem Boden verteilt und 4 Min. bei 1.200 rpm zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde der Überstand entfernt und die Zellen durch Mischen auf dem Vortexer vom Boden gelöst. Als nächstes wurden die Zellen 30 Min. bei 4 °C mit 50 µl des Erst-AK bzw. des Serums inkubiert. Der AK und das Serum wurden im Vorhinein mit FACS-Puffer verdünnt. Nach der Inkubation wurde in jedes Well 50 µl FACS-Puffer gegeben, 4 Min. bei 1.200 rpm zentrifugiert, der Überstand entfernt und die Zellen vom Boden gelöst. Dem folgte ein Waschschritt mit 100 µl FACS-Puffer pro Well, nachdem ein weiteres Mal zentrifugiert, der Überstand abgekippt und die Zellen vom Boden gelöst wurden. Danach wurden die Zellen 30 Min. bei 4 °C mit 50 µl des Zweit-AK, welcher an den ersten AK bindet, inkubiert. War bereit der Erst-AK fluoreszenzmarkiert, fielen dieser Inkubations- und der vorherige Waschschritt weg. Nach dieser Inkubation wurden dieselben Waschschritte, wie bereits nach der Inkubation des Erst-AK durchgeführt. Im Anschluss daran wurden die Zellen in 100 µl FACS-Puffer gut resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt, in die bereits je nach Zellmenge 100-200 µl FACS-Puffer vorgelegt worden waren. Falls eine sofortige Messung mit dem Durchflusszytometer nicht möglich war, konnten die Zellen für 1-2 Std. bei 4 °C gelagert werden.

4.3.4.2 Nachweis intrazellulärer AK-Bindung

Bis zur Zugabe des Erst-AK entspricht das intrazelluläre dem extrazellulären Protokoll. Bevor der Erst-AK zugegeben werden konnte, mussten die Zellen fixiert und permeabilisiert werden, damit die AK ins Zellinnere gelangen konnten. Die Zellen wurden mit 100 µl 1 %igem PFA pro Well für 15 Min. bei 4 °C fixiert und nach der Zentrifugation mit 100 µl Permeabilisierungspuffer aufgeschlossen. Erst dann wurden die Zellen 30-45 Min. bei 4 °C mit 50 µl des Erst-AK inkubiert, wobei der AK in Permeabilsierungspuffer verdünnt worden war. Die nächsten Wasch- und Inkubationsschritte entsprachen denen des extrazellulären Protokolls, nur dass statt FACS-Puffer Permeabilibierungspuffer verwendet wurde. Zum Schluss wurden die Zellen noch 1-2 Mal mit 100 µl FACS-Puffer gewaschen, in FACS-Puffer aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt, in die bereits 100-200 µl FACS-Puffer

vorgelegt worden waren. Weil die Zellen fixiert worden waren, war eine Messung im Durchflusszytometer auch nach 24 Std. noch möglich.

4.3.4.3 Bindungsnachweis verschiedener AK

Bei einer Markierung mit mehreren AK musste darauf geachtet werden, dass die AK nicht mit demselben Fluoreszenzfarbstoff markiert waren und dass die Erst-AK, falls ein Zweit-AK benötigt wurde, aus unterschiedlichen Spezies stammten. Andernfalls wäre eine Unterscheidung der unterschiedlichen AK nicht möglich gewesen.

4.3.5 Zytotoxizitäts-Messung

Zelltod wird klassisch durch die Quantifizierung der Plasmamembran-Schädigung bewertet. Es gibt verschiedene Methoden die Zytotoxizität zu messen. Die Methode die in dieser Arbeit verwendet wurde, ist die Messung der Aktivität der Laktat Dehydrogenase (LDH) im Zellüberstand. LDH ist ein stabiles, zytoplasmatisches Enzym, welches in allen Zellen zu finden ist. Es wird nach Zerstörung der Plasmamembran rasch in den Zellkultur-Überstand freigesetzt. In dieser Arbeit wurde die Zytotoxizität mit dem Cytotoxicity Detection Kit (LDH) der Firma Roche Applied Science bestimmt.

4.3.4.1 LDH-Assay

Mit dem LDH-Assay der Firma Roche wurde die Zytotoxizität und damit die Lyse von NB-Zellen ausgelöst durch NK-Zellen in Anwesenheit von IgG untersucht. Die Effekte des IgGs aus OMS-Patienten wurden mit denen gesunden Kontrollpatienten verglichen.
Für diese Versuche wurden 96-Well-Platten mit flachem Boden verwendet und von jeder Probe Doppelansätze durchgeführt. Zur Berechnung der Zytotoxizität mussten folgende Proben mitgeführt werden:

Eine Doppelbestimmung für alle IgG-Proben:

1 + 2) ohne Zellen und ohne AK 1x mit und 1x ohne 2 % Triton (Verdünnung in RPMI-Medium ohne Zusatz) zur Messung des Backgrounds (Triton ist durchsichtig – der Background entsprechend geringer)

3) nur NB-Zellen mit Triton = Maximale Lyse

für jede IgG-Probe extra:

4) nur NB-Zellen mit IgG zur Bestimmung der spontanen Lyse

5) nur NK-Zellen mit IgG (NK-Zell-Wert) um deren spontane Lyse rausrechnen zu können

6) NB- und NK-Zellen mit IgG = Gesamtprobe

Zuerst wurden Zellen der NB-Zelllinie Kelly geerntet, gezählt und pro Well 10.000 Zellen für 20 Std. in 100 µl ihres eigenen Mediums im Brutschrank inkubiert. Nach ca. 18 Std. wurde einem gesunden Spender Vollblut in EDTA-Röhrchen abgenommen und eine NK-Zell-Isolation durchgeführt (siehe 4.3.3.1). Die NK-Zellen wurden gezählt und mit RPMI-Medium ohne Zusätze (RPMI(-)) zu einer Zelldichte von ca. 500.000 Zellen pro ml verdünnt. Die gesamt-IgG-Proben der einzelnen Patienten wurden mit 1x PBS auf 0,16 µg/µl vorverdünnt und dann mit RPMI(-) 1:100 verdünnt. Nach der 20-stündigen Inkubation der NB-Zellen wurde unter dem Mikroskop überprüft, ob die Zellen adhärent geworden waren und das Medium wurde entfernt. In die Wells ohne IgG wurden 100 µl, in die Wells mit IgG 75 µl RPMI(-) gegeben. Danach wurden in die Wells ohne NK-Zellen und ohne Triton weitere 100 µl RPMI(-), in die Wells mit NK-Zellen wurden 100 µl der NK-Zellsuspension und in die Wells mit Triton wurden 100 µl 2 % Triton gegeben. Zum Schluss wurden 25 µl der verdünnten gesamt-IgG-Proben in die entsprechenden Wells gegeben (IgG-Endkonzentration im Well = 0,2 µg/ml) und es folgte eine weitere 20 stündige Inkubationszeit im Brutschrank. Als nächstes wurden die 96-Well-Platten 10 Min. bei 1.800 rpm zentrifugiert und 100 µl des Überstandes in eine neue 96-Well-Platte mit flachem Boden überführt. Danach wurden 100 µl des während der Zentrifugation angesetzten LDH-Assay-Reagenzes zu den Überständen gegeben (Reagenz-Vorbereitung siehe Herstellerangaben). Bei der Zugabe des LDH-Assay-Reagenzes wurde eine Mehrkanal-Pipette verwendet, damit das Reagenz allen Proben zeitnah zugesetzt werden konnte. Die Proben wurden 30 Min. bei RT im Dunkeln inkubiert und danach wurde deren Absorption bei 492 nm umgehend mit dem ELISA-Reader (Multiskan Ex, Thermo Electron Corporation) gemessen (Referenz-Wellenlänge 620 nm). Im Anschluss daran konnte die Zytotoxizität für die einzelnen Proben berechnet werden. Zuerst wurden die

Mittelwerte der Doppelansätze bestimmt, nachdem von allen Werten der Background abgezogen worden war. Von den Gesamtproben wurde als nächstes der NK-Zell-Wert abgezogen = Gesamtproben (-). Mit diesen Werten und der folgenden Formel wurde die prozentuale Zytotoxizität der einzelnen Proben berechnet.

$$\text{Zytotoxizität [\%]} = \frac{\text{Gesamtproben (-)} - \text{spontane Lyse}}{\text{Maximale Lyse} - \text{spontane Lyse}} \times 100$$

Bei der Etablierung des Versuches mit der NK-Zelllinie NK-92 wurde statt RPMI(-) das α-$MEM_{1\ \%Serum}$ verwendet.

4.4 Biochemische Methoden

4.4.1 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen (SDS-PAGE)

Durch die Bindung von SDS an Proteine entstehen negativ geladene SDS-Protein-Komplexe. Durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) können Proteine über die so entstandenen negativen Ladungen entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden.

4.4.1.1 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen aus primären Zellen

Für die Auftrennung von Proteinen aus Granularis-Neuronen wurden vorgegossene Gele der Firma Invitrogen und wurde die vertikale NOVEX Xcell surelock Elektrophorese-/Blotkammer verwendet.
Die Gele wurden in das Elektrophorese-System eingespannt und in die inner Kammer wurde Laufpuffer („NuPage SDS MOPS Running Buffer“) mit 500 µl Antioxidant gefüllt. Zu der Proteinfraktion (Ernte und Aufbereitung siehe 4.3.2.3) wurde Sample reducing Agent (10x) in einem Verhältnis von 1/10 gegeben und 5 Min. bei 80-90 °C erhitzt. Anschließend wurde 120 µl der Protein-Lösung in die große, und 5-12 µl Proteinmarker in die kleine Geltasche geladen. Mit Hilfe des Proteinmarkers ließen sich später die Molekulargewichte der Proteine ermitteln, an welche die Patienten-AK gebunden hatten. Das Elektrophorese-System wurde an die Stromquelle angeschlossen und für die ersten 10 Min. wurde eine Stromstärke von 20 mA, für die nächsten 60-90 Min. wurde eine Stromstärke von 100 mA eingestellt. War die Lauffront am unteren Ende des Gels angelangt, wurde die Elektrophorese beendet.

4.4.1.2 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen aus Zelllinien

Nach der Zellernte und der anschließenden Aufbereitung der Proben zu Proteinlösungen (4.3.2.3) wurde die Gesamt-Eiweiß Konzentration nephelometrisch bestimmt (4.2.6.1).

Anschließend wurden die Proteinlösung mit einer Gesamt-Eiweiß Menge von 200 µg mit dem gleichen Volumen 4x „loading buffer“ versetzt und 5 Min. bei 95 °C im Thermoshaker inkubiert. Danach wurden die Proben zusammen mit einem Proteinmarker auf denaturierende Polyacrylamidgele aufgetragen, welche sich bereits in einer Gelkammer in 1x SDS-Laufpuffer befanden. Anhand des Proteinmarkers ließen sich später die Molekulargewichte der nachgewiesenen Proteine ermitteln. Die Gele setzten sich aus einem 5 % igen Sammel- und einem 12 %igen Trenn-Gel zusammen.

5% iges Sammelgel:	4,1 ml	dH_2O
	1 ml	30 % Acrylamid-Mix
	0,75 ml	1,5 M Tris (pH 6,8)
	60µl	10 % SDS
	60 µl	10 % Ammoniumpersulfat (APS)
	6 µl	TEMED

12% iges Trenngel:	3,3 ml	dH_2O
	4 ml	30 % Acrylamid-Mix
	2,5 ml	1,5 M Tris (pH 8,8)
	100µl	10 % SDS
	100 µl	10 % Ammoniumpersulfat (APS)
	4 µl	TEMED

Die SDS-PAGE erfolgte 2 Std. bei 120 V.

4.4.2 Western Blot Analyse

Die durch eine SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels Western Blot vom SDS-Gel auf eine Membran transferiert.

Nach der SDS-PAGE wurden das Sammelgel ganz und das Trenngel unterhalb der Lauffront abgetrennt. Whatman-Filter und eine Nitrozellulose-Membran wurden passend zur Größe des

Gels zugeschnitten und vor dem Blot-Aufbau zusammen mit „Schwämmen“ in Transferpuffer gelegt.

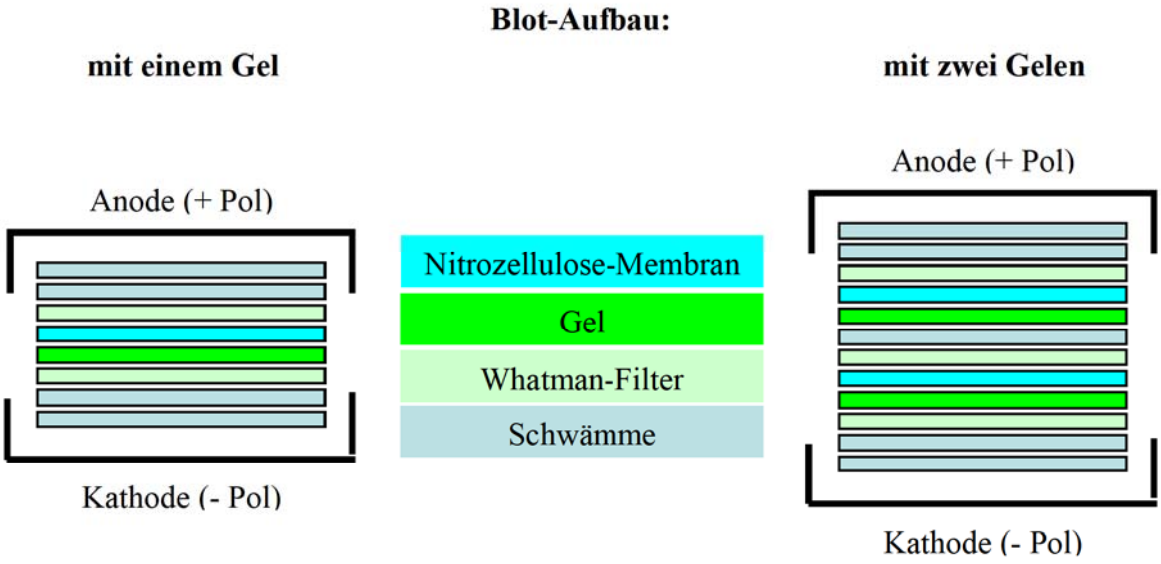

Abbildung 7: Schematischer Aufbau des Western Blots

Der Western Blot wurde, wie in Abb.7 gezeigt aufgebaut. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich zwischen den Schichten (besonders zwischen Gel und Membran) keine Luftblasen bildeten, indem diese vorsichtig zur Seite hin mit einer Pipettenspitze oder einer Glaspipette ausgestrichen wurden. Die Blot-Apparatur wurde mit Transfer-Puffer gefüllt und diese an eine Stromquelle angeschlossen. Der Protein-Transfer erfolgte 2 Std. bei 150 mA. Nach dem Protein-Transfer auf die Nitrozellulose-Membran wurde diese einmal mit PBS_{Tween} (Zelllinien) bzw. TBS-Puffer (Primärkultur) gewaschen und kurz mit Ponceau S-Färbelösung bedeckt. Diese Lösung färbt alle Proteine an, so dass kontrolliert werden konnte, ob sich Luftblasen zwischen Gel und Membran befunden haben, welche gegebenenfalls auf der Membran gekennzeichnet wurden. Die Ponceau S-Färbung wurde durch mehrmaliges waschen mit H_2O entfernt.

4.4.3 Immunfärbung von Proteinen

4.4.3.1 Nachweis von AK gegen Granularis-Neurone

Nach dem Protein-Transfer auf die Membran und der Luftblasenkontrolle wurde die Membran auf Filterpapier leicht angetrocknet, am unteren Ende mit einem Kugelschreiber-Strich versehen und in Streifen geschnitten, welche nummeriert wurden. Der Strich war dazu da, dass später mit Hilfe des Proteinmarkers die genauen Molekulargewichte der Proteine bestimmen werden konnten, an welche die AK der Patienten gebunden hatten. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Streifen in 50 ml Falconröhrchen bei 4 °C gelagert.
Zum Austesten wurden die trockenen Blotstreifen in ein Rillengefäß gelegt und jeweils mit 1 ml TBS-Puffer für 15 Min. bei RT schwenkend inkubiert. Nachdem der TBS-Puffer entfernt worden war, wurde jeder Streifen mit 1 ml TBS-Puffer und 10 µl Serum für 1 Std. bei RT geschwenkt. Als Negativkontrolle wurde ein Streifen ohne Serum inkubiert und als Positivkontrolle wurde ein Patienten-Serum verwendet, in dem sich erwiesenermaßen an Granularis-Neuronen-bindende AK befanden. Nach der Inkubation wurden die Streifen dreimal je 5 Min. mit je 1 ml TBS-Puffer gewaschen und im Anschluss daran mit 1 ml Zweit-AK (anti-human IgG AP-markiert) für 30 Min. bei RT schwenkend inkubiert. Der Zweit-AK war im vorhinein 1:1000 in TBS-Puffer verdünnt worden. Danach wurden die Streifen wieder dreimal je 5 Min. mit TBS-Puffer gewaschen. Zum Schluss wurden die Streifen ca. 10 Min. bei RT mit je 1 ml Substrat (BCIP-NBT) im Dunkeln geschwenkt. Während dessen wurde ab und zu die Färbung überprüft. Mit dem Substrat wurden die AP-markierten AK sichtbar gemacht, welche an den gebundenen AK der Seren gebunden hatten. Die Farb-Reaktion wurde mit dH_2O gestoppt, die Streifen wurden auf Filterpapier getrocknet zur Beurteilung neben dem Proteinmarker aufgeklebt und eingescannt.

4.4.3.2 Protein-Nachweise in Zelllinien

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran für 30 Min. in Milchpulver-Lösung schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal 5 Min.

mit PBS_{Tween} auf dem Schüttler gewaschen und über Nacht bei 4 °C schwenkend mit dem Erst-AK inkubiert. Die AK wurden mit Milchpulver-Lösung verdünnt. Am nächsten Tag wurden ungebundene AK durch die Wiederholung der Waschschritte entfernt und die Membran wurde 1 Std. mit dem zweiten AP-markierten AK inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut dreimal gewaschen und mit „BCIP/NBT-Blue Liquid Substrate“ der Firma Sigma bedeckt, durch welches gebundene AP-markierte AK detektiert wurden. Zum Schluss wurde die Membran getrocknet und eingescannt.

4.4.4 Aufreinigung von Immunglobulin G aus Patienten-Seren und Plasma

Im Serum und in der Plasmapherese-Flüssigkeit von Patienten befinden sich neben Wasser und Immunglobulinen noch viele weitere gelöste Stoffe, wie Proteine, Fette, Kohlenhydrate, Zucker, Stoffwechselprodukte, Ionen und Salze, sowie möglicherweise Medikamente. Diese Stoffe haben natürlich einen Einfluss auf Zellen und können deshalb auch Versuche beeinflussen. In einem Teil dieser Arbeit sollte nur der Effekt von IgG auf die NK-Zell vermittelte Lyse von NB-Zellen untersucht werden. Aus diesem Grund mussten die Immunglobuline der Klasse G vom Rest des Serums bzw. der Plasmapherese-Flüssigkeit getrennt werden. Dazu wurden zwei unterschiedliche Methoden angewendet. Zum einen die Affinitätschromatographie mit Säulen, wenn viel Plasmapherese-Flüssigkeit oder Serum vorhanden war und zum anderen die IgG-Isolation mittels Protein G-Sepharose, wenn nur sehr wenig Serum oder Plasmapherese-Flüssigkeit zur Verfügung stand.

4.4.4.1 IgG-Isolation mittels Affinitätschromatographie

Wenn IgG aus 5-20 ml Patientenmaterial isoliert werden sollte wurde die große, 5ml Protein G Säule, bei geringeren Mengen (1-5 ml) wurde die kleine, 1ml Protein G Säule verwendet. Als Erstes wurde das Patienten-Material mit Glycin-Puffer (pH 9) verdünnt, Serum 1:2 und Plama 1:3. Danach wurde das verdünnte Patienten-Material, wie auch alle Lösungen für diese Methode steril filtriert. Bevor die verdünnte Probe durch die Säule gepumpt wurde, wurde die Säule mit 5 bzw. 15 ml Glycin-Puffer (pH 9) gespült. Beim Durchlaufen der Probe durch die

Säule wird das IgG an die Säule gebunden. Danach wurde erneut mit 5 bzw. 15 ml Glycin-Puffer (pH 9) gespült, um alle Bestandteile des Serums bzw. des Plasmas mit Ausnahme des IgGs aus der Säule zu entfernen. Im Anschluss daran wurde das gebundene IgG in 10 bzw. 20 ml Glycin-Puffer (pH 2,7) eluiert und in 20 Reaktionsgefäßen aufgefangen (je Reaktionsgefäß 0,5 bzw. 1 ml). Für weitere IgG-Aufreinigungen wurde die Säule erneut mit 5 bzw. 15 ml Glycin-Puffer (pH 9) gespült, mit 20 % Ethanol befüllt und bei 4 °C gelagert. Die aufgefangenen IgG-Proben wurden bei 260 / 280 / 320 nm photometrisch gemessen und die Proben mit einer OD von 2,8 oder mehr wurden in einen Dialyseschlauch gegeben. Die Proben wurden 5x je 24 Std. mit 1 l 1x PBS oder 2-3x je 24 Std. mit 5 l 1x PBS dialysiert. Diese Umpufferung ist nötig, weil der Glycin-Puffer (pH 2,7), in welchem die IgGs eluiert wurden, wegen seines niedrigen pH-Wertes Zellen schädigt und somit Einfluss auf die Messung der Zytotoxizität hätte. Nach der Umpufferung wurden 30 µl Probe 1:10 in 1x PBS verdünnt und nephelometrisch die IgG-Konzentration bestimmt (4.2.6.1). Der Rest der Probe wurde portioniert und bis zum Gebrauch bei -20 °C weggefroren.

4.4.4.2 IgG-Isolation mittels G-Sepharose

Eine IgG-Isolation mit Protein G-Sepharose ist bereits ab einer Serum-Menge von 50 µl möglich. 100 µl vorgequollene Protein G-Sepharose wurde in ein Reaktionsgefäß gegeben und 3x mit je 1 ml 1x PBS gewaschen. Danach wurde jeweils 1 Min. bei 5.000 rpm zentrifugiert und der Überstand entfernt. Im Anschluss wurden 50-100 µl Serum zusammen mit 450-400 µl 1x PBS zugegeben. Die Reaktionsgefäße wurden in einem 50 ml Falconröhrchen über Nacht bei 4 °C gerollt, damit sich die Protein G-Sepharose nicht absetzte. Am nächsten Tag wurden die Proben 1 Min. bei 5.000 rpm zentrifugiert, der Überstand entfernt und 3x mit 1 ml 1x PBS gewaschen. Im Anschluss daran wurde 300 µl IgG-Elutionspuffer zugegeben und die Proben 15 Min. bei RT gerollt. Anschließend wurde erneut 1 Min. bei 5.000 rpm zentrifugiert und das Eluat in ein neues Reaktionsgefäß überführt in dem zur Neutralisation bereits 30 µl Tris-HCl (pH 9,5) vorgelegt worden waren. Zum Schluss wurden die IgG-Lösungen mit Dialyseschläuchen (Durchmesser 6 mm) in 1x PBS umgepuffert (siehe 4.4.4.2) und die IgG-Konzentration photometrisch mittels BCA-Kit bestimmt (4.2.6.2). Gelagert wurden die Proben bis zum späteren Gebrauch bei -20 °C.

4.5 Statistische Auswertung

Für die statistischen Auswertungen wurde das Programm Graph Pad Prism Version 4.02 verwendet.

Für die Berechnung von Häufigkeiten wurde der Chi-Quadrat (χ^2) -Test (4-Feldertafel) verwendet. Unterschiede zwischen stetigen Merkmalen wurden mit dem T-Test, bei zwei verschiedenen Gruppen, und mit ANOVA, bei mehr als zwei Gruppen, analysiert. Bei der Analyse von Korrelationen wurde die lineare Regression angewendet. Ein p-Wert unter 0,05 (95 % Unterschied / Zusammenhang) wurde als signifikant gewertet.

5. Ergebnisse

5.1 Bestimmung der IgG-Subklassen-Verteilung von Autoantikörpern bei Kindern mit OMS

Ziel dieser Studie war die IgG-Subklassen-Analyse der Auto-Antikörper (Auto-AK) von OMS-Patienten. Wenn die dominierende IgG-Subklasse der Auto-AK bekannt ist, lassen sich mögliche Ziel-Antigene weiter einschränken, da verschiedene IgG-Subklassen unterschiedliche Substanz-Klassen (Polysaccharide, Proteine, Lipide) binden. Des Weiteren hat die IgG-Subklassen-Verteilung diagnostische Relevanz. AK der IgG1-Subklasse sind antibakteriell oder antiviral, wohingegen AK der IgG2-Subklasse gegen bakterielle Kapselpolysaccharide gerichtet sind. AK der IgG3-Subklasse sind virusneutralisierende AK und wurden vermehrt bei Autoimmunerkrankungen festgestellt und AK der IgG4-Subklasse sind in die Entstehung von Allergien involviert.

In dieser Studie sollte festgestellt werden, ob bei OMS-Patienten mit normaler Gesamt-IgG-Subklassen-Verteilung die nachgewiesenen Auto-AK hauptsächlich einer oder zwei der vier IgG-Subklassen angehören. Zunächst wurde eine Analyse der Auto-AK gegen intrazelluläre Antigene durchgeführt, indem die Seren der Patienten immunhistochemisch und mittels Western Blot untersucht wurden. Eine Überprüfung der IgG-Subklassen-Verteilung der Auto-AK-Oberflächenbindungen an Neurone des Kleinhirns wurde mit dem Durchflusszytometer durchgeführt. Um auszuschließen, dass die ermittelte IgG-Subklassen-Verteilung auf eine Veränderung im Gesamt-IgG zurückzuführen ist, wurde die Verteilung der IgG-Subklassen im Gesamt-IgG abschließend nephelometrisch analysiert.

5.1.1 IgG-Subklassen Verteilung intrazellulär bindender Auto-AK

5.1.1.1 Immunhistochemie

Für die immunhistochemische Untersuchung der IgG-Subklassen-Verteilung wurde das „*EuroImmun Neurologie-Mosaik-Kit*® " von der Firma Euroimmun verwendet (4.3.1.1). Die gefärbten Schnitte wurden mittels Fluoreszenz-Mikroskopie von PD Dr. Franz Blaes ausgewertet.

Bevor eine standardisierte Färbung der Schnitte mit allen Patienten-Seren durchgeführt werden konnte, wurde die optimale Verdünnung der Seren und der Zweit-AK ermittelt. Für ein optimales Ergebnis wurden die Seren in einer Verdünnung von 1:50, die Zweit-Antikörper hingegen unterschiedlich stark verdünnt eingesetzt: Gesamt-IgG 1:75, IgG1 1:32 und IgG2-4 1:16. Es wurden Seren von insgesamt 16 OMS-Patienten, 15 NB-Patienten und 12 gesunden Kontrollen immunhistochemisch auf Auto-AK untersucht.

Wie in Tab.13 dargestellt, konnten bei neun der 16 getesteten (56,25 %) OMS-Patienten, aber nur bei einem von 15 (6,67 %) NB-Patienten und bei keinem der 12 gesunden Kontroll-Patienten Auto-AK nachgewiesen werden. Der χ^2-Test ergab eine statistische Signifikanz von $p<0,01$. Ein einheitliches Bindungsmuster der Auto-AK aus den Seren der positiven OMS-Patienten wurde nicht gefunden. Innerhalb der neun positiv getesteten Seren wurden in drei Seren anti-Hu-AK nachgewiesen (mittels RAVO-Blot bestätigt), in drei weiteren Seren wurden IgG-Bindungen im Zytoplasma von Purkinje-Zellen nachgewiesen (Abb.8). Das IgG eines Serums zeigte eine Bindung an die Nervenfasern der weißen Substanz des Kleinhirns und in den letzten zwei Seren wurden anti-nukleoläre AK (ANA) ohne neuronale Spezifität detektiert.

Sieben der neun OMS-Patienten, bei denen Auto-AK immunhistochemisch nachgewiesen werden konnten, wurden mit dem Zweit-AK der IgG-Subklasse 3 (Tab.13 und Abb.8), fünf mit dem IgG1-AK und drei mit dem IgG2-AK nachgewiesen. Mit dem IgG4-AK konnten keine Auto-AK nachgewiesen werden.

Die zwei ANA-positiven Seren zeigten eine starke Reaktivität in der IgG2-Subklasse, eine schwächere in der IgG-1 Subklasse und im Gegensatz zu den anderen positiven OMS-Seren

keine mit der IgG3-Subklasse. Das einzige positive NB-Serum zeigte eine schwache IgG1 und IgG3 anti-Hu Reaktivität.

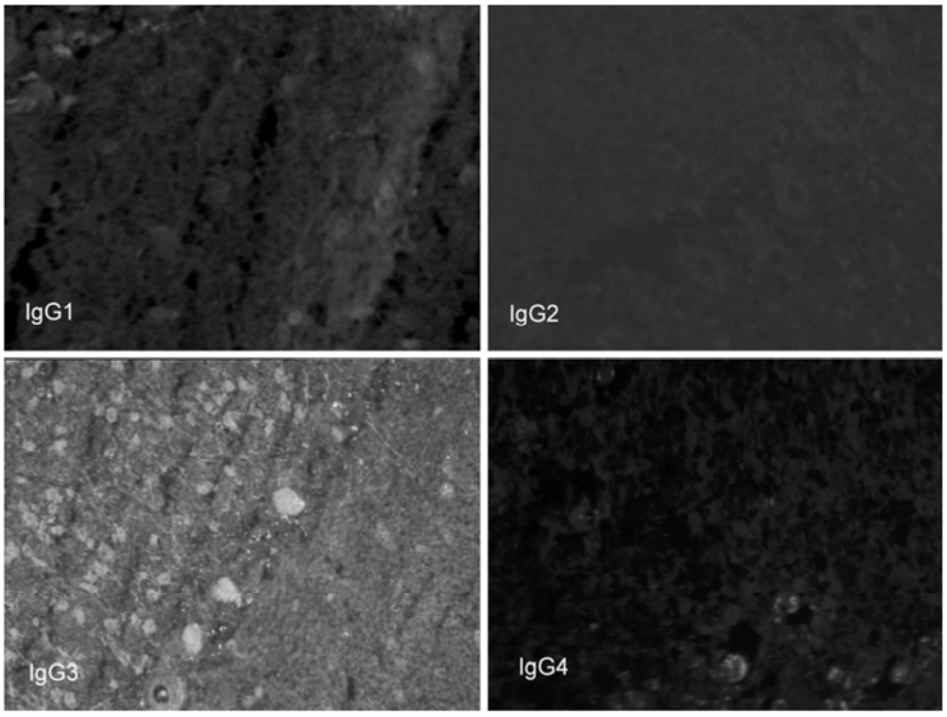

Abbildung 8: Immunfluoreszenz-Färbung von Primaten-Kleinhirn Schnitten
Primaten-Kleinhirn Schnitte aus dem „*EuroImmun Neurologie-Mosaik-Kit*®“ der Firma Euroimmun wurden mit dem Serum des OMS-Patienten und danach jeweils mit einem Zweit-AK der vier IgG-Subklassen inkubiert. (Vergrößerung: x 200)

OMS-Patient	Gesamt-IgG	IgG 1	IgG 2	IgG 3	IgG 4
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
3	-	-	ANA	-	-
4	Spur Purkinjezell-Zytoplasma	Purkinjezellen	-	Purkinjezellen	-
5	Fasern, Zellen weiße Substanz 1/80	Fasern weiße Substanz	-	Fasern weiße Substanz	-
6	Purkinjezell-Zytoplasma	Hu	Hu	Hu	-
7	-	-	-	-	-
8	Hu-AK	-	-	Hu	-
9	ANA 1/200	ANA	ANA	-	-
10	Purkinjezell-Zytoplasma	-	-	Purkinjezell-Zytoplasma	-
11	Hu-AK	-	-	Hu	-
12	-	-	-	-	-
13	schwach ANA	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-
16	Purkinjezell-Zytoplasma	-	-	Purkinjezell-Zytoplasma	-

Tabelle 13: Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen

Gewebe-Schnitte des „*EuroImmun Neurologie-Mosaik-Kit*®“ der Firma Euroimmun wurden mit dem jeweiligen Patienten-Serum und mit den unterschiedlichen Zweit-AK (IgG gesamt, IgG1, 2, 3, oder 4) inkubiert und mittels Fluoreszenz-Mikroskopie ausgewertet. (Durchführung siehe 4.3.1.1). Angegeben sind nachgewiesene Auto-AK (Hu, ANA) und die jeweiligen Bereiche des Kleinhirns, die angefärbt wurden.

ANA = anti-nukleoläre AK

Hu = an verschiedene Proteine (HuC, HuD, Hel-N1) in Neuronen und Tumorzellen, wie u.a. Neuroblastome, bindende AK

5.1.1.2 Western Blot

Um zu zeigen, dass IgGs aus dem Serum von OMS-Patienten an Bestandteile von Granularis-Neuronen binden, wurde exemplarisch mit sieben OMS-Seren und als Kontrolle mit zwei

Seren von Patienten mit einem adulten OMS und einem Serum eines Patienten mit anti-Hu AK ein Western Blot durchgeführt. Für die Western Blot Analyse wurden Granularis-Neurone (CGN`s) aus dem Kleinhirn von 5-9 Tage alten WT-Ratten isoliert und in Kultur genommen. Da nicht auszuschließen war, dass in der Zellsuspension außer CGN´s noch andere, sich teilende Zellen vorhanden waren, wurde Doxorubicin zugesetzt. Hierbei handelt es sich um ein Zytostatikum, das die Zellteilung verhindert. Weil sich ausdifferenzierte Neurone nicht teilen können, andere evtl. mitisolierte Zellen (z.B. Fibroblasten) aber teilungsfähig sind, wurde mit der Doxorubicin-Behandlung verhindert, dass CGN´s nicht von den sich teilenden Zellen überwuchert wurden.
Die Zellen wurden aufgeschlossen, das Protein-Gemisch der Größe nach gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran übertragen (Durchführung siehe 4.4.1-4.4.3). Diese wurde nach dem Trocknen in dünne Streifen geschnitten, die mit den unterschiedlichen Seren inkubiert wurden. Als Zweit-AK wurde ein AP-markierter AK verwendet, der sich gegen humanes IgG richtet.

Bei fünf der sechs getesteten OMS-Seren konnten Bindungen an verschieden große Proteine von CGN`s nachgewiesen werden. Das Serum Nr. 2 zeigt wie die anti-Hu Positivkontrolle Banden bei 38 und 40 kDa. Dieses Bandenmuster ist typisch für anit-Hu AK. Bei dem Serum Nr. 6 konnte, wie auch in den immunhistochemischen Untersuchungen, keine IgG-Bindungen festgestellt werden. Dies könnte allerdings durch einen präanalytischen Fehler bedingt sein, wie z.B. der Lagerung bei falscher Temperatur.

Abbildung 9: Bindung von OMS-IgG an Proteine von CGN`s

Zell-Lysate von CGN's wurden auf 12 %igen SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Westen Blot analysiert (Durchführung siehe 4.4.1-4.4.3). Die Blots wurden in Streifen geschnitten und mit 9 verschiedenen OMS-Seren inkubiert (2-7 und 9 kindliches OMS, 1 und 8 adultes OMS). Die Detektion erfolgte mit einem AP-markiertem AK gegen humanes IgG. Als Positivkontrolle (+) diente das Serum eines Patienten mit Hu-AK; als Negativkontrolle (-) wurde nur der Zweit-AK eingesetzt.

5.1.2 IgG-Subklassen Verteilung an CGN-Oberfläche bindender Auto-AK

5.1.2.1 Durchflusszytometrie

Mit durchflusszytometrischen Untersuchungen wurde die IgG-Subklassen-Verteilung der OMS Auto-AK-Bindung an CGN´s bestimmt (Abb.10-12). Hierzu wurden Granularis-Neurone, wie unter 4.3.3.2 beschrieben, aus dem Kleinhirn von 5-9 Tage alten WT-Ratten isoliert, mit den Seren der Patienten inkubiert und die gebundenen AK mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten AK gegen die verschiedenen IgG-Subklassen nachgewiesen.

Bei den durchflusszytometrischen Untersuchungen zeigte sich bei dem Oberflächenbindungs-Nachweis mit den AK der Subklasse 1 und 2 eine signifikante Erhöhung des Mittelwerts bei OMS-Patienten verglichen mit den gesunden Kontrollen (ANOVA: IgG1 $p<0,01$, IgG2 $p<0,003$). Allerdings lagen bei IgG1 nur zwei (nicht signifikant), bei IgG2 nur drei der 16 getesteten OMS-Seren ($p < 0,01$) über dem Cut-off der gesunden Kontrollpatienten. Die NB-Seren zeigten keine IgG1-Erhöhung, aber eine deutliche IgG2-Erhöhung, die sich anhand des ANOVA-Tests als signifikant erwies ($p<0,01$) (Abb.11+12). Der deutlichste Unterschied der IgG-Bindung an CGN´s zwischen OMS-Patienten und den beiden Kontroll-Gruppen wurde mit dem Zweit-AK der IgG-Subklasse 3 detektiert. Bei dieser Messung lagen acht der 16 getesteten OMS-Seren über dem Cut-off der gesunden Kontrollen ($p<0,0001$; Abb.11). Durch die Verwendung des IgG4 Zweit-AK konnte kein Unterschied zwischen den verschiedenen Patienten-Gruppen ermittelt werden (Abb.11).
Ein Unterschied in der Bindung an CGN´s zwischen OMS-Patienten mit und ohne NB konnte nicht festgestellt werden (nicht gezeigt).

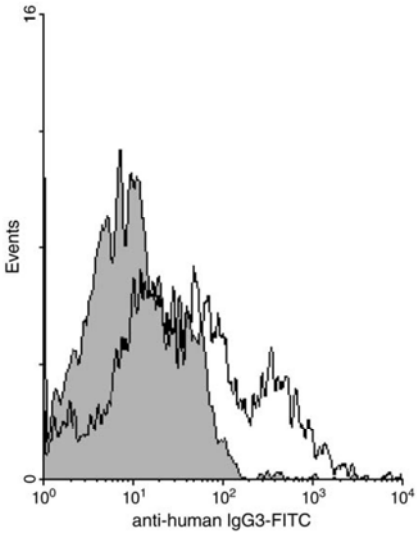

Abbildung 10: FACS Analyse der Oberflächenbindung eines OMS- und eines Kontroll-Serums an CGN´s
CGN´s wurden mit den Seren von OMS-Patienten und Kontrollpatienten inkubiert und die gebundenen IgG3 Auto-AK mit einem FITC-konjugierten anti-human-IgG3 AK nachgewiesen. Exemplarisch wird hier die Oberflächenbindung eines OMS-Serums (weißer Graph) im Vergleich zu einem Kontrollserum (grauer Graph) mit einem Histogramm-Blot gezeigt. Die Fluoreszenz-Intensität (x-Achse) ist gegen die Zellzahl (y-Achse) dargestellt.

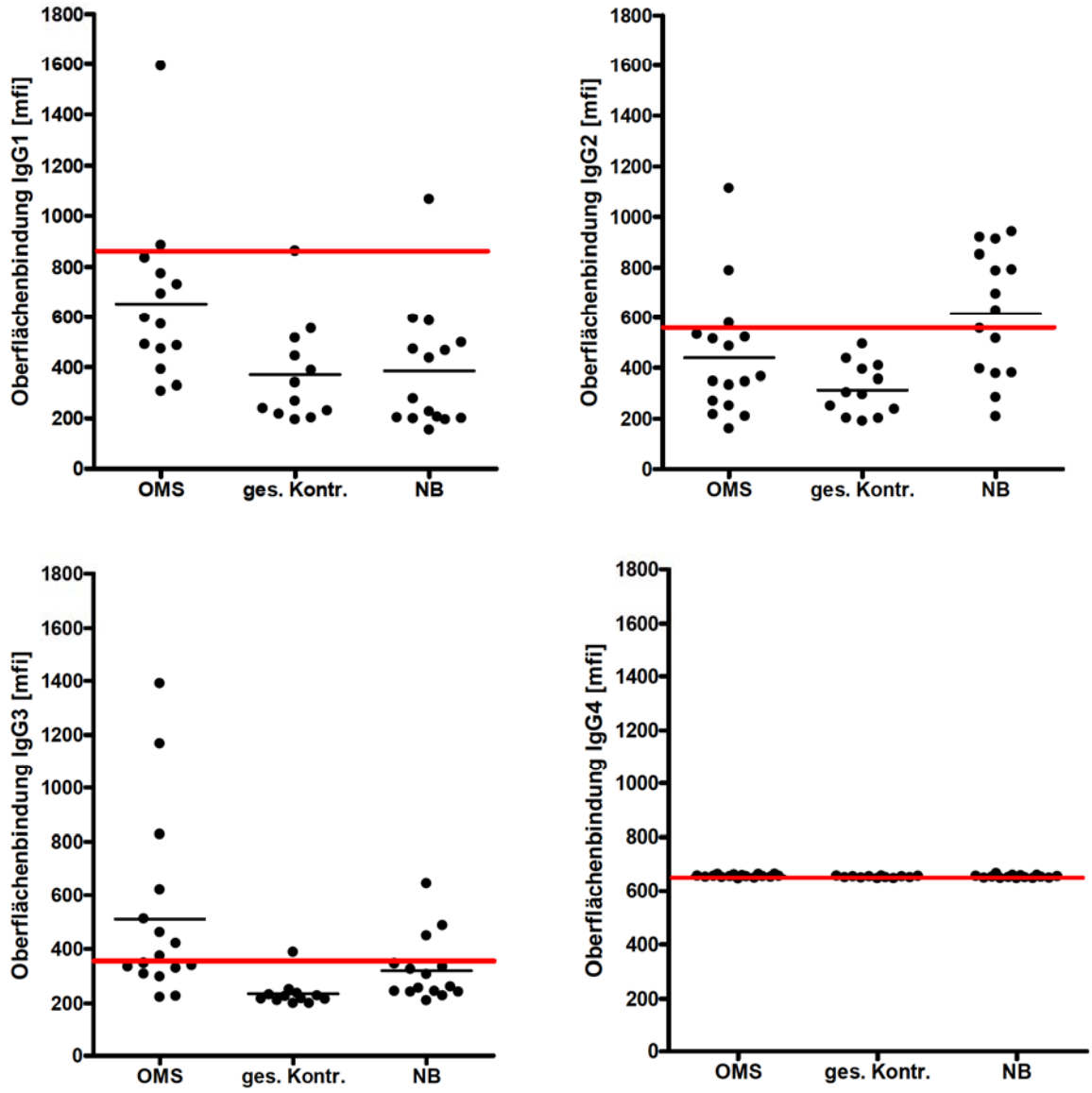

Abbildung 11: Oberflächenbindung der vier IgG-Subklassen an CGN´s

CGN´s wurden mit Patientenseren (Verdünnung 1:50) und anschließend mit fluoreszenzmarkierten AK inkubiert, welche gegen die verschiedenen IgG-Subklassen gerichtet waren (AK-Verdünnungen: IgG1 = 1:32; IgG2-4 = 1:16) (genaue Durchführung siehe 4.3.4.1). Die CGN-Oberflächenbindung wurde mit dem Durchflusszytometer analysiert. Der Cut-off (rote Linie) lag bei Messungen mit dem IgG1-AK bei einer mfi von 866,6 , mit dem IgG2-AK bei 569,2 , mit dem IgG3-AK bei 360,9 und mit dem IgG4-AK bei 660,1.

mfi = mittlere Fluoreszenz-Intensität, Cut-off = Mittelwert der gesunden Kontrollen + (2,5 x Standardabweichung der gesunden Kontrollen)

Wie gezeigt, wurden acht der 16 OMS-Seren IgG3-positiv getestet, wohingegen nur zwei IgG1-positiv, drei IgG2-positiv und keines der OMS-Seren IgG4-positiv getestet wurde (χ^2-Test, $p<0,01$, Abb.12). Mit der durchflusszytometrischen Analyse konnte demnach gezeigt

werden, dass IgG3 die dominierende IgG-Subklasse der CGN-Oberflächenbindenden Auto-AK bei OMS-Patienten ist (Abb.12).

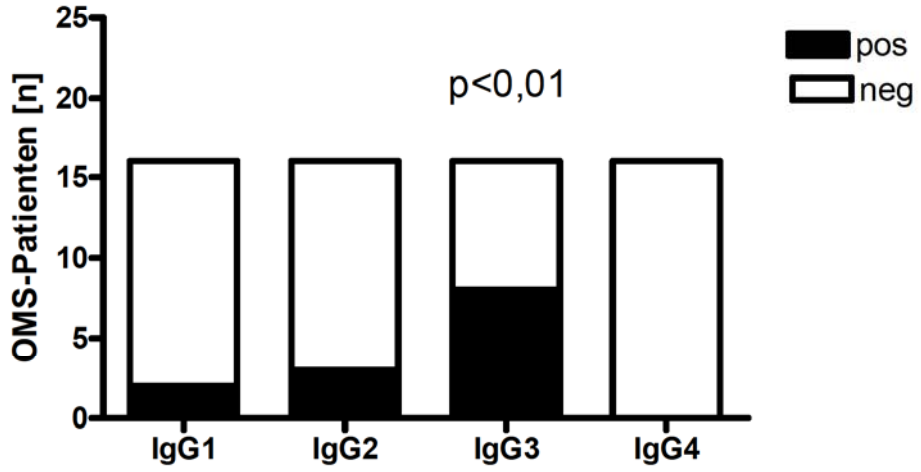

Abbildung 12: IgG-Subklassen Analyse der getesteten OMS-Seren
Dargestellt sind hier die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen. In schwarz ist der Anteil der positiv getesteten, in weiß der negativ getesteten OMS-Seren gezeigt. Als positiv wurden Ergebnisse gewertet, wenn sie über dem Cut-off der gesunden Kontrollpatienten, als negativ, wenn sie darunter lagen. Zur statistischen Auswertung wurde der χ^2-Test verwendet.
Cut-off = Mittelwert der gesunden Kontrollen + (2,5 x Standardabweichung der gesunden Kontrollen)

5.1.3 Überprüfung der Gesamt-IgG3 Menge im Serum

Um auszuschließen, dass die Dominanz der IgG3-Subklasse auf Grund einer erhöhten Gesamt-IgG3 Menge zustande kam, wurde die Gesamt-Serum-IgG Menge der vier IgG-Subklassen nephelometrisch bestimmt. Weil Serum von kleinen Kindern nur in geringen Mengen verfügbar ist, wurden nur je 6 Seren von OMS-Patienten, NB-Patienten und gesunden Kontroll-Patienten gemessen.

Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Gesamt-IgG3 Menge im Serum zwischen den drei Patienten-Gruppen gefunden werden (OMS: 0,33 ± 0,17 g/l; NB: 0,38 ± 0,12 g/l; GK: 0,60 ± 0,28 g/l, Abb.13). Wenn überhaupt sind sogar weniger IgG3-AK im Serum von OMS-Patienten im Vergleich zu den Kontroll-Patienten. Auch die anderen IgG-Subklassen und die Gesamt-IgG-Menge zeigten keine statistisch signifakanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen (Abb.13).

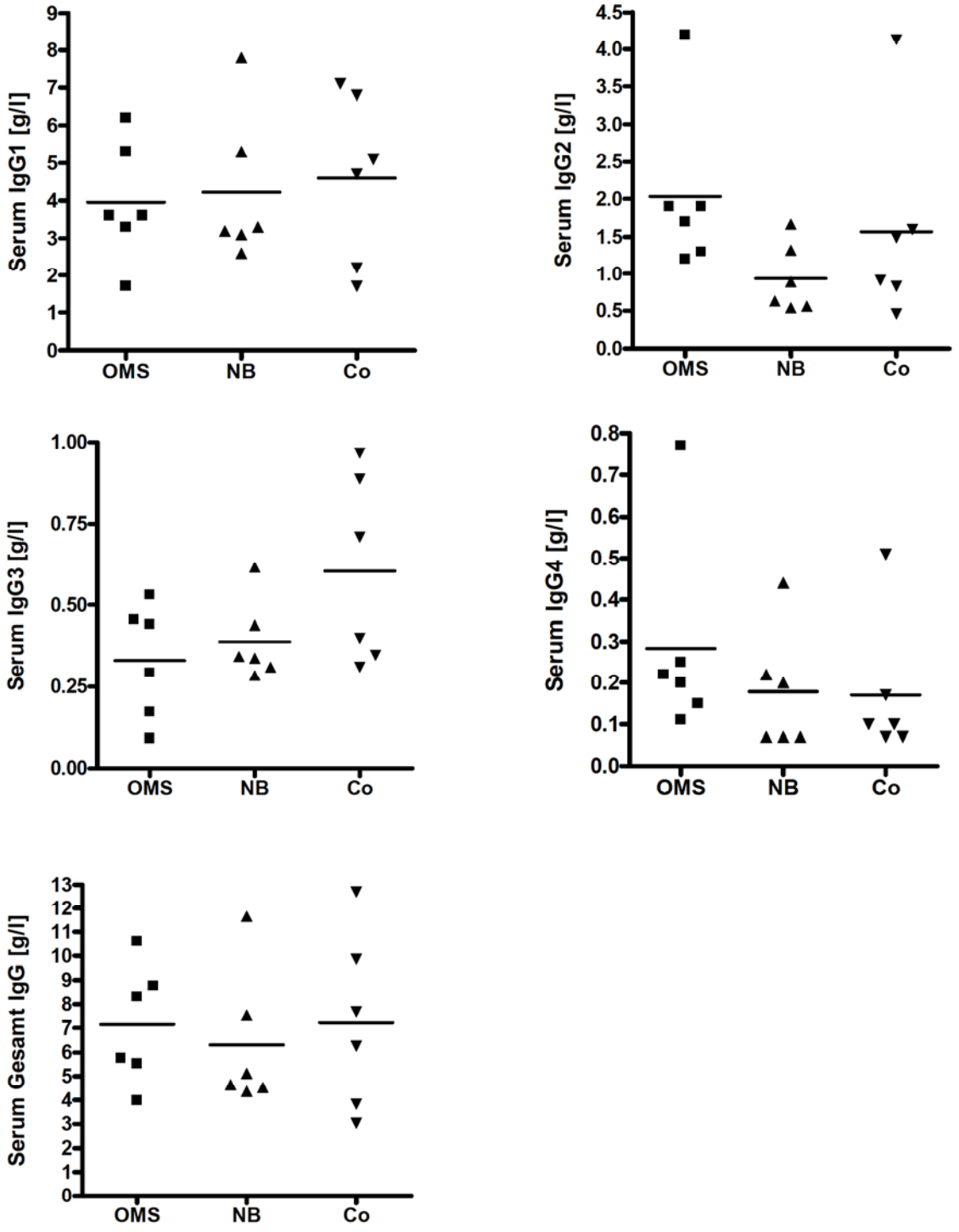

Abbildung 13: Nephelometrisch ermittelte Serum-Konzentrationen der vier IgG-Subklassen und des Gesamt-IgGs

Die Konzentrationen der vier IgG-Subklassen und des Gesamt-IgGs in den Seren der Patienten wurden von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. C. Jaeger (Giessen) nach Angaben des Herstellers mit einem Behring Nephelometer bestimmt. Die Unterschiede zwischen den OMS-Patienten und den zwei Kontroll-Gruppen waren bei keiner der IgG-Subklassen und auch nicht bei der Gesamt-IgG Menge statistisch signifikant.

5.1.4 Zusammenfassung

Die IgG-Subklassen Verteilung von Auto-Antikörpern gegen intrazelluläre Antigene wurde mittels Immunhistochemie und Western Blot untersucht. Bei neun von 16 OMS-Patienten, aber nur bei einem von 15 NB-Patienten und keiner der Kontrollen konnten Auto-AK nachgewiesen werden. Die spezifisch neuronal oder cerebellär bindenden Auto-AK gehörten hauptsächlich zur IgG3-Subklasse (Tab.14). Der einzige an Auto-AK positiv getestete NB-Patient zeigte schwache IgG1 und IgG3 Reaktivität.

Zur Ermittlung der IgG-Subklassen-Verteilung der IgG-Oberflächenbindung an Kleinhirn-Neurone wurde die Methode der Durchflusszytometrie verwendet. Die vorherrschende IgG-Subklasse der an die Oberfläche der Kleinhirn-Neurone bindenden Auto-AK bei den getesteten OMS-Patienten war IgG3 (Tab.14).

OMS-Patienten	Diagnose	IHC	WB	FACS
1	OMS-NB	Neg	pos	neg
2	OMS-NB	Neg		IgG3
3	OMS-NB	IgG2		IgG3
4	OMS-NB	IgG3, IgG1		IgG3, IgG2
5	OMS-NB	IgG1, IgG3		IgG2
6	OMS-NB	IgG1, IgG2, IgG3		IgG3
7	OMS-NB	Neg		IgG1
8	OMS-NB	IgG3	pos	neg
9	OMS-NB	IgG1, IgG2	pos	neg
10	OMS-NB	IgG3	pos	neg
11	OMS-NB	IgG3	pos	IgG3
12	OMS	Neg		IgG2
13	OMS	Neg		neg
14	OMS	Neg		IgG3, IgG1
15	OMS	Neg		IgG3
16	OMS	IgG3	neg	IgG3

Tabelle 14: Zusammenfassung der Ergebnisse der IgG-Subklassen Bestimmung bei OMS-Patienten
IHC (Immunhistochemie): eingetragen sind die jeweils nachgewiesenen IgG-Subklassen. neg = keine Auto-AK detektiert; WB (WesternBlot): pos/neg = Bindung an Ratten-Granularisneurone nachgewiesen/nicht nachgewiesen, kein Eintrag = Serum nicht getestet; FACS (Durchflusszytometrie): eingetragen sind die IgG-Subklassen, bei denen der ermittelte Wert über dem Cut-off der gesunden Kontrollen lag

Zusammenfassend ergaben die Untersuchungen der Seren von OMS-Patienten zur IgG-Subklassen Verteilung eine erhöhte Auto-AK-Bindung an neuronale Strukturen des Kleinhirns durch IgGs der Subklasse 3 und in geringerem Umfang durch IgGs der Subklasse 1. Eine Beeinflussung der Messung durch eine erhöhte IgG3 und/oder IgG1 Konzentration im Serum wurde durch nephelometrische Untersuchungen der Gesamt-IgG-Subklassen Verteilung ausgeschlossen.

5.2 IgG-Effekt auf die NK-Zell vermittelte Lyse von NB-Zellen

NK-Zellen sind ein Teil des angeborenen Immunsystems und wichtig für die Identifikation und Entfernung entarteter Zellen. Sie lysieren infizierte Zellen, Tumorzellen, fremdes Gewebe und Bakterien. Ihre Zielzellen erkennen sie unter anderem an den Antikörpern, die an diese gebunden haben. 2005 konnte von Zeng et al. gezeigt werden, dass gegen NB-Zellen gerichtete AK (ch14.18) die Lyse der NB-Zellen durch NK-Zellen verstärken können (Zeng 2005). Für diese Studie wurde der AK ch14.18 verwendet, welcher gegen das Glykolipid-Antigen Gangliosid GD_2 gerichtet ist. GD_2 wird in großer Menge von NB-Zellen exprimiert. Gesundes Gewebe, wie z.B. das periphere Nervensystem oder das Kleinhirn, exprimiert GD_2 nur begrenzt. Es ist bekannt, dass Auto-AK von OMS-Patienten an NB-Zellen binden.
Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Effekt des IgGs aus dem Serum von OMS-Patienten auf die NK-Zell vermittelte Lyse von NB-Zellen mit dem Effekt des IgGs gesunder Kontroll-Patienten verglichen werden. Nach der erfolgreichen Etablierung der Versuchsbedingungen und der Bestimmung der geeigneten IgG-Konzentration mit dem bereits oben erwähnten AK ch14.18, wurden IgGs aus dem Serum von OMS-Patienten und gesunden Kontroll-Patienten aufgereinigt und die Zytotoxizität der verschiedenen Proben gemessen. Die Messung der Zytotoxizität basierte auf der Bestimmung der Aktivität der Laktat-Dehydrogenase-Aktivität (LDH), die aus dem Zytosol zerstörter Zellen in den Zellüberstand freigesetzt wird. Mit einem LDH-Assay wurde die Zytotoxizität und damit die Lyse von NB-Zellen durch NK-Zellen in Anwesenheit von IgG untersucht. Die Effekte des IgG aus OMS-Patienten wurden mit denen der IgGs gesunder Kontroll-Patienten verglichen.

5.2.1 Etablierung der Versuchsbedingungen

Bei der Etablierung der Versuchsbedingungen wurden verschiedene Aspekte des Versuches variiert:

- Zellzahl der Ziel- Zellen
- Verhältnis von Ziel- zu Effektor- Zellen
- Zeit in der sich die Ziel- Zellen an die Zellkultur-Platten anheften

- Inkubationszeit nach der der Zell-Überstand für die Messung abgenommen wurde
- IgG-Konzentration

Zum Schluss wurde noch die Ziel-Zelllinie ausgetauscht und als Effektor-Zellen wurden statt einer NK-Zelllinie frisch isolierte NK-Zellen aus dem Blut eines gesunden Spenders verwendet.

5.2.1.1 Zellzahl, Verhältnis von Ziel- zu Effektor-Zellen, Inkubationszeiten

Innerhalb erster Etablierungs-Versuche wurde die Zellzahl, das Verhältnis von Ziel- zu Effektor- Zellen, die Zeit der Oberflächen-Anhaftung an die Zellkultur-Platten und die Zeit nach der die Zellüberstände abgenommen wurden variiert. In Abb.14 wurden exemplarisch die Ergebnisse von drei verschiedenen Versuchsbedingungen dargestellt.

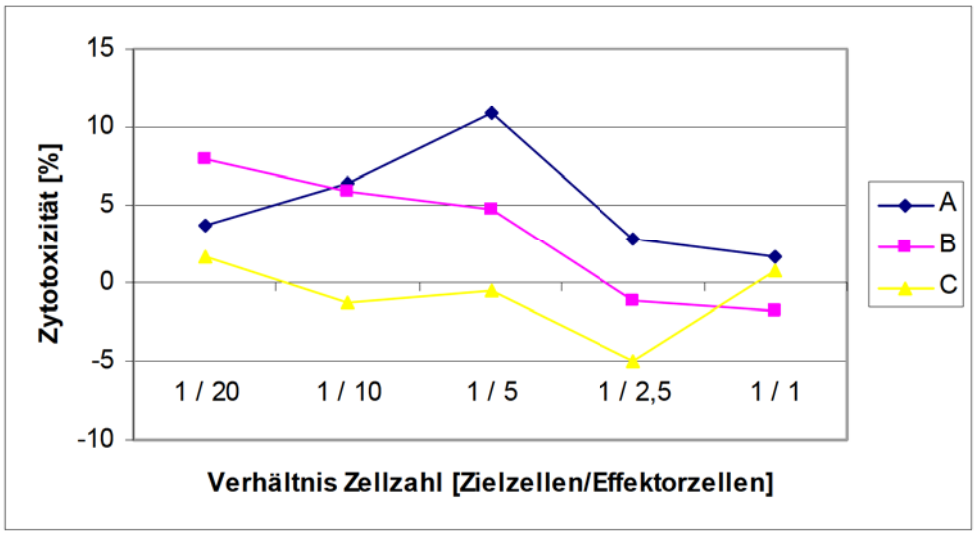

Abbildung 14: Etablierung der Versuchsbedingungen
Die ermittelte Zytotoxizität in % wurde gegen das Verhältnis von Ziel- zu Effektor- Zellen bei unterschiedlichen Versuchsbedingungen dargestellt. Bei allen drei Versuchsbedingungen (A, B und C) wurden die Effektor- Zellen 20 Std. nach den Ziel- Zellen in die 96-Well-Platte gegeben. Bei A und B wurden 10.000 bei C wurden 5.000 Ziel- Zellen pro Well eingesetzt. Bei A wurde der Überstand 20 Std. nach Zugabe der Effektor- Zellen für die Messung abgenommen, bei B und C bereits nach vier Std. Für diese Etablierungsversuche wurde als Ziel-Zelllinie die NB-Zelllinie SKN-SY5Y, als Effektor- Zellen wurde die NK-Zelllinie NK-92 verwendet. In diesen Graphen wurden die Mittelwerte der Zytotoxizität eingetragen, die jeweils aus mehreren Wiederholungs-Versuchen ermittelt wurden.

In weiteren Etablierungs-Versuchen wurde der Zeitpunkt der Zugabe der Effektor- Zellen zu den Ziel- Zellen variiert. Außerdem wurden das Verhältnis von Ziel- zu Effektor- Zellen zusätzlich zu den in Abb.14 angegebenen Verhältnissen verändert. Innerhalb dieser Versuche fiel die errechnete Zytotoxizität jedoch noch geringer ausfiel als unter den in Abb.14 dargestellten Bedingungen. Für alle weiteren Versuche wurden die Effektor- Zellen 20 Std. nach den Ziel- Zellen in die 96-Well-Platten gegeben, so dass sich die Ziel- Zellen erst einmal an den Untergrund anheften konnten. Der Überstand wurde 20 Std. nach Zugabe der Effektor-Zellen abgenommen und eine Ziel- Zellzahl von 10.000 gewählt (Abb.14, Versuchsbedingungen A). Für weitere Etablierungs-Versuche wurde das Verhältnis von Ziel- zu Effektor- Zellen von 1/5 und 1/10 gewählt. Bei den Versuchen mit Patienten-IgG wurde ein Verhältnis von Ziel- zu Effektor-Zellen von 1/5 eingesetzt, da die Menge des zur Verfügung stehenden IgG aus den Seren der meist kleinen Kindern sehr begrenzt ist.

5.2.1.2 Wahl der Zellen

Da die zunächst verwendete Zelllinie SKN-SY5Y eine Mykoplasmen-Kontamination aufwies, wurde die NB-Zelllinie Kelly für diese Versuche getestet.

Wie aus Abb.15 deutlich wird, war die durch NK-Zellen ausgelöste Lyse mit der mykoplasmenfreien NB-Zelllinie Kelly sehr gut messbar. Es konnte sogar eine wesentlich höhere Zytotoxizität bei diesen Zellen im Vergleich zur Zelllinie SKN-SY5Y ermittelt werden. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Versuche die NB-Zelllinie Kelly statt der NB-Zelllinie SKN-SY5Y verwendet.

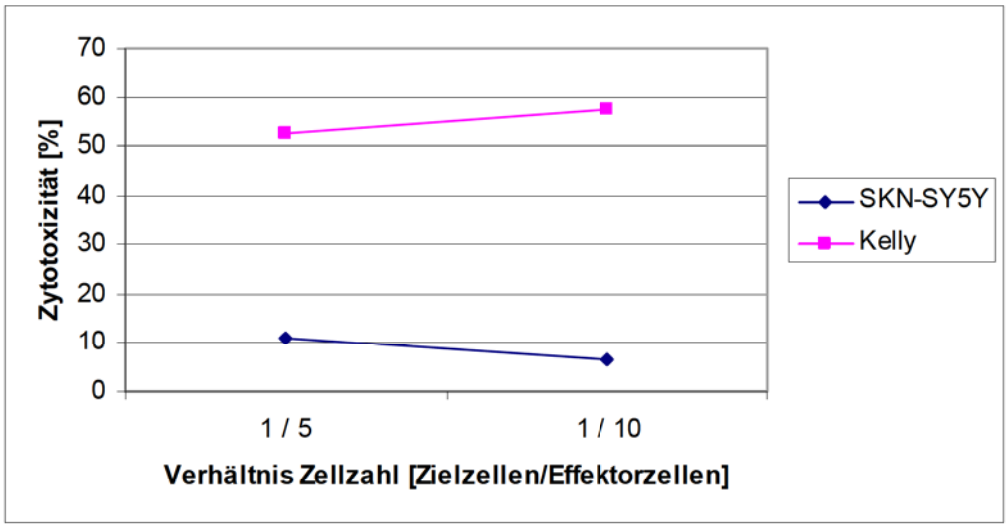

Abbildung 15: Vergleich zweier Ziel- Zellinien

In dieser Abbildung wurde die durch NK-Zellen ausgelöste Zytotoxizität zweier Ziel-Zelllinien verglichen. Dargestellt wurde die ermittelte Zytotoxizität in % gegen das Verhältnis von Ziel- zu Effektor-Zellen. Es wurden 10^4 Ziel-Zellen pro Well eingesetzt, die Effektor- Zellen wurden nach 20 Std. zugegeben und die Überstände wurden nach weiteren 20 Std. abgenommen. Als Effektor- Zellen wurde die NK-Zelllinie NK-92 verwendet. Als Ziel- Zelllinie wurde die NB-Zelllinie SKN-SY5Y (blau) bzw. die NB-Zelllinie Kelly (rosa) verwendet. Die genaue Durchführung des LDH-Assay´s ist unter 4.3.5 beschrieben.

Es ist bekannt, dass die NK-Zelllinie NK-92 nicht den Rezeptor CD16 auf ihrer Oberfläche exprimiert. Die AK-vermittelte Lyse durch NK-Zellen wird u.a. durch CD16 induziert. Die Expression von CD16 durch die Zelllinie NK-92 wurde durchflusszytometrisch überprüft und konnte bestätigt werden. Die Aufgabenstellung in dieser Arbeit war den Effekt von Patienten-IgG auf die NK-Zell vermittelte Lyse zu überprüfen. Deshalb konnte die Zelllinie NK-92 nicht für die Versuche mit Patienten-IgG eingesetzt werden. In einigen Veröffentlichungen wurden für ähnliche Versuche frisch isolierte NK-Zellen von gesunden Spendern verwendet (Armeanu 2005, Liang 2005, Ross 1997). Deshalb wurden in dieser Arbeit NK-Zellen mit Hilfe des RosetteSep® -Kit´s „Human NK Cell Enrichment Cocktail“ der Firma StemCell Technologies aus Vollblut isoliert. Mit dem Durchflusszytometer wurde die Reinheit des Isolats und die Anwesenheit des CD16-Rezeptors auf der Oberfläche der NK-Zellen überprüft. Auf 25-30% der isolierten Zellen wurde der NK-Zell-Marker CD 56 detektiert und 60-65% waren CD 16 positiv (Abb.16).

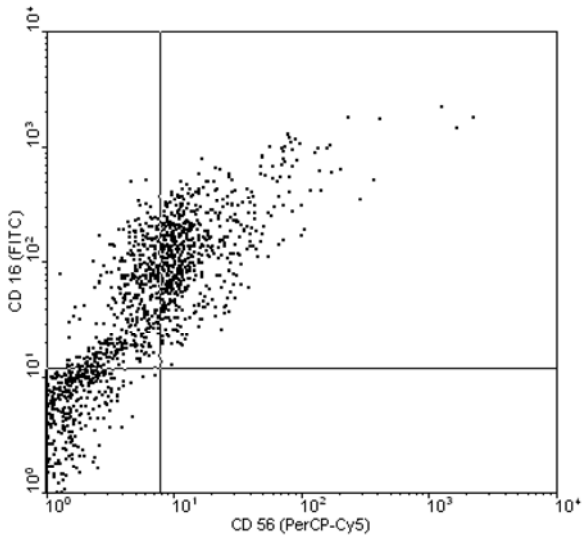

Abbildung 16: FACS-Analyse der Reinheit des NK-Zell-Isolates

Die isolierten NK-Zellen wurden mit einem AK gegen CD 56 (mouse anti-human CD 56), anschließend mit einem gegen den ersten AK gerichteten AK (rabbit anti-mouse IgG, FITC-konjugiert) und zum Schluss mit einem PerCP-Cy5 markierten AK gegen CD 16 inkubiert (mouse anti-human CD 16, PerCP-Cy5-konjugiert). Um die Quadranten festzulegen wurden mitgeführte Isotyp-Kontrollen verwendet (mouse IgG2bκ -Isotyp-Kontrolle, PerCP-Cy5-konjugiert; mouse Isotyp-Kontrolle + rabbit anti-mouse IgG, FITC-konjugiert). In dieser Abbildung ist die gemessene FITC-Fluoreszenz dieser Probe gegen die PerCP-Cy5-Fluoreszenz dargestellt.

Der Effektes von AK auf die NK-Zell-vermittelte Lyse wurde mit NK-Zellen der Zelllinie NK-92 und mit den aus Vollblut eines gesunden Spenders isolierten NK-Zellen gezeigt und die Effekte wurden untereinander verglichen. Dabei wurde deutlich, dass die Lyse mit aus Blut isolierten NK-Zellen durch die Anwesenheit an die Ziel-Zellen bindender ch14.18-AK deutlicher verstärkt wird als mit der NK-Zelllinie NK-92 (Abb.17). Aus diesem Grund wurden die frisch isolierten NK-Zellen für die folgenden Versuche verwendet.

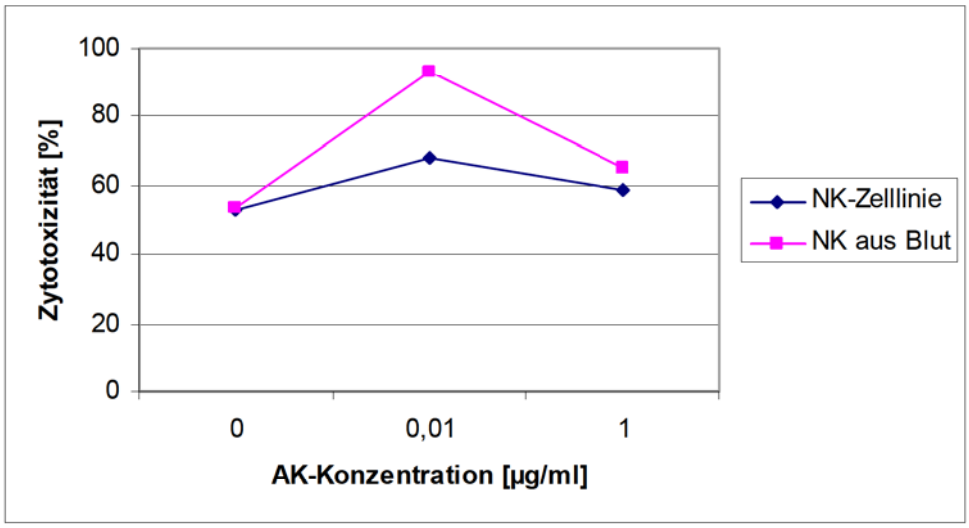

Abbildung 17: Vergleich unterschiedlicher Effektor-Zellen

Um den Effekt von AK auf die NK-Zell vermittelte Lyse optimal zeigen zu können, wurde die Effektivität der bereits zur Etablierung verwendeten NK-Zelllinie NK-92 (blau) mit der aus Vollblut eines gesunden Spenders isolierten NK-Zellen verglichen

Dargestellt wurde die ermittelte Zytotoxizität in % gegen die Konzentration des Antikörpers ch14.18. Es wurden 10.000 Ziel- Zellen pro Well eingesetzt, das Verhältnis von Ziel- zu Effektor- Zellen betrug 1:5, die Effektor-Zellen wurden 20 Std. nach den Ziel- Zellen in die 96-Well-Platte gegeben und die Überstände wurden 20 Std. nach Zugabe der Effektor- Zellen abgenommen. Als Ziel- Zelllinie wurde die NB-Zelllinie Kelly und als Effektor- Zellen wurden Zellen der NK-Zelllinie NK-92 bzw. frisch aus dem Blut eines gesunden Spenders isolierte NK-Zellen verwendet.

5.2.1.3 IgG-Konzentration

Mit dem AK ch14.18 konnten bereits Zeng et al. zeigen, dass AK die Lyse von NB-Zellen durch NK-Zellen verstärken können (Zeng 2005). Derselbe AK wurde zur Ermittlung der IgG-Konzentration verwendet, mit der die Lyse am intensivsten verstärkt wird.

Es wurde festgestellt, dass eine geringe IgG-Konzentration von nur 0,01µg/ml einen stärkeren Effekt auf die Lyse hat als höhere IgG-Konzentrationen (Abb.18). Vermutlich hat überschüssiges, nicht gebundenes IgG unspezifisch an die Oberfläche der NK-Zellen gebunden, wodurch deren Aktivität herabgesetzt wurde. Deshalb wurde in den folgenden Versuchen auch nur eine geringe Gesamt-IgG-Konzentration von 0,2µg/ml eingesetzt.

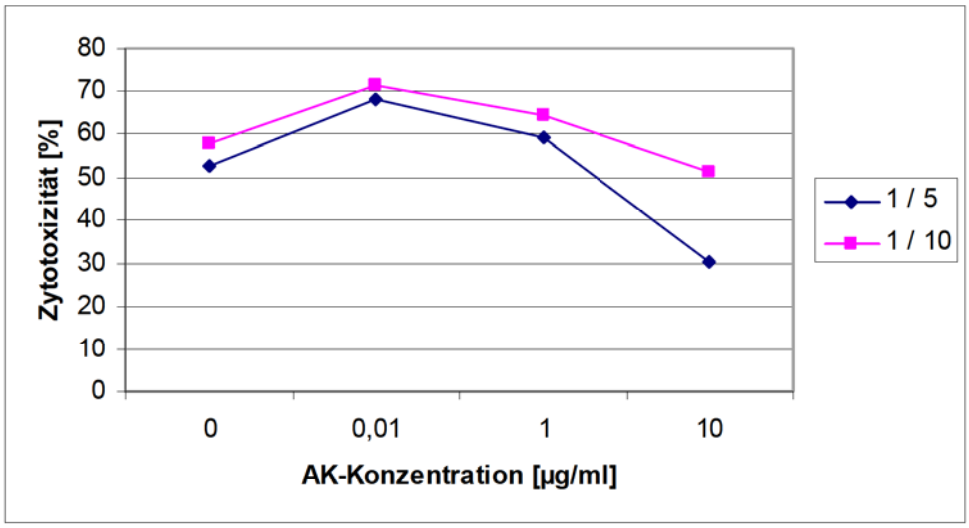

Abbildung 18: Bestimmung der zur Verstärkung der Lyse geeignetsten IgG-Konzentration
Um den Effekt der an NB-Zellen bindenden AK auf die NK-Zell vermittelte Lyse optimal zeigen zu können, wurde die AK-Konzentration mit dem AK ch14.18 bestimmt.
Dargestellt wurde die ermittelte Zytotoxizität in % gegen die Konzentration des Antikörpers ch14.18. Es wurden 10.000 Ziel- Zellen pro Well eingesetzt, die Effektor- Zellen wurden 20 Std. nach den Ziel- Zellen in die 96-Well-Platte gegeben und die Überstände wurden 20 Std. nach Zugabe der Effektor- Zellen abgenommen. Hier wurden die Ergebnisse der Versuche mit einem Verhältnis von Ziel- zu Effektor- Zellen von 1/5 (blau) und von 1/10 (rosa) dargestellt. Als Ziel- Zellen wurde die NB-Zelllinie Kelly und als Effektor- Zellen wurde die NK-Zelllinie NK-92 verwendet.

5.2.1.4 Bestimmung der Oberflächen-Bindung von Patienten-IgG an NB-Zellen

Um die IgG Oberflächenbindung an NB-Zellen des IgGs der OMS-Patienten wie auch der Kontrollen in einem Vorversuch zu zeigen, wurden durchflusszytometrische Versuche durchgeführt. Zellen der NB-Zelllinie Kelly wurden mit Patienten-Seren inkubiert und die gebundenen AK gegen Oberflächenepitope der NB-Zellen wurden mit einem FITC-markierten Zweit-AK rabbit anti-human IgG detektiert.
Seren von OMS-Patienten zeigten häufiger eine Bindung an die Zelloberfläche von NB-Zellen als Seren gesunder Kontroll-Patienten (Abb.19, $p < 0{,}001$, T-Test).

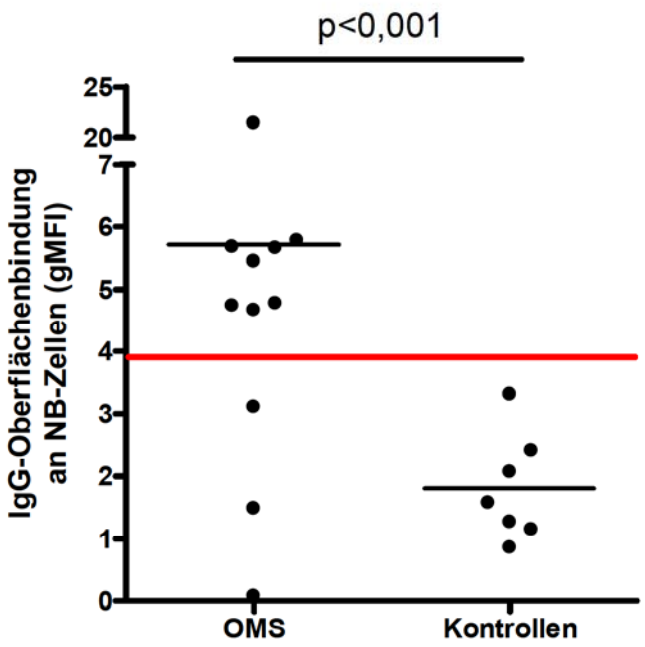

Abbildung 19: Bestimmung der IgG Oberflächen-Bindung an NB-Zellen

10^4 Zellen der NB-Zelllinie Kelly wurden mit Patienten-Seren (Verdünnung 1:50) inkubiert und die gebundenen AK wurden mit einem fluoreszenzmarkierten Zweit-AK (rabbit anti-human IgG FITC von DAKO, Verdünnung 1:75) detektiert. Für die FACS-Messung wurden Seren von OMS-Patienten (OMS) und gesunden Kontroll-Patienten (Kontrollen) verwendet. Die gemessenen IgG-Mengen der gesunden Kontroll-Patienten und der OMS-Patienten waren signifikant unterschiedlich ($p<0,001$). Der Cut-off (rote Linie) lag bei einem gMFI-Wert von 3,94.

gMFI = geometrisch gemittelte Fluoreszenzintensität; Cut-off = Mittelwert der Kontrollen + (2,5 x Standardabweichung der Kontrollen)

Aus den Seren, die bereits für die durchflusszytometrische Untersuchung verwendet wurden, wurde das Gesamt-IgG aufgereinigt und in PBS umgepuffert. Das aufgereinigte IgG wurde dann für die Versuche zur Bestimmung der Effekte von IgG auf die NK-Zell vermittelte Lyse von NB-Zellen verwendet.

5.2.2 IgG-Effekte auf die NK-Zell vermittelte Lyse von NB-Zellen

5.2.2.1 LDH-Assay

Für die Messung unterschiedlich starker Effekte von IgG verschiedener Patienten auf die NK-Zell vermittelte Lyse von NB-Zellen wurde 0,2µg/ml Gesamt-IgG zusammen mit den Effektor-Zellen zu den Ziel-Zellen gegeben. Vorher wurden 10^4 Ziel-Zellen pro Well 20 Std. in den 96-Well Platten kultiviert. Aus Kostengründen wurde ein Verhältnis von Ziel- zu Effektor- Zellen von 1:5 gewählt, ein Verhältnis von 1:10 wäre ebenfalls empfehlenswert gewesen. 20 Std. nach Zugabe der Effektor- Zellen und des IgG´s wurden die Zell-Überstände abgenommen und die Aktivität der LDH gemessen. Anhand der Mess-Ergebnisse wurde später die Zytotoxizität errechnet. Als Ziel- Zellen wurde die NB-Zelllinie Kelly verwendet und als Effektor- Zellen wurden frisch aus dem Vollblut eines gesunden Spenders isolierte NK-Zellen eingesetzt. Es wurde IgG von 11 verschiedenen OMS-Patienten und von sieben verschiedenen gesunden Kontroll-Patienten eingesetzt. Der Versuch wurde einmal wiederholt und bei jedem Versuch wurden Doppelansätze durchgeführt.

Nach Inkubation mit IgG von OMS-Patienten wurde eine signifikant erhöhte NK-Zell-vermittelte Lyse von NB-Zellen gemessen und mit dem Effekt des IgG gesunder Kontroll-Patienten verglichen (Abb.20, $p < 0{,}005$).

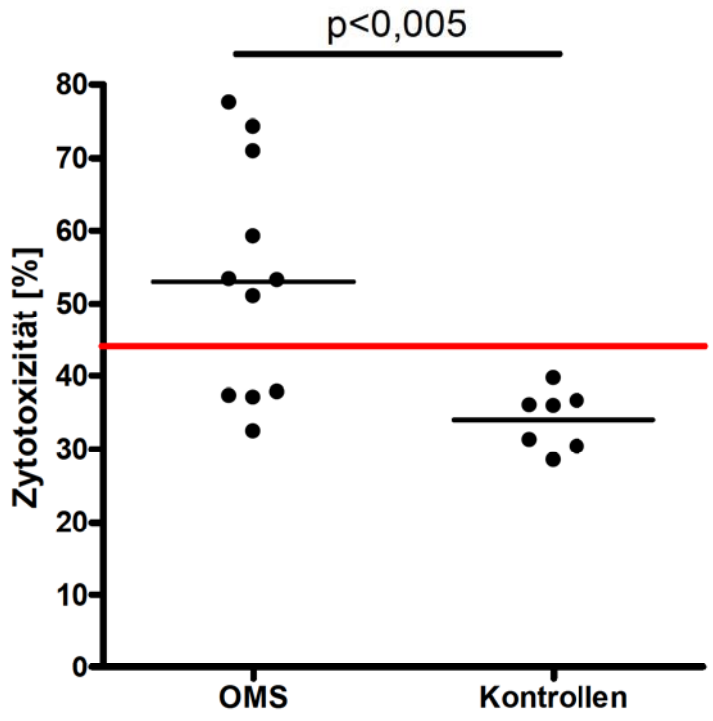

Abbildung 20: Bestimmung der Zytotoxizität der NB-Zellen nach Inkubation mit IgG
In dieser Grafik wurden die gemittelte, gemessene Zytotoxizität in % nach Inkubation mit 0,2µg/ml Gesamt-IgG verschiedener OMS-Patienten und gesunder Kontroll-Patienten dargestellt. Der Cut-off (rote Linie) lag bei einer Zytotoxizität von 44,15%. p<0.005

5.2.3 Zusammenfassung

Während der Etablierung der Versuchsbedingungen zeigte sich, dass die Anzahl der Ziel-Zellen, das Verhältnis von Ziel- zu Effektor-Zellen, und die Inkubationszeit, nach der die Zell-Überstände abgenommen wurden, die Messung der Zytotoxizität beeinflussen. Außerdem wurde festgestellt, dass es günstig ist die Ziel-Zellen vor dem eigentlichen Versuch in den 96-Well-Platten zu kultivieren, damit sie sich bei Versuchsbeginn bereits an der Zellkultur-Platten-Oberfläche angeheftet hatten. Auch die Wahl der Ziel- und der Effektor-Zellen spielte bei der erfolgreichen Durchführung des Versuches eine entscheidende Rolle. Die ideale IgG-Konzentration zur Messung des Effektes von IgG auf die Lyse von NB-Zellen durch NK-Zellen wurde ebenfalls bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass zu hohe IgG-Konzentrationen den zytotoxischen Effekt der NK-Zellen vermindern. Dies könnte auf eine

unspezifische Bindung der Antikörper an die Fc-Rezeptoren von NK-Zellen zurückgeführt werden.

Bei der Überprüfung der Zytotoxizität nach Inkubation mit IgG konnte gezeigt werden, dass das Gesamt-IgG von OMS-Patienten verglichen mit dem Gesamt-IgG gesunder Kontroll-Patienten einen stärkeren Effekt auf die Lyse von NB-Zellen durch NK-Zellen hat.

Eine Korrelation der Oberflächenbindung des IgGs von OMS-Patienten an NB-Zellen mit der prozentualen Zytotoxizität konnte nicht festgestellt werden (Tab.15, Abb.21, r^2 = 0,1668, Lineare Regression).

OMS-Patient	IgG Oberflächenbindung an NB-Zellen [gMFI]	Zytotoxizität [%]
1	21,42	74,23
2	5,78	32,41
3	5,68	59,19
4	5,66	53,28
5	5,45	37,79
6	4,78	70,89
7	4,74	77,49
8	4,67	37,04
9	3,11	37,26
10	1,49	53,38
11	0,08	51,06

Tabelle 15: Gegenüberstellung der IgG-Oberflächenbindung an NB-Zellen und der Zytotoxizität nach Inkubation mit Gesamt-IgG

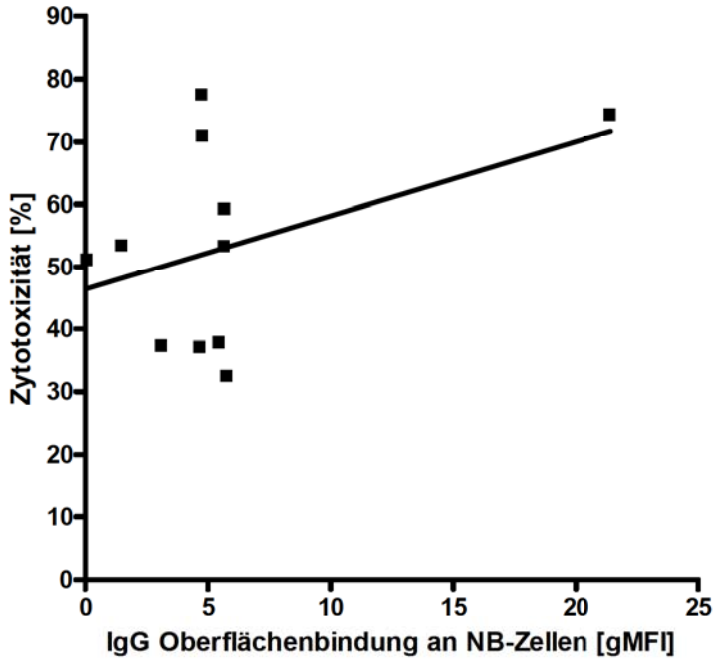

Abbildung 21: Korrelation der Zytotoxizität mit der Oberflächenbindung an NB-Zellen

Die nach IgG-Stimulation ermittelte Zytotoxizität wurde gegen die Oberflächenbindung des IgG derselben Patienten an NB-Zellen aufgetragen. $r^2 = 0{,}1668$; p = nicht signifikant.

5.3 Die B-Zell aktivierenden Faktoren BAFF und APRIL in Serum und Liquor von OMS-Patienten

Kürzlich konnte für OMS-Patienten eine relative Vermehrung von B-Zellen im Liquor gezeigt werden. Dieser erhöhte B-Zell-Anteil korrelierte mit dem Schweregrad der neurologischen Störungen von OMS-Patienten (Pranzatelli 2004). BAFF und APRIL sind Proteine, die an der B-Zell Entwicklung beteiligt sind und für das Überleben von B-Zellen ssentiell sind. Es deutet viel darauf hin, dass besonders BAFF, aber auch APRIL, an der Entwicklung von Autoimmunität beteiligt sind. Wie bereits erwähnt gibt es viele Hinweise darauf, dass OMS eine immun-vermittelte Erkrankung ist. Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit die BAFF- und APRIL- Konzentration in Serum und Liquor von OMS-Patienten mit der von verschiedenen Kontroll-Gruppen verglichen werden. Dazu wurde die Konzentration beider Proteine mittels ELISA bestimmt. Die Ergebnisse der OMS-Patienten wurden mit denen der Kontroll-Gruppen und mit klinischen Daten verglichen. Des Weiteren wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der BAFF-Konzentration im Liquor und der Menge an Auto-AK besteht. Die Integrität der Blut-Hirn Schranke wurde anhand des Verhältnisses der Albumin-Konzentration von Liquor und Serum ermittelt, da eine Störung der Blut-Hirn Schranke die Menge an BAFF im Liquor beeinflussen könnte.

5.3.1 BAFF-Konzentrationen im Serum und im Liquor von Patienten

5.3.1.1 BAFF-Konzentrations Bestimmung

Für die Bestimmung der BAFF-Konzentration wurde das ELISA-Kit „Quantikine® Human BAFF/BLyS“ der Firma R & D Systems verwendet (4.2.7.1). Die Messung wurde mit dem ELISA-Reader BEP 2000 Advance bei einer Wellenlänge von 450nm (Referenzwellenlänge 650 nm) durchgeführt. Von jeder Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt, die OD-Werte wurden gemittelt und die Konzentration mit Hilfe einer Verdünnungsreihe des im Kit mitgeliefertem BAFF Standard (BAFF-Konzentration bekannt) berechnet. Die

Verdünnungsreihe des BAFF-Standards wurde für jede Messung neu angesetzt und ebenfalls als Doppelbestimmung mitgemessen (Abb.22).

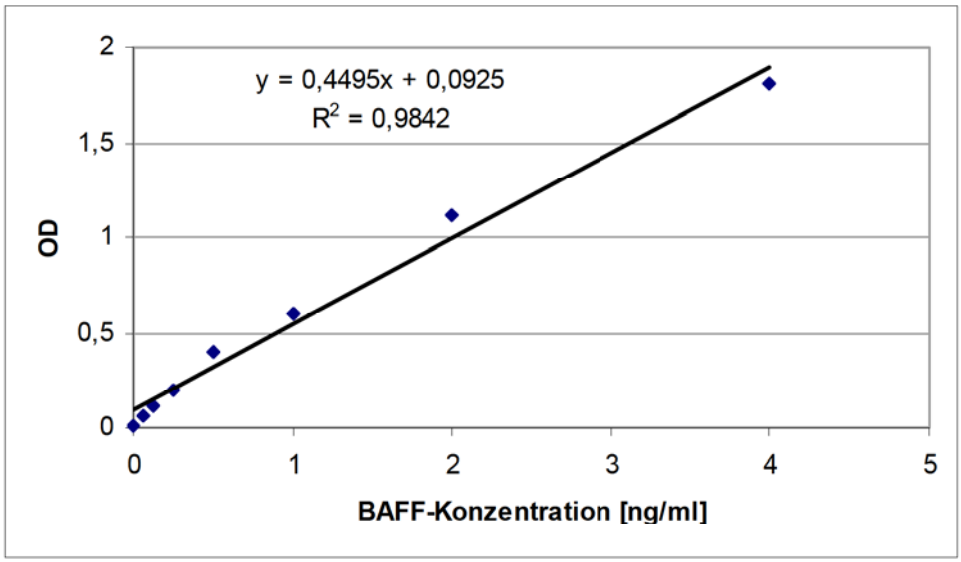

Abbildung 22: BAFF-Standard Verdünnungsreihe

Der im Kit mitgelieferte BAFF-Standard wurde nach Angaben des Herstellers verdünnt und als Doppelbestimmung bei jeder Messung mitgemessen. Die Konzentration des BAFF-Standards war bekannt. Exemplarisch wurde in dieser Grafik die gemessene optische Dichte (OD) der einzelnen, gemittelten Werte einer BAFF-Standard Verdünnungreihe gegen die bekannte BAFF-Konzentration in ng/ml aufgetragen und eine Ausgleichsgerade berechnet, anhand derer die BAFF-Konzentration einzelner Proben bestimmt werden konnte.

Mit Hilfe der Formel (gemessene OD – Faktor (in Abb.22: 0,0925)) / Steigung der Ausgleichsgeraden (in Abb.22: 0,4495)) wurde die BAFF-Konzentration der verschiedenen Proben ermittelt. Wenn die Proben verdünnt eingesetzt worden waren, wurde die Verdünnung bei der Berechnung der Konzentration berücksichtigt.

5.3.1.2 BAFF-Serumkonzentration

Es wurden Seren von 17 OMS-Patienten (8 mit und 9 ohne NB), 16 NB-Patienten ohne OMS, 13 gesunde Kontroll-Patienten (GK) und 12 Patienten mit entzündlichen, neurologischen Erkrankungen (ENE) untersucht. Die Seren wurden in einer Verdünnung von 1:2 in den ELISA eingesetzt.

Die Konzentration von BAFF war bei Patienten mit entzündlichen, neurologischen Erkrankungen (ENE) im Serum deutlich erhöht, aber nicht bei OMS-Patienten und anderen Kontroll-Patienten (OMS 0,84 ± 0,63 ng/ml; NB 0,84 ± 0,32 ng/ml; GK 1,18 ± 0,52 ng/ml; ENE 1,46 ± 0,70 ng/ml; $p<0,05$, Abb.23). Ein signifikanter Unterschied zwischen OMS und OMS-NB konnte nicht festgestellt werden (OMS 0,63 ± 0,15 ng/ml, OMS-NB 1,03 ± 0,79 ng/ml, n.sign.).

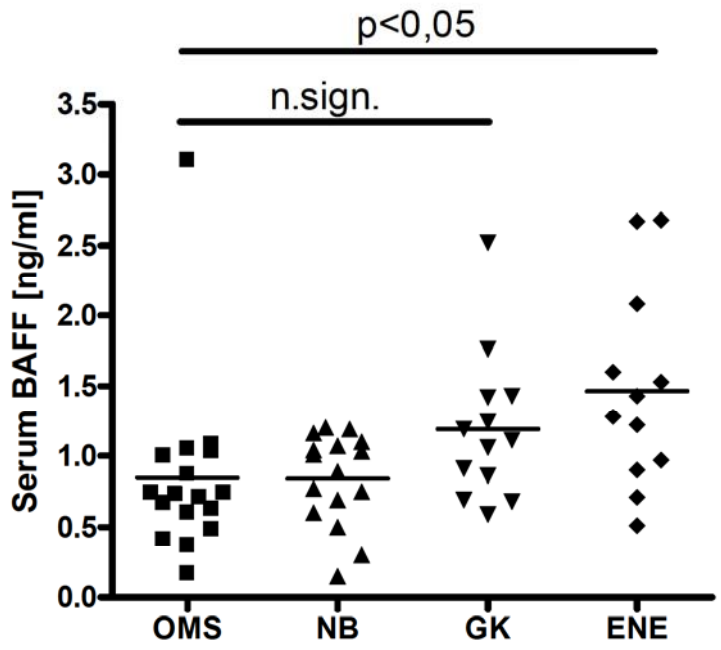

Abbildung 23: BAFF-Konzentration in Patientenseren

Die BAFF-Konzentrationen in den Seren der verschiedenen Patienten-Gruppen wurde mittels ELISA bestimmt. Die Seren wurden in einer Verdünnung von 1:2 in den ELISA eingesetzt, was bei der Konzentrations-Berechnung berücksichtigt wurde. Von jedem Serum wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt und von den Werten wurde der Mittelwert bestimmt. Durchführung siehe 4.2.7.1.

OMS = Patienten mit einem Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom; NB = Patienten mit NB aber ohne OMS; GK = gesunde Kontroll-Patienten; ENE = Patienten mit entzündlicher neurologischer Erkrankung; n.sign. = nicht signifikant

5.3.1.3 BAFF-Liquorkonzentration

Es wurde insgesamt Liquor von 10 OMS-Patienten (sechs mit und vier ohne NB), 13 gesunden Kontroll-Patienten (GK) und 11 Patienten mit entzündlichen, neurologischen

Erkrankungen (ENE) untersucht. Liquor von NB-Patienten lag nicht vor, weil bei Patienten mit einem NB keine Lumbalpunktion bei der Routine-Diagnostik durchgeführt wird. Der Liquor wurde unverdünnt in den ELISA eingesetzt.

Die BAFF-Konzentration im Liquor von ENE-Patienten war signifikant höher als bei den Kontroll-Patienten (GK 0,09 ± 0,08 ng/ml, ENE 0,88 ± 0,71 ng/ml, p<0,01, ANOVA-Test Abb.24). Bei OMS-Patienten war die BAFF-Konzentration im Liquor im Durchschnitt zwar leicht erhöht im Vergleich zu den Kontrollen, der Unterschied war aber nicht signifikant (OMS 0,36 ± 0,35 ng/ml; GK 0,09 ± 0,08 ng/ml, Abb.24)

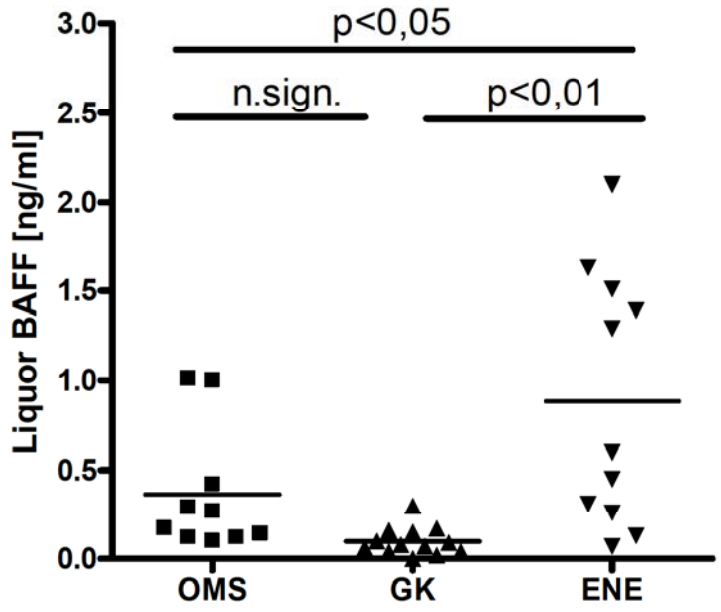

Abbildung 24: BAFF-Konzentrationen im Liquor von Patienten
Die BAFF-Konzentration im Liquor der verschiedenen Patienten-Gruppen wurde mittels ELISA bestimmt. Der Liquor wurde unverdünnt in die Messung eingesetzt. Von jeder Liquor-Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt und der Mittelwert errechnet. Durchführung siehe 4.2.7.1.
OMS = Patienten mit einem Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom; GK = gesunde Kontroll-Patienten; ENE = Patienten mit entzündlicher, neurologischer Erkrankung; n.sign. = nicht signifikant

5.3.1.4 BAFF- Liquor/Serum Ratio und Integrität der Blut-Hirn Schranke

Die Konzentration von BAFF im Liquor kann durch die Menge an BAFF im Serum und durch Störungen der Blut-Hirn Schranke beeinflusst werden. Deshalb wurde das Verhältnis

der Konzentration von BAFF in Liquor und Serum (Abb.25) und das Verhältnis der Albumin-Konzentration in Liquor und Serum (Abb.26) für jeden Patienten und jede Kontrolle bestimmt.

Die BAFF-Liquor/Serum Ratio bei OMS- und ENE-Patienten war signifikant erhöht verglichen mit denen gesunder Kontrollpatienten (OMS 0,45 ± 0,36 vs. ENE 0,59 ± 0,45 vs. GK 0,08 ± 0,06, p<0,01, ANOVA-Test, Abb.25).

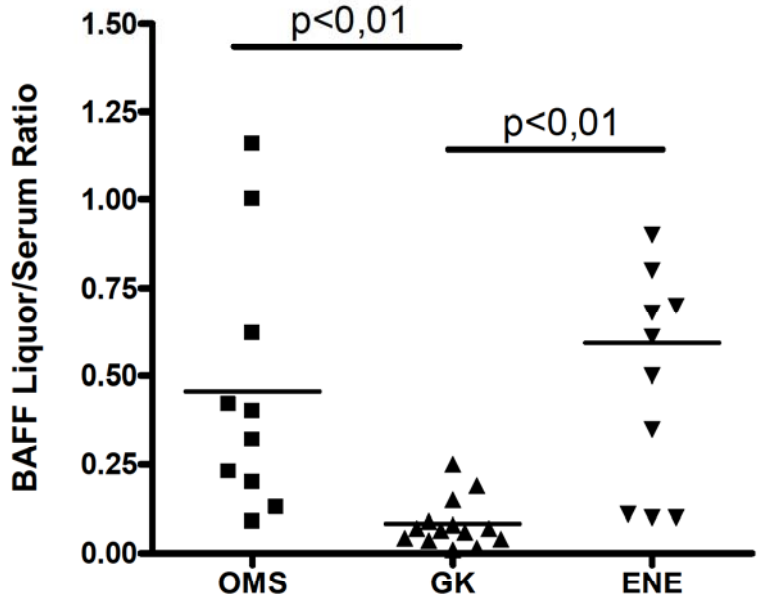

Abbildung 25: Vergleich der BAFF Liquor/Serum Ratio
Die BAFF-Konzentration im Liquor wurde durch die im Serum des gleichen Patienten geteilt, um den Einfluss der BAFF-Serum Konzentration auf die BAFF-Konzentration im Liquor zu eliminieren.
OMS = Patienten mit einem Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom; GK = gesunde Kontroll-Patienten; ENE = Patienten mit entzündlicher, neurologischer Erkrankung

Die Albumin Liquor/Serum Ratio ist ein etablierter Marker für die Integrität der Blut-Hirn Schranke. Bei ENE-Patienten wurde eine signifikante Erhöhung der Albumin Liquor/Serum Ratio gemessen (ENE 8,0 ± 4,1; GK 3,0 ± 2,2, p<0,01, ANOVA-Test, Abb.26), bei diesen Patienten liegt eine Störung der Blut-Hirn Schranke vor. Bei OMS-Patienten war die Albumin Liquor/Serum Ratio nicht erhöht verglichen mit der gesunder Kontroll-Patienten (OMS 3,1 ± 1,1; GK 3,0 ± 2,2, p<0,01, ANOVA-Test, Abb.26).

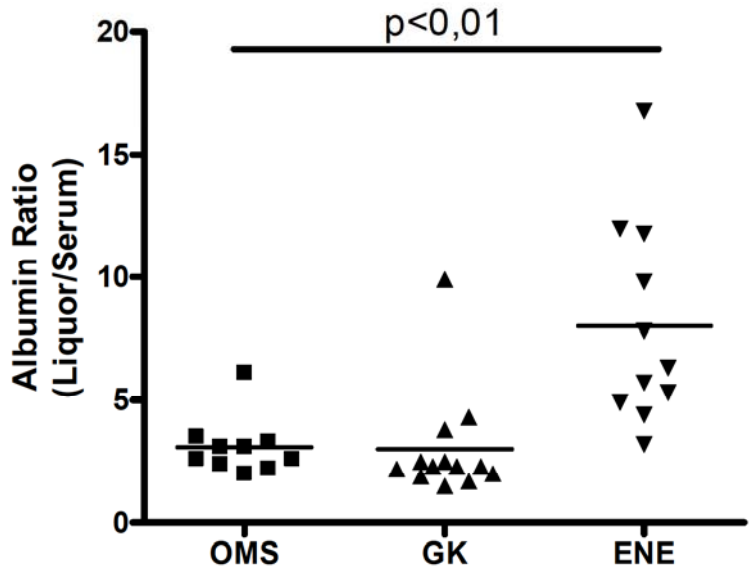

Abbildung 26: Vergleich der Albumin Liquor/Serum Ratio
Die Albumin-Konzentration im Liquor wurde durch die im Serum des gleichen Patienten geteilt. Die Albumin-Konzentrations-Bestimmung wurde nephelometrisch ermittelt (Durchführung siehe 4.2.6.1).
OMS = Patienten mit einem Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom; GK = gesunde Kontroll-Patienten; ENE = Patienten mit entzündlicher, neurologischer Erkrankung

Zusammenfassend legten diese Ergebnisse nahe, dass beim OMS eine intrathekale BAFF-Synthese der Grund für die erhöhte BAFF-Konzentration im Liquor war. Die Erhöhung der BAFF-Konzentration im Liquor von ENE-Patienten ist dagegen das Resultat einer Störung der Blut-Hirn Schranke.

5.3.1.5 Korrelation zwischen BAFF und Auto-AK

In einer früheren Studie konnten Auto-AK gegen die Oberfläche von CGNs im Serum von OMS-Patienten nachgewiesen werden (Blaes 2005). Jetzt wurden diese Bindungen auch im Liquor gemessen und mit der in dieser Arbeit ermittelten BAFF Liquor/Serum Ratio verglichen.

Es konnte eine Korrelation zwischen der Menge an Auto-AK und der BAFF Liquor/Serum Ratio gezeigt werden (r^2=0,63, p<0,01, Abb.27).

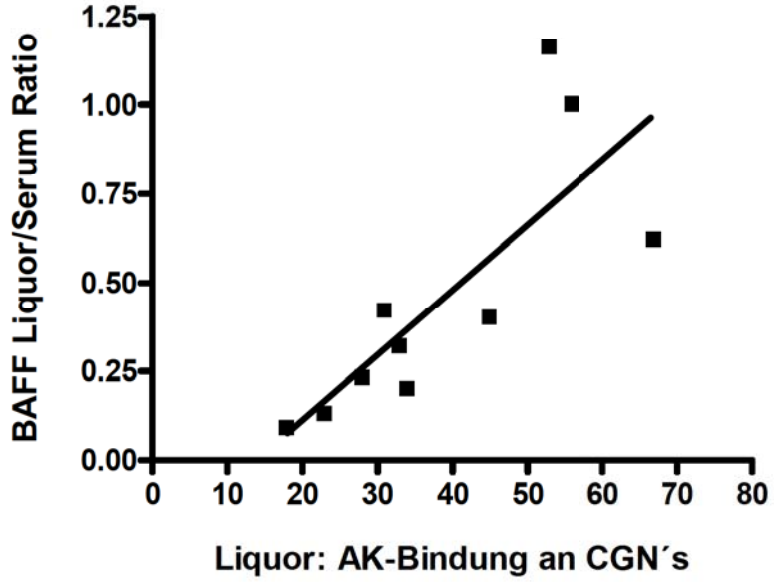

Abbildung 27: Korrelation der BAFF Liquor/Serum Ratio mit der Menge an Auto-AK
Die in einer früheren Arbeit mittels Durchflusszytometrie ermittelten Mengen an Auto-AK wurden gegen die BAFF Liquor/Serum Ratio aufgetragen und eine Ausgleichsgerade berechnet.
mfi = mittlere Fluoreszenz-Intensität; r^2=0,63, p<0,01 (ermittelt durch Lineare Regression)

5.3.2 APRIL-Konzentration im Serum und Liquor von Patienten

5.3.2.1 APRIL-Konzentrations Bestimmung

Für die Bestimmung der APRIL-Konzentration wurde das ELISA-Kit „human APRIL ELISA BMS2008“ der Firma Bender MedSystems® verwendet (4.2.7). Die Messung wurde mit dem ELISA-Reader BEP 2000 Advance bei einer Wellenlänge von 450nm (Referenzwellenlänge 650nm) durchgeführt. Von jeder Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt, die OD-Werte gemittelt und die Konzentration mit Hilfe einer Verdünnungsreihe des im Kit mitgelieferten APRIL-Standards (APRIL-Konzentration bekannt) ausgerechnet. Die APRIL-Standard-Verdünnungsreihe wurde für jede Messung neu angesetzt und ebenfalls als Doppelbestimmung mitgemessen (Abb.28).

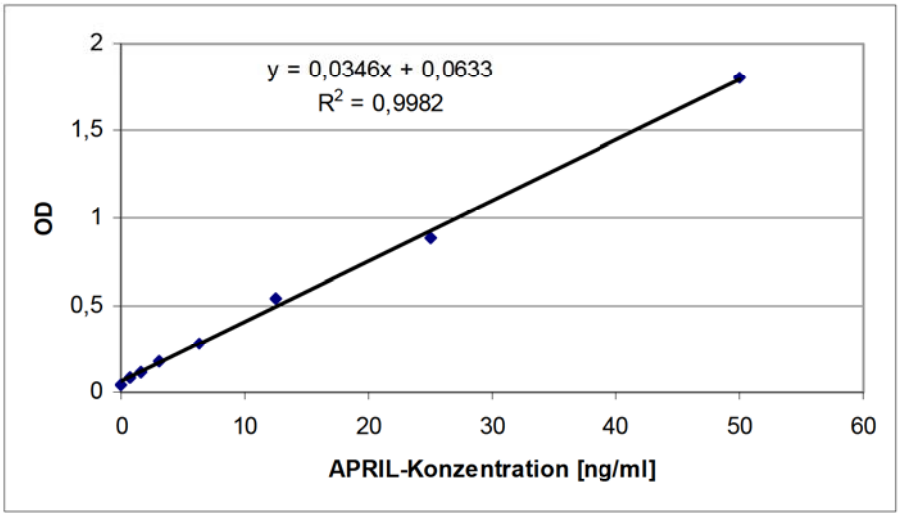

Abbildung 28: APRIL-Standard Verdünnungsreihe
Der im Kit mitgelieferte APRIL-Standard wurde nach Angaben des Herstellers verdünnt und als Doppelbestimmung bei jeder Messung mitgemessen. Die Konzentration des APRIL-Standards war bekannt. Exemplarisch wurde in diesem Graph die gemessene optische Dichte (OD) der einzelnen, gemittelten Werte einer APRIL-Standard-Verdünnungreihe gegen die bekannte APRIL-Konzentration aufgetragen und eine Ausgleichsgerade berechnet anhand derer die APRIL-Konzentration einzelner Proben bestimmt werden konnte.

Mit Hilfe der Formel (gemessene OD – Faktor (in Abb.28 0,0633)) / Steigung der Ausgleichsgeraden (in Abb.28: 0,0346) wurde die APRIL-Konzentration der verschiedenen Proben ermittelt. Wenn die Proben verdünnt worden waren, wurde dies bei der Berechnung der APRIL-Konzentration berücksichtigt.

5.3.2.2 APRIL-Serum Konzentration

Bei denselben Seren, bei denen bereits die BAFF-Konzentration bestimmt wurde, wurde nun die Konzentration von APRIL ermittelt (17 OMS-Seren (acht mit und neun ohne NB), 16 NB-Patienten ohne OMS, 13 gesunden Kontrollen (GK) und 12 Patienten mit entzündlichen, neurologischen Erkrankungen (ENE)). Die Seren wurden genau wie bei der Bestimmung der BAFF-Konzentration in einer Verdünnung von 1:2 eingesetzt.

Ein Unterschied in der APRIL-Konzentration zwischen OMS-Patienten und den Kontroll-Gruppen konnte nicht gezeigt werden (OMS 11,18 ± 12,0 ng/ml; NB 7,39 ± 7,78 ng/ml, GK 16,73 ± 38,89 ng/ml, ENE 13,24 ± 24,08 ng/ml, n.sig., Abb.29). Zwischen OMS und OMS-

NB konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (OMS-NB 14,7 ± 14,3 ng/ml, OMS 8,7 ± 6,9 ng/ml, n.sign.).

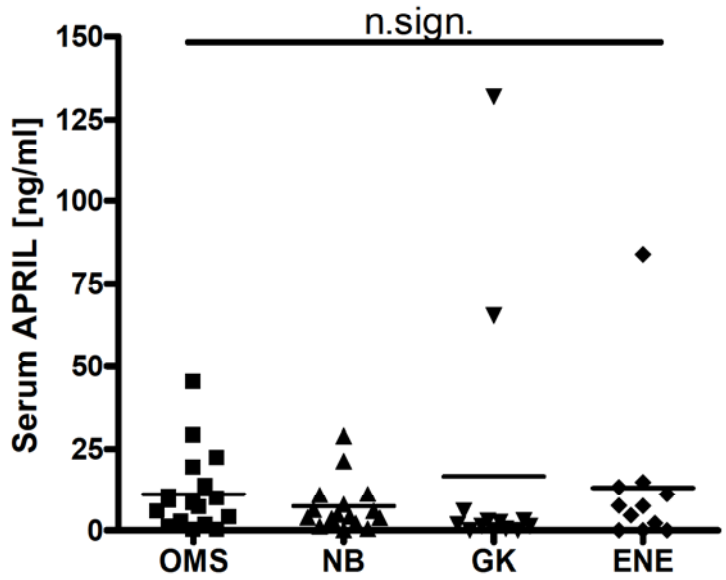

Abbildung 29: APRIL-Konzentrationen in Patientenseren
Die APRIL-Konzentrationen in den Seren der verschiedenen Patienten-Gruppen wurde mittels ELISA bestimmt. Die Seren wurden in einer Verdünnung von 1:2 in den ELISA eingesetzt, was bei der Berechnung der APRIL-Konzentration berücksichtigt wurde.
OMS = Patienten mit einem Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom; NB = Patienten mit NB aber ohne OMS; GK = gesunde Kontroll-Patienten; ENE = Patienten mit entzündlicher, neurologischer Erkrankung; n.sign. = nicht signifikant

5.3.2.3 APRIL-Liquor Konzentration

Es wurde insgesamt Liquor von 10 OMS-Patienten (sechs mit und vier ohne NB), 13 gesunden Kontroll-Patienten (GK) und 11 Patienten mit entzündlichen, neurologischen Erkrankungen (ENE) untersucht. Liquor von NB-Patienten lag nicht vor, weil bei Patienten mit einem NB keine Lumbalpunktion bei der Routine-Diagnostik durchgeführt wurde. Der Liquor wurde unverdünnt eingesetzt.

Es konnte kein Unterschied der APRIL-Konzentration im Liquor zwischen den einzelnen Patienten-Gruppen gemessen werden (OMS 2,38 ± 5,15 ng/ml; GK 0,19 ± 0,43 ng/ml; ENE 1,17 + 2,64 ng/ml, n. sign. Abb.30).

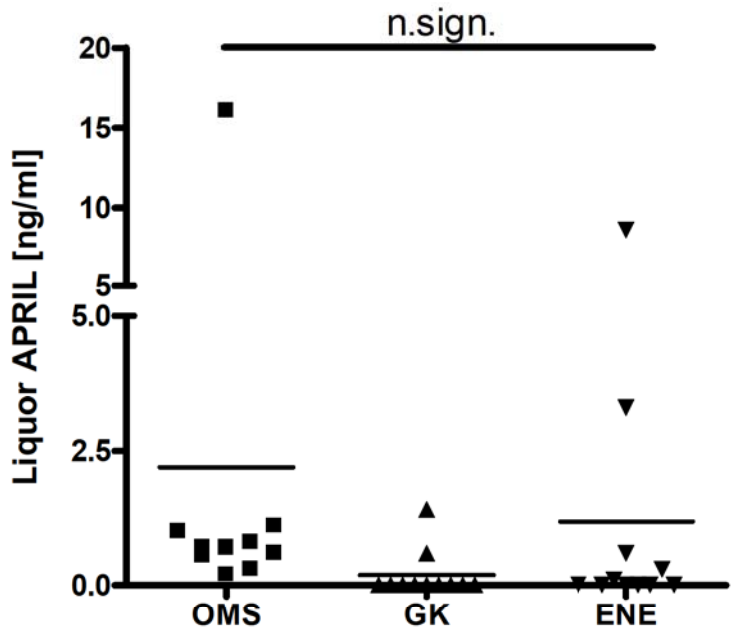

Abbildung 30: APRIL-Konzentration in Patienten-Liquor

Die APRIL-Konzentration im Liquor der verschiedenen Patienten-Gruppen wurde mittels ELISA bestimmt. Der Liquor wurde unverdünnt eingesetzt.

OMS = Patienten mit einem Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom; GK = gesunde Kontroll-Patienten; ENE = Patienten mit entzündlicher, neurologischer Erkrankung; n.sign. = nicht signifikant

5.3.3 Zusammenfassung

Es wurde keine erhöhte Konzentration von BAFF im Serum der OMS-Patienten gemessen. Im Liquor von OMS-Patienten war die BAFF-Konzentration leicht erhöht. Durch die Berechnung des BAFF- Liquor/Serum-Quotienten und mit der Messung und Berechnung des Albumin Liquor/Serum-Quotienten konnte gezeigt werden, dass bei OMS-Patienten eine intrathekale BAFF-Produktion stattfindet. Des Weiteren wurde eine Korrelation zwischen der BAFF-Konzentration und der Menge an Auto-AK gegen die Oberfläche von CGN´s gezeigt.

Eine Erhöhung der APRIL-Konzentration konnte weder im Serum, noch im Liquor von OMS-Patienten gemessen werden.

5.4 Bestimmung der APRIL-, BAFF- und BAFF-R-Expression, sowie der APRIL- und BAFF- Sekretion von NB-Zelllinien

Gambini et al. fand 2003 B-Zell Follikel in Neuroblastomen von OMS-Patienten, welche normalerweise nur in Lymphknoten vorkommen (Gambini 2003). Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine erhöhte Konzentration an BAFF im Liquor von OMS-Patienten nachgewiesen. Deshalb sollte untersucht werden, ob NB-Zellen APRIL, BAFF oder BAFF-Rezeptoren (BAFF-R) exprimieren können und/oder APRIL und BAFF sezernieren. Eine Expression und Sekretion dieser B-Zell-aktivierenden Faktoren könnte ein Grund für eine Anhäufung von B-Zellen in diesen Tumoren sein. Zur Ermittlung einer Expression von APRIL-, BAFF- und BAFF-R wurden verschiedene NB-Zelllinien durchflusszytometrisch und mittels Western Blot untersucht. Die Transkription der BAFF-Gene wurde zudem mittels Realtime-PCR nachgewiesen. Die Sekretion von BAFF und APRIL durch NB-Zellen wurde mittels ELISA überprüft.

Durch eine Stimulation mit IFN-γ konnte u.a. in Speicheldrüsen-Epithelzellen und Astrozyten eine Erhöhung der BAFF-Expression und Sekretion bewirkt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene NB-Zellinien mit IFN-γ stimuliert und die Expression und Sekretion von BAFF, aber auch von APRIL und BAFF-R durchflusszytometrisch, mittels Realtime-PCR und ELISA untersucht.

5.4.1 Basale APRIL-, BAFF- und BAFF-R Expression in NB-Zelllinien

Um festzustellen, ob NB-Zellen APRIL und BAFF und/oder BAFF-R exprimieren, wurden 12 verschiedene NB-Zelllinien und zwei Kontroll-Zelllinien kultiviert. Als Kontroll-Zelllinien dienten die Bronchialkarzinom-Zelllinie H460 und die Fibroblasten-Zelllinie HEK 293.

5.4.1.1 Basale BAFF-Expression auf RNA-Ebene

Als Methode für die Analyse der Transkription der BAFF-Gene wurde eine Realtime-PCR gewählt. Nachdem die RNA aus den Zellen isoliert worden war, wurde die Konzentration photometrisch gemessen und 2 µg Gesamt-RNA in die RT-PCR eingesetzt. Der reversen Transkription folgte eine Realtime-PCR mit dem Quanti Fast™ SYBR Green Kit, in die jeweils 1µl RT-PCR Produkt pro Probe eingesetzt wurde. In der Realtime-PCR wurde jede Zelllinie mit BAFF-Primern und mit Porphobilinogen-Desaminase (PBGD) -Primern amplifiziert. PBGD ist ein zelluläres Gen (Housekeeper-Gen), welches konstitutiv in allen Zellen exprimiert wird. Wurde bei allen Proben dieselbe Menge RNA eingesetzt, müssten die CT-Werte bei einer Realtime-PCR mit den Primern für PBGD bei allen Proben gleich sein. Mit Hilfe der Schmelzkurven, die automatisch bei jeder Realtime-PCR gemessen wurden, und mittels Gel-Elektrophorese wurde der korrekte Realtime-PCR Lauf überprüft. Ebenfalls wurde so überprüft, ob keine Primer-Dimere detektiert wurden.

Eine Transkription des BAFF-Gens konnte sowohl für alle NB-Zelllinien, als auch für die zwei Kontroll-Zelllinien nachgewiesen werden (Abb.31, Tab.16). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass NB-Zellen verglichen mit den Kontroll-Zellen eine größere Menge BAFF-RNA transkribieren (Abb.31, Tab.16). Vergleicht man den gemittelten CT-Wert der NB-Zelllinien mit dem der Kontroll-Zelllinien sieht man einen Unterschied von mehr als drei Zyklen (NB: 25,31; Kontrollen: 28,57; Tab.16). Ein Zyklus Unterschied bedeutet eine Verdopplung der Anzahl an RNA-Strängen des jeweiligen Gens.

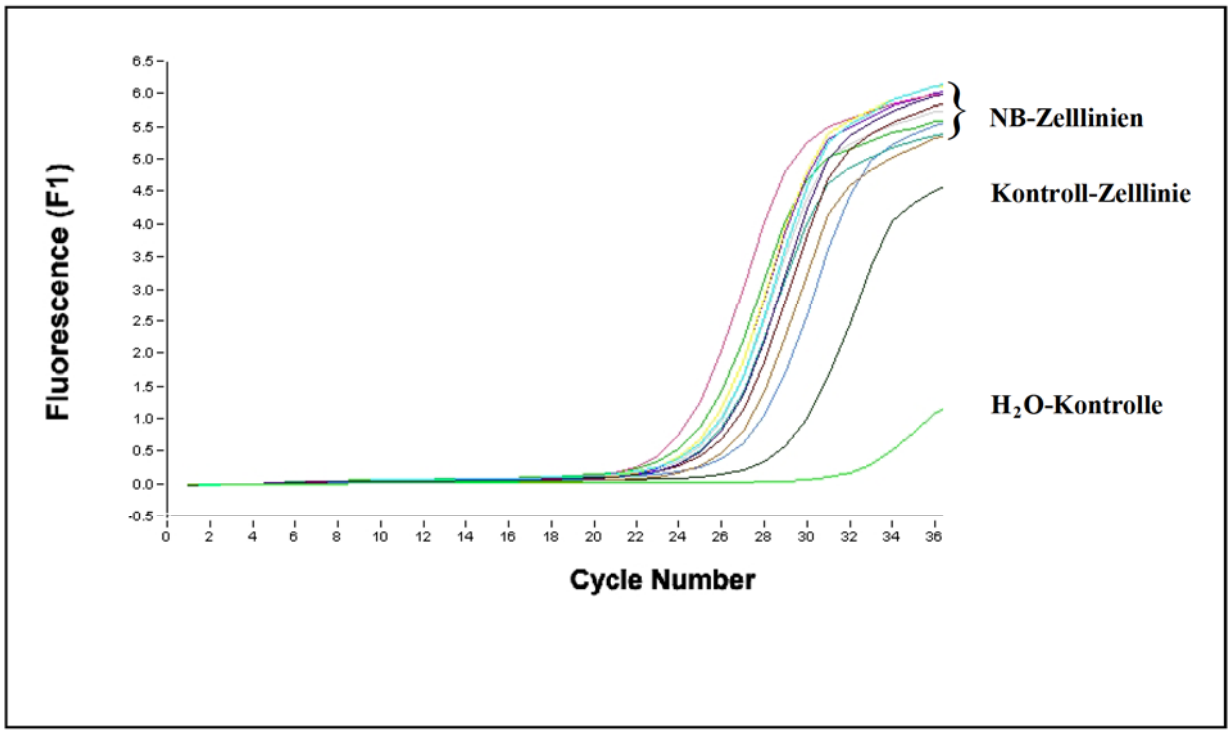

Abbildung 31: Transkription des BAFF-Gens, Detektion auf RNA-Ebene

Diese Abbildung zeigt die computerermittelte Darstellung des Verlaufs einer Realtime-PCR. Hierbei ist ersichtlich, bei welchem Zyklus die amplifizierte DNA detektiert wurde. Je früher die DNA detektiert wurde, desto mehr RNA des amplifizierten Gens wurde in der entsprechenden Zelllinie transkribiert. Zur Amplifikation dieser Proben wurden BAFF-Primer eingesetzt. Bei der H_2O-Kontrolle wurden Primer, aber keine DNA eingesetzt

NB-Zelllinien: SKN-BE, SKN-AS, IMR 5-75, CHP212, NMB, SKN-SY5Y, SKN-SH, IMR 32, Kelly, ACN, LAN5; Kontroll-Zelllinie: HEK

Zelllinie	CT-Werte			
	PBGD	BAFF	PBGD CT-Wert Differenz zu MW	BAFF CT-Werte + PBGD CT-Wert Differenz zu MW
SKN-BE	26,61	25,62	0,87	26,49
SKN-AS	27,64	25,91	-0,16	25,75
IMR 5-75	28,26	25,26	-0,78	24,48
CHP212	27,54	26,19	-0,06	26,13
NMB	28,91	25,25	-1,43	23,82
SKN-SY5Y	28,00	27,03	-0,52	26,51
Kelly	29,07	24,94	-1,59	23,35
IMR 32	28,61	23,72	-1,13	22,59
SKN-SH	27,96	24,9	-0,48	24,42
ACN	26,50	24,45	0,98	25,43
GIMEN	25,90	26,87	1,58	28,45
LAN 5	26,26	25,12	1,22	26,34
H460	27,13	26,91	0,35	27,26
HEK	26,35	28,75	1,13	29,88
MW	27,48			

MW	Neuroblastom-Zelllinien	25,31
	Kontroll-Zelllinien	28,57

Tabelle 16: Ergebnisse der Realtime-PCR
Die CT-Werte spiegeln die relative Menge der in den verschiedenen Zelllinien transkribierten RNA wieder. Je niedriger der CT-Wert desto mehr RNA war in der Ursprungsprobe vorhanden. Die CT-Werte des PBGD-Gens sollten bei allen Zelllinien gleich sein, deshalb wurde ein Mittelwert der CT-Werte gebildet und die Differenz der einzelnen CT-Werte zu diesem ermittelt. Die Differenz wurde danach zu den BAFF CT-Werten der einzelnen Zelllinien addiert. MW = Mittelwert

5.4.1.2 Basale APRIL-Expression auf Protein-Ebene

Für den intrazellulären Nachweis von APRIL wurden die Zellen mit 1 %igem PFA fixiert, mit dem Permeabilisierungpuffer aufgeschlossen und mit einem PE-markierten anti-human-

APRIL AK inkubiert. Anschließend wurde mit dem Durchflusszytometer die geometrisch gemittelte Fluoreszenz-Intensität (gMFI) gemessen (genauere Durchführung siehe 4.3.4.2). Zur Kontrolle der Fixierung und Permeabilisierung wurde ein Teil der Zellen mit dem Neurofilament-AK (mouse anti-human Neurofilament) und anschließend mit einem FITC-markierten Zweit-AK (rabbit anti-mouse IgG) inkubiert. Um eine unspezifische Bindung auszuschließen, wurde bei den Messungen für jede Zelllinie eine Isotyp-Kontrolle (IgG1 Isotyp Kontrolle PE-markiert) mitgemessen. Die gMFI-Werte der Isotyp-Kontrolle wurden von denen der APRIL-AK gefärbten Proben abgezogen.

Die durchflusszytometrische Messung zeigte, dass alle neun NB-Zelllinien, aber auch die Kontroll-Zelllinie H460 APRIL auf Protein-Ebene exprimieren (Abb.32). Im Mittel exprimieren die NB-Zelllinien vergleichsweise mehr APRIL als die Kontroll-Zelllinie.

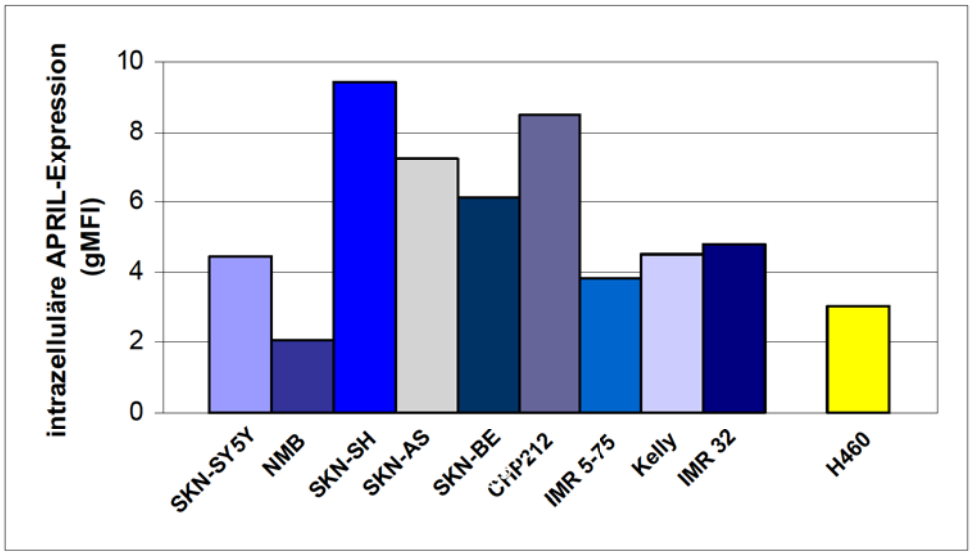

Abbildung 32: APRIL-Expression in verschiedenen Zelllinien

Die Expression von APRIL wurde intrazellulär durchflusszytometrisch gemessen (genaue Durchführung siehe 4.3.4.2). Dargestellt ist der geometrische Mittelwert der Fluoreszenz-Intensität (gMFI). Von den APRIL gMFI-Werten der verschiedenen Zelllinien wurden die gMFI-Werte der Isotyp-Kontrolle der jeweiligen Zelllinien abgezogen.

NB-Zelllinien: SKN-SY5Y, NMB, SKN-SH, SKN-AS, SKN-BE, CHP212, IMR 5-75, Kelly, IMR 32

Kontroll-Zelllinie: H460

Um dieses Ergebnis mit einer weiteren Methode zu bestätigen, wurden Zell-Lysate der verschiedenen Zelllinien auf ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, ein Western Blot durchgeführt und die Membran mit eine rabbit anti-human-APRIL AK inkubiert. Der APRIL-AK wurde mit einem AP-markiertem Zweit-AK (IgG swine anti-rabbit) detektiert,

welcher später mit dem *„BCIP/NBT-Blue Liquid Substrate System for Membranes“* der Firma Sigma sichtbar gemacht wurde (4.4.1-4.4.3).

Nach Angaben des Herstellers detektiert der APRIL-AK bei Anwesenheit von APRIL eine 27 kDa-Bande. Hier wurde unter anderem bei allen getesteten Zelllinien eine Bande bei ca. 25 kDa, sowie eine Bande bei ca. 37 kDa detektiert. Bei der 37 kDa-Bande könnte es sich um APRIL-Dimere handeln. APRIL bildet nicht nur mit sich selbst Dimere und Multimere, sondern u.a. auch mit BAFF, wodurch sich die zusätzlichen Banden bei einigen Zelllinien erklären lassen. Die Bande bei ca. 15 kDa könnten durch Proteasen entstandene Abbauprodukte von APRIL sein.

Die Western Blot Analysen bestätigen das Ergebnis der durchflusszytometrischen Untersuchungen bezüglich der APRIL-Expression (Abb.33). Für alle bereits im Durchflusszytometer getesteten und auch für die drei durchflusszytometrisch nicht untersuchten NB-Zelllinien konnte eine Expression von APRIL nachgewiesen werden. Auch die zwei Kontrollzelllinien exprimierten APRIL. Bei der Kontroll-Zelllinie H460 sah man allerdings eine deutlich schwächere Bande im Western Blot, was auf eine geringere APRIL-Expression verglichen mit der anderer Zelllinien schließen ließ.

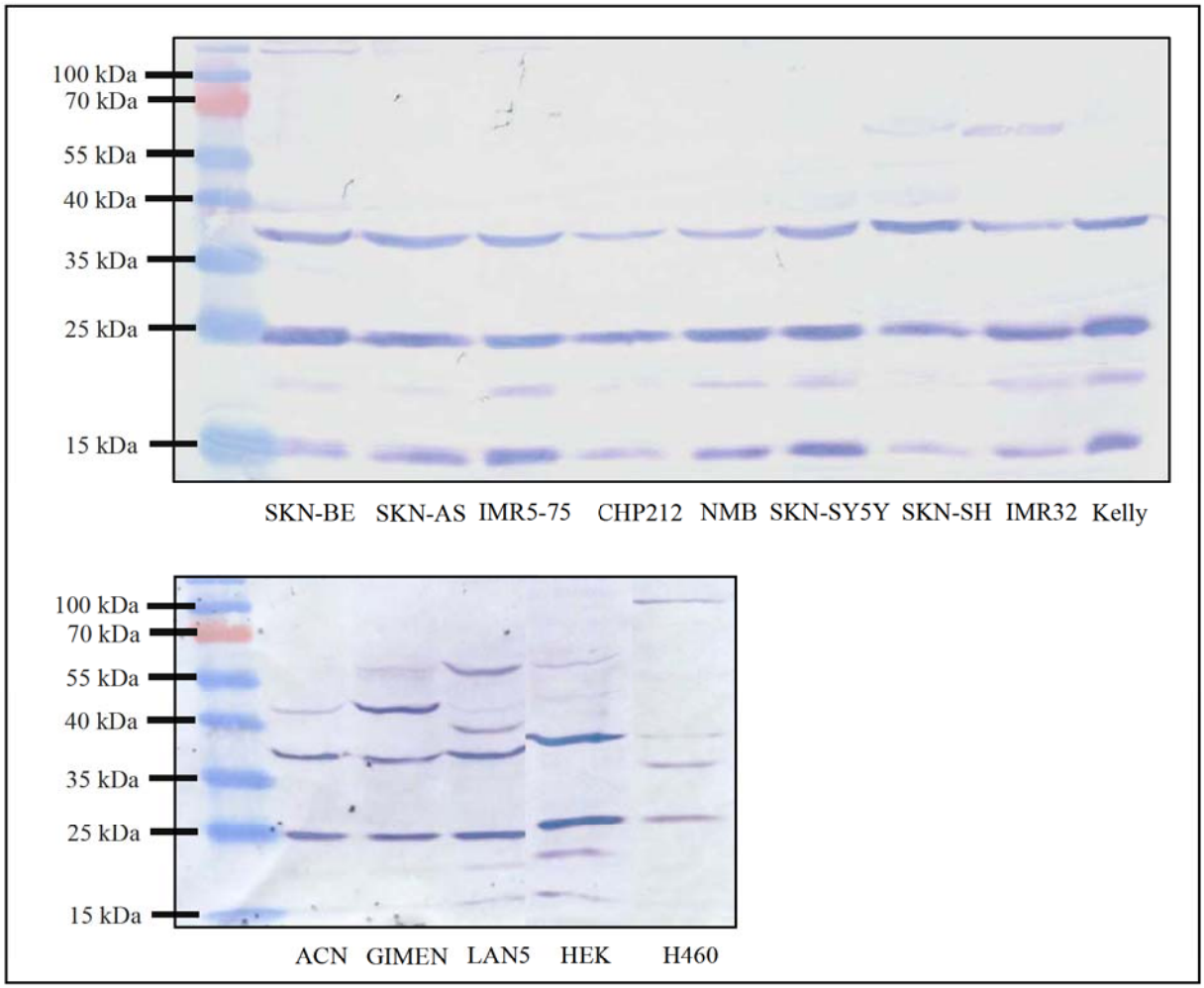

Abbildung 33: Überprüfung der APRIL-Expression verschiedener Zelllinien

200 µg Zell-Lysat der verschiedenen Zelllinien wurde auf einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach dem folgenden WesternBlot wurde die Membran mit dem anti-human APRIL-AK aus dem Kaninchen (Verdünnung 1:250) und anschließend mit einem AP-markierten anit-rabbit IgG-AK (Verdünnung 1:250) inkubiert. Das AP wurde später mit einem Substrat sichtbar gemacht.

NB-Zelllinien: SKN-BE, SKN-AS, IMR 5-75, CHP212, NMB, SKN-SY5Y, SKN-SH, IMR 32, Kelly, ACN, GIMEN, LAN5

Kontroll-Zelllinien: HEK, H460

5.4.1.3 Basale BAFF-Expression auf Protein-Ebene

Zum intrazellulären Nachweis der Expression von BAFF mittels Durchflusszytometrie wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit einem FITC-markierten anti-human-BAFF AK inkubiert (Durchführung siehe 4.3.4.2). Mit dem Durchflusszytometer wurde die geometrisch gemittelte Fluoreszenz-Intensität (gMFI) gemessen. Zur Kontrolle der Fixierung

und der Permeabilisierung wurde ein Teil der Zellen mit dem Neurofilament-AK (mouse anti-human Neurofilament) und anschließend mit einem FITC-markierten Zweit-AK (rabbit anti-mouse IgG) inkubiert. Um eine unspezifische Bindung auszuschließen, wurde bei jeder Messung für jede Zelllinie eine Isotyp-Kontrolle (IgG1 Isotyp Kontrolle FITC-markiert) mitgemessen. Die gMFI-Werte der Isotyp-Kontrolle wurden von denen der mit dem BAFF-AK gefärbten Proben abgezogen.

Mit der durchflusszytometrischen Messung konnte gezeigt werden, dass alle neun NB-Zelllinien BAFF exprimieren. Die Kontroll-Zelllinie H460 exprimierte kein BAFF (Abb.34).

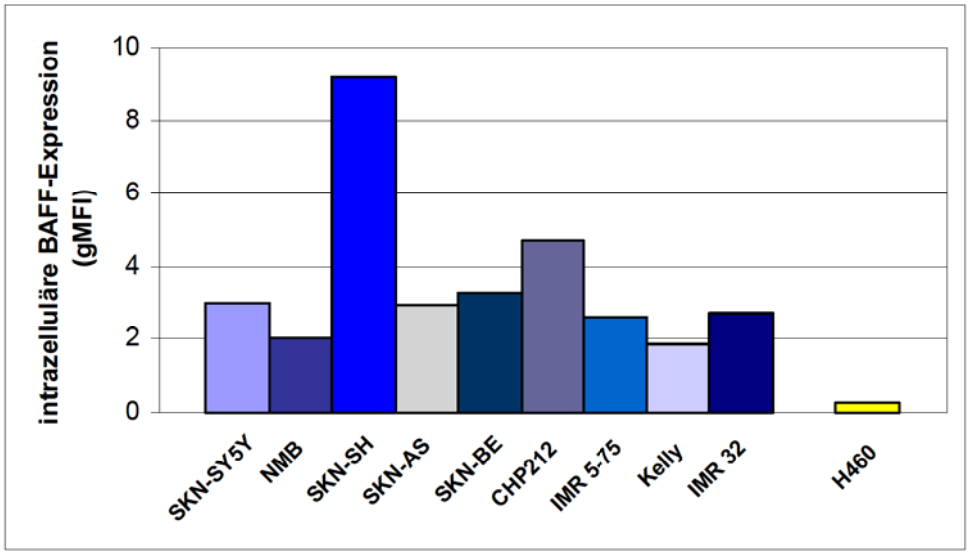

Abbildung 34: BAFF-Expression in verschiedenen Zelllinien

Die Expression von BAFF wurde intrazellulär durchflusszytometrisch gemessen (Durchführung siehe 4.3.4.2). Dargestellt ist der geometrische Mittelwert der Fluoreszenz-Intensität (gMFI). Von den BAFF gMFI-Werten der verschiedenen Zelllinien wurden die gMFI-Werte der Isotyp-Kontrolle der jeweiligen Zelllinien abgezogen.
NB-Zelllinien: SKN-SY5Y, NMB, SKN-SH, SKN-AS, SKN-BE, CHP212, IMR 5-75, Kelly, IMR 32
Kontroll-Zelllinie: H460

Um dieses Ergebnis mit einer weiteren Methode zu bestätigen, wurden Zell-Lysate der verschiedenen Zelllinien auf einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel mittels Western Blot analysiert. Die Membran wurde mit AP-markierten anti-human-BAFF AK inkubiert, welcher später mit dem *„BCIP/NBT-Blue Liquid Substrate System for Membranes“* der Firma Sigma sichtbar gemacht wurde (4.4.1-4.4.3).

Nach Hersteller-Angaben detektiert der BAFF-AK bei Anwesenheit von BAFF eine 37 kDa-Bande. In Abb.35 ist gezeigt, dass bei allen getesteten Zelllinien eine Bande von ca. 36 kDa detektiert wurde. Weil im unteren Blot nicht bei allen Zelllinien BAFF detektiert werden konnte, wurde der Blot zur Kontrolle mit einem GAPDH-AK (mouse anti-human GAPDH)

und dem AP-markierten Zweit-AK (IgG rabbit anti-mouse) inkubiert. GAPDH wird in allen Zellen gleich stark exprimiert (Housekeeping-Gen) und kann somit als Referenz dienen.
Der Western Blot bestätigte das Ergebnis der durchflusszytometrischen Untersuchungen bezüglich der BAFF-Expression (Abb.35). Für alle bereits durchflusszytometrisch getesteten NB-Zelllinien und auch für zwei der drei durchflusszytometrisch nicht untersuchten NB-Zelllinien konnte eine BAFF-Expression nachgewiesen werden. Bei der Kontroll-Zelllinie H460 konnte, wie bereits bei den durchflusszytometrischen Untersuchungen, kein BAFF nachgewiesen werden. Für die zweite Kontroll-Zelllinie, welche durchflusszytometrisch nicht untersucht wurde, konnte eine BAFF-Expression nachgewiesen werden.

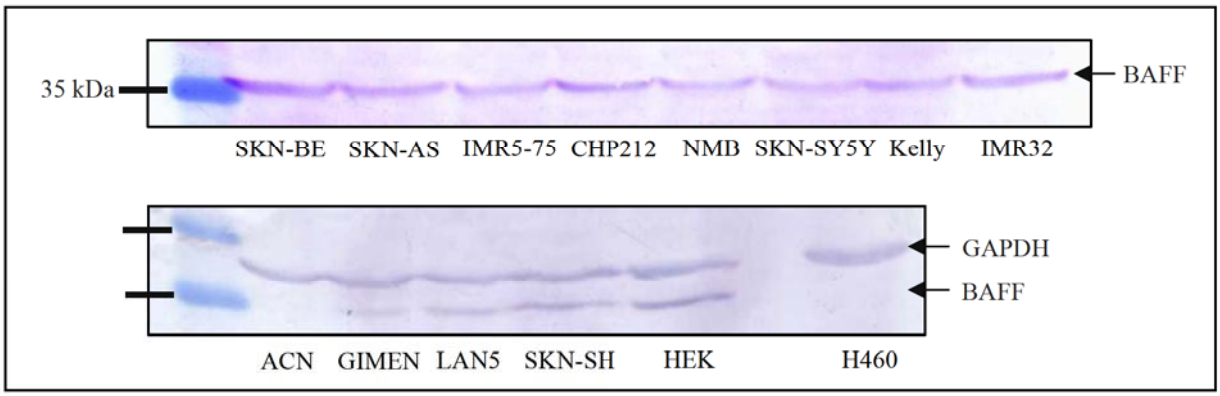

Abbildung 35: Überprüfung der BAFF-Expression verschiedener Zelllinien
200 µg Zell-Lysat der verschiedenen Zelllinien wurde auf einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach dem folgenden WesternBlot wurde die Membran mit dem anti-human-BAFF AK aus dem Kaninchen (Verdünnung 1:500) und anschließend mit einem AP-markierten anti-rabbit IgG-AK (Verdünnung 1:250) inkubiert. Das AP wurde später mit einem Substrat sichtbar gemacht.
NB-Zelllinien: SKN-BE, SKN-AS, IMR 5-75, CHP212, NMB, SKN-SY5Y, SKN-SH, IMR 32, Kelly, ACN, GIMEN, LAN5
Kontroll-Zelllinien: HEK, H460

5.4.1.4 Basale Expression on BAFF-R

Um die Expression von BAFF-R auf der Oberfläche der Zellen nachzuweisen, wurden diese mit einem FITC-markierten anti-human BAFF-R AK inkubiert und die geometrisch gemittelten Fluoreszenz-Intensität (gMFI) mit dem Durchflusszytometer gemessen. Um den einwandfreien Versuchsablauf zu überprüfen, wurde ein Teil der NB-Zellen mit dem MHC I-AK (mouse anti-human HLA-ABC), ein Teil der Kontoll-Zelllinie mit dem N-CAM AK

(mouse ant-human CD56) und anschließend mit einem FITC-markierten Zweit-AK (rabbit anti-mouse IgG) inkubiert. Eine unspezifische Bindung, wurde durch das Messen einer Isotyp-Kontrolle (Ig1 Isotyp Kontrolle FICT-markiert) bei jeder Messung und für jede Zelllinie ausgeschlossen. Die gMFI-Werte der Isotyp-Kontrolle wurden von denen der mit dem BAFF-R AK gefärbten Proben abgezogen.

Mit der durchflusszytometrischen Messung konnte gezeigt werden, dass weder die NB-Zelllinien noch die Kontroll-Zelllinie BAFF-R auf ihrer Oberfläche exprimieren (Abb.36).

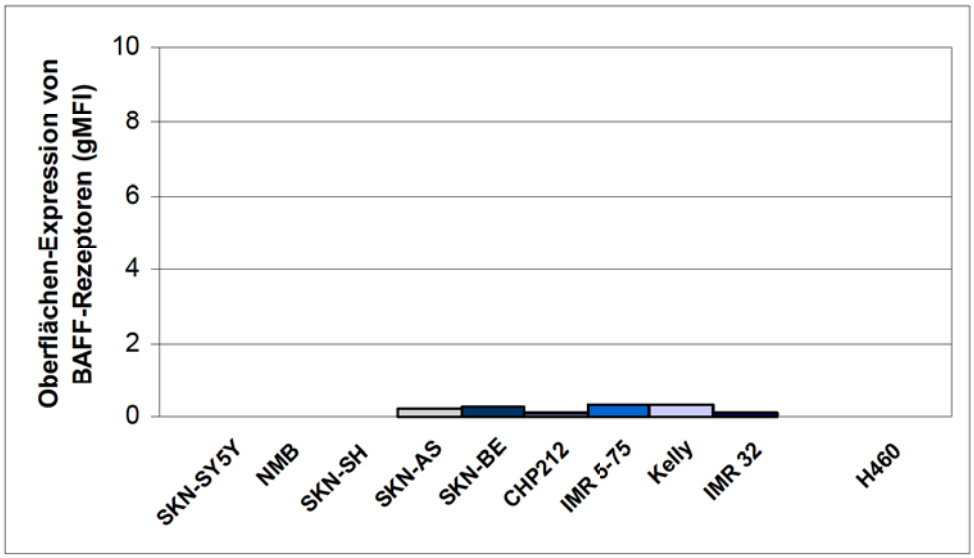

Abbildung 36: BAFF-R Expression in verschiedenen Zelllinien

Die Expression von BAFF-Rezeptoren (BAFF-R) wurde extrazellulär durchflusszytometrisch gemessen. Dargestellt sind die geometrischen Mittelwerte der Fluoreszenz-Intensität (gMFI). Von den BAFF-R gMFI-Werten der verschiedenen Zelllinien wurden die gMFI-Werte der Isotypkontrolle der jeweiligen Zelllinien abgezogen.

NB-Zelllinien: SKN-SY5Y, NMB, SKN-SH, SKN-AS, SKN-BE, CHP212, IMR 5-75, Kelly, IMR 32

Kontroll-Zelllinie: H460

5.4.2 Effekt von IFN-γ auf die APRIL-, BAFF- und BAFF-R-Expression in NB-Zelllinien

Für die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden neun verschiedene NB-Zelllinien und eine Kontroll-Zelllinie in 6-Well-Platten kultiviert, mit IFN-γ stimuliert und zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet. Es wurde eine IFN-γ-Endkonzentration von 100 ng/ml gewählt, eine Stimulation mit der doppelten IFN-γ-Konzentration zeigte keine messbare

Steigerung der Expression eines der drei Proteine oder deren RNA. Für jede Zelllinie und jeden Ernte-Zeitpunkt wurden als Kontrolle unstimulierte Zellen mitgemessen. Die Zellen wurden mit entsprechenden fluoreszenzmarkierten AK gefärbt und die geometrisch gemittelten Fluoreszenz-Intensitäten (gMFI) mit dem Durchflusszytometer bestimmt. Zur Auswahl geeigneter Ernte-Zeitpunkte wurden vorab mit eine NB-Zelllinie und der Kontroll-Zelllinie vier verschiedenen Inkubationszeiten getestet, zwei der Inkubationszeiten wurden für die Untersuchungen der anderen NB-Zelllinien gewählt. Jeder Versuch wurde mindestens einmal wiederholt, die hier gezeigten Ergebnisse sind die Mittelwerte der Versuche.
Zur Bestimmung der RNA-Menge von BAFF wurden dieselben neun NB-Zelllinien wie schon zur Bestimmung der BAFF-Expression sowie zwei Kontroll-Zelllinien verwendet. Die Zellen wurden in 6-Well-Platten kultiviert, mit IFN-γ stimuliert (Endkonzentration: 100 ng/ml) und nach zwei verschiedenen Inkubationszeiten geerntet. Vor den eigentlichen Versuchen wurden die Effizienzen der Realtime-PCR mit den BAFF-Primern und den Primern gegen PBGD bestimmt. Mit Hilfe der berechneten Effizienzen wurde das Verhältnis der BAFF-RNA-Menge von unstimulierten zu stimulierten Proben (Ratio) bestimmt. So konnte festgestellt werden, ob durch die Stimulation mit IFN-γ BAFF-RNA verstärkt exprimiert wurde. Jeder Versuch wurde mindestens einmal wiederholt, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu zeigen.

5.4.2.1 BAFF-RNA-Menge nach IFN-γ-Stimulation

Zur Überprüfung der RNA-Menge von BAFF wurden Realtime-PCR´s durchgeführt. Die Zellen wurden in 6-Well Platten kultiviert, mit IFN-γ stimuliert und nach 24 bzw. 48 Stunden geerntet. Bei einer Stimulationszeit von 24 Std. wurden 5 x 10^5 Zellen pro Well, bei einer Stimulationszeit von 48 Std. 3 x 10^5 Zellen pro Well inkubiert. Nach der Kultivierung, Stimulation und Ernte der Zellen wurde die Gesamt-RNA der stimulierten und unstimulierten Zellen isoliert, die Konzentration photometrisch quantifiziert und 2 µg der Gesamt-RNA pro Probe in die RT-PCR eingesetzt. Der reversen Transkription folgte eine Realtime-PCR mit dem Quanti Fast™ SYBR Green Kit, in die jeweils 1µl RT-PCR Produkt pro Probe eingesetzt wurde. In der Realtime-PCR wurde jede Zelllinie mit BAFF-Primern und mit PBGD-Primern amplifiziert. PBGD ist ein Housekeeper-Gen, ein zelluläres Gen, welches konstitutiv in Zellen exprimiert wird. Wurde bei allen Proben dieselbe Menge an RNA eingesetzt, müssten die CT-Werte bei einer Realtime-PCR mit den Primern des Housekeeper-Gens bei allen Proben

gleich sein. Mit Hilfe der Schmelzkurven, die bei jeder Realtime-PCR ermittelt wurden, sowie mittels Gel-Elektrophorese wurde die Realtime-PCR überprüft. Des Weiteren wurde die Anwesenheit von Primer-Dimere kontrolliert.

Zur Bestimmung der Effizienzen der Realtime-PCR mit den BAFF- bzw. PBGD-Primern, wurde eine Verdünnungsreihe von einer Probe hergestellt. Es wurden insgesamt sechs verschiedene Verdünnungen zwischen unverdünnt und einer Verdünnung von 1:100 sowohl mit den BAFF-Primern als auch mit den PBGD-Primern in denselben Realtime-PCR Lauf eingesetzt.

Die Effizienzen der mit den verschiedenen Primern durchgeführten Realtime-PCR konnten mit den Steigungen der Ausgleichsgeraden der Verdünnungsreihe aus Abb.37 errechnet werden. Die Formel dafür lautet: Effizienz = 10^(-1/Steigung).

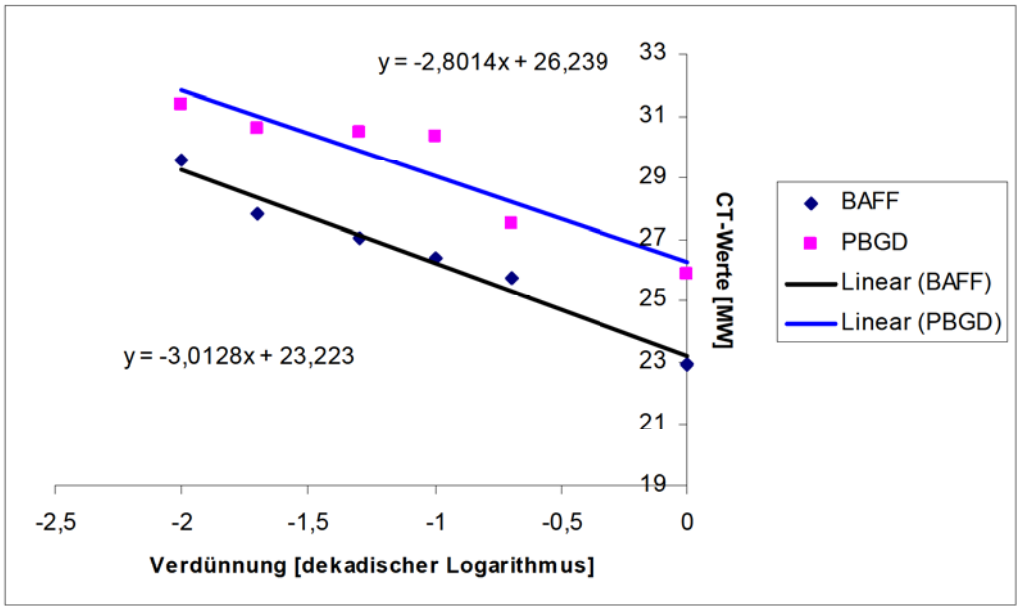

Abbildung 37: Berechnung der Effizienzen für BAFF und PBGD

Die Verdünnungen einer Probe wurden mittels Realtime-PCR unter Verwendung von BAFF-Primern und PBGD-Primern analysiert. Die Verdünnungen waren: 1:1, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100. Dargestellt sind die gemittelten CT-Werte von 2-4 Versuchen pro Verdünnung gegen den dekadischen Logarithmus der Verdünnungen. Durch die mit BAFF-Primern wie auch durch die mit PBGD-Primern ermittelten Werte wurde eine Ausgleichsgerade gelegt. Die Steigung der Ausgleichsgeraden diente der Berechnung der Effizienzen der mit den verschiedenen Primern durchgeführten Realtime-PCR.

	Steigung	Effizienz
BAFF	-3,0128	2,14742079
PBGD	-2, 8014	2,27491081

Tabelle 17: Effizienzen der Realtime-PCR für BAFF und PBGD
Die Steigungen wurden anhand der Ausgleichsgeraden der Verdünnungsreihen aufgetragen gegen die CT-Werte ermittelt (Abb. 37). Die Effizienzen wurden mit der Formel Effizienz = 10^(-1/Steigung) berechnet.

Mit den Effizienzen wurde das Verhältnis der BAFF RNA-Menge von unstimulierten zu stimulierten Proben (Ratio) bestimmt. Dazu musste zunächst für beide Primer-Paare der ΔCT-Wert errechnet werden.

ΔCT = CT-Werte (unstimulierte Zellen) - CT-Werte (stimulierte Zellen)

Die Formel für die Berechnung der Ratio lautet:

(BAFF-Effizienz ^ BAFF ΔCT) / (PBGD-Effizienz ^ PBGD ΔCT)

Eine deutlich erhöhte Ratio und damit eine deutlich erhöhte detektierbare Menge BAFF-RNA nach einer Stimulation mit IFN-γ, konnte für drei Zelllinien gezeigt werden. Eine Erhöhung der Transkription des BAFF-Gens konnte in den NB-Zelllinien SKN-AS und CHP212 nach einer Stimulationsdauer von 48 Std., und in der Kontroll-Zelllinie H460 sowohl nach 24 Std., als auch nach 48 Std. Stimulation nachgewiesen werden (Abb.38, Tab.18). Eine schwache Erhöhung der BAFF-RNA-Menge konnte für die NB-Zelllinien IMR 5-75 und IMR 32 nach einer Stimulationsdauer von 24 Std. gezeigt werden, wobei nach einer Stimulationsdauer von 48 Std. bei beiden Zelllinien keine erhöhten BAFF-RNA Mengen gezeigt werden konnten (Abb.38, Tab.18).

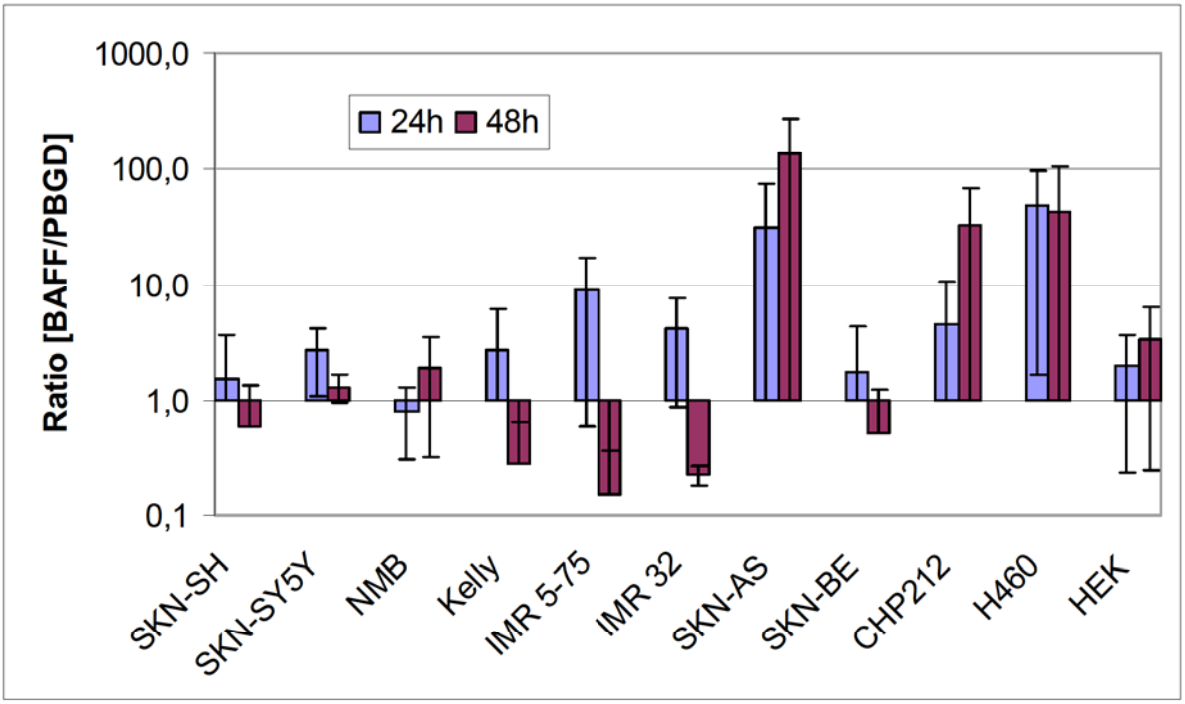

Abbildung 38: Graphische Darstellung der Stimulierbarkeit von BAFF auf RNA-Ebene

5 x 10^5 Zellen pro Well wurden für eine Stimulationsdauer von 24 Std., 3 x 10^5 Zellen pro Well für eine Stimulationsdauer von 48 Std. in 6-Well Platten kultiviert. Nach der Isolation der RNA wurde eine RT-PCR und im Anschluss eine Realtime-PCR durchgeführt. Jeder Versuch wurde mindestens einmal wiederholt. Von der errechneten Ratio wurde der Mittelwert gebildet und in dieser Abbildung als Balken dargestellt (blau = 24 stündige Stimulationsdauer; rosa = 48 stündige Stimulationsdauer). Die errechnete Standardabweichung wurde als Fehlerbalken nach oben und unten dargestellt. Die Ratio der einzelnen Versuche wurden in Tabelle 18 aufgelistet. Lag die Ratio über dem Wert 1,0 bedeutete dies eine erhöhte Expression der BAFF-RNA nach Stimulation mit IFN-γ, lag die Ratio unter dem Wert 1,0 bedeutete dies eine verringerte BAFF-RNA Expression nach Stimulation mit IFN-γ.

Zelllinien	Inkubationszeit															
	24 Std.				48 Std.				24 Std.				48 Std.			
	unstimuliert		stimuliert		unstimuliert		stimuliert		Ratio (BAFF/PBGD)							
	PBGD	BAFF	PBGD	BAFF	PBGD	BAFF	PBGD	BAFF	Einzelne Versuche			MW	Einzelne Versuche			MW
SKN-SH	26,73	25,03	25,99	24,17	25,45	23,86	24,65	24,03	0,43	0,26	3,91	**1,54**	1,44	0,21	0,11	**0,59**
SKN-SY5Y	23,64	26,23	25,05	26,67	24,48	26,14	24,75	26,10	4,20	2,65	1,06	**2,64**	1,31	1,66	0,96	**1,31**
NMB	27,64	25,96	27,66	26,55	27,32	24,74	27,90	25,27	0,25	0,96	1,14	**0,78**	3,29	0,16	2,33	**1,93**
Kelly	29,80	24,17	30,09	24,40	32,04	24,11	29,77	24,34	0,22	5,10		**2,66**	0,03	0,53		**0,28**
IMR 5-75	28,07	23,22	31,45	24,34	30,29	24,54	25,40	25,96	15,00	3,07		**9,03**	0,00	0,30		**0,15**
IMR 32	26,66	23,48	28,44	23,76	29,86	24,15	28,66	24,82	6,51	1,85		**4,18**	0,19	0,26		**0,23**
SKN-AS	30,13	25,73	26,34	19,92	26,70	26,31	26,38	19,99	61,84	0,23		**31,04**	232,71	39,52		**136,12**
SKN-BE	29,67	24,90	27,87	25,63	30,56	25,46	27,17	25,27	0,00	3,53		**1,77**	0,00	1,01		**0,51**
CHP212	30,64	24,76	28,07	22,04	25,47	25,72	25,82	22,09	0,11	8,80		**4,45**	8,00	57,05		**32,53**
H460	24,40	26,49	24,99	23,02	24,89	27,41	24,89	23,57	2,71	46,80	97,08	**48,86**	6,79	8,74	114,03	**43,19**
HEK	23,94	26,93	23,60	26,23	23,48	26,78	23,04	26,20	0,33	1,77	3,71	**1,93**	3,73	0,06	6,12	**3,30**

Tabelle 18: Gemittelte CT-Werte der Stimulationsversuche und Ratio der einzelnen Versuche

Die CT-Werte spiegeln die relative Menge der in den Zellen exprimierten RNA wieder. Je niedriger der CT-Wert, desto mehr RNA war in der Urspungsprobe vorhanden. Der linken Teil dieser Tabelle zeigt die gemittelten CT-Werte der unstimulierten und mit IFN-γ stimulierten Zellen nach verschiedenen Stimulationszeiten aufgelistet. Im rechten Teil dieser Tabelle sind die errechneten Ratio der einzelnen Versuche und deren Mittelwerte (MW) aufgelistet, um die Vergleichbarkeit der einzelnen Versuche deutlich zu machen. Lag die Ratio über dem Wert 1,0 bedeutete dies eine erhöhte Expression der BAFF-RNA nach Stimulation mit IFN-γ, lag die Ratio unter dem Wert 1,0 bedeutete dies eine verringerte BAFF-RNA Mengen nach Stimulation mit IFN-γ.

5.4.2.2 APRIL-Expression nach IFN-γ-Stimulation

Zur Auswahl der besten Stimulations-Zeiträume wurden zunächst mit einer NB- und einer Kontroll-Zelllinie Vorversuche durchgeführt. Nach der Stimulation mit IFN-γ wurden die Zellen genauso behandelt und die APRIL-Expression bestimmt, wie bereits bei den Untersuchungen zur Bestimmung der basalen APRIL-Expression.

Nach keiner Stimulationszeit konnte ein deutlicher Unterschied in der intrazellulären APRIL-Expression zwischen stimulierten und unstimulierten Zellen gemessen werden (Abb.39). Weil nach einer längeren Stimulationszeit die APRIL-Expression nicht gesteigert wurde, wurden die zwei kürzesten Inkubationszeiten für die Untersuchung der anderen NB-Zelllinien gewählt.

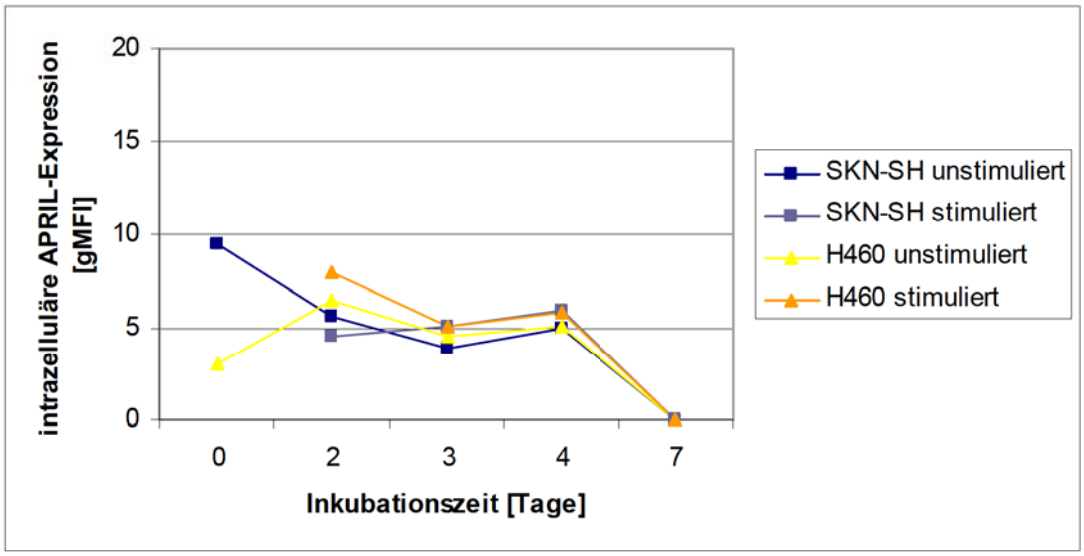

Abbildung 39: Zeitverlauf der APRIL-Expression nach IFN-γ-Stimulation

1,5 x 10^5 Zellen pro Well wurden für die zwei- und drei- tägige, 1 x 10^5 Zellen pro Well für die vier- und sieben-tätige Inkubation in 6-Well-Platten kultiviert, mit IFN-γ stimuliert und nach 2-7 Tagen geerntet. Bei einer sieben-tägigen Stimulationzeit wurde nach drei Tagen ein Mediumwechsel durchgeführt, bei dem erneut IFN-γ zugesetzt wurde. Die Expression von APRIL wurde intrazellulär mit dem Durchflusszytometer bestimmt. Dargestellt ist der geometrische Mittelwert der Fluoreszenz-Intensität (gMFI). Von den APRIL gMFI-Werten der verschiedenen Zelllinien wurden die gMFI-Werte der Isotyp-Kontrolle der jeweiligen Zelllinien abgezogen. NB-Zelllinie: SKN-SH; Kontroll-Zelllinie: HEK

Weder in den NB-Zelllinien, noch in der Kontroll-Zelllinie konnte eine deutliche Steigerung der APRIL-Expression nach einer 48-stündigen Stimulation mit IFN-γ gemessen werden (Abb.40). Bei der NB-Zelllinie IMR 32 konnte nur bei einem der Versuche eine starke

Induktion der APRIL-Expression nach der Stimulation gemessen werden. Dieses Ergebnis war nicht reproduzierbar. Zeigt man, wie in Abb.40 nur den Mittelwert der Ergebnisse, scheint die APRIL-Expression durch die Stimulation teilweise stark erhöht zu sein. Dies kommt durch extreme Mess-Unterschiede zustande.

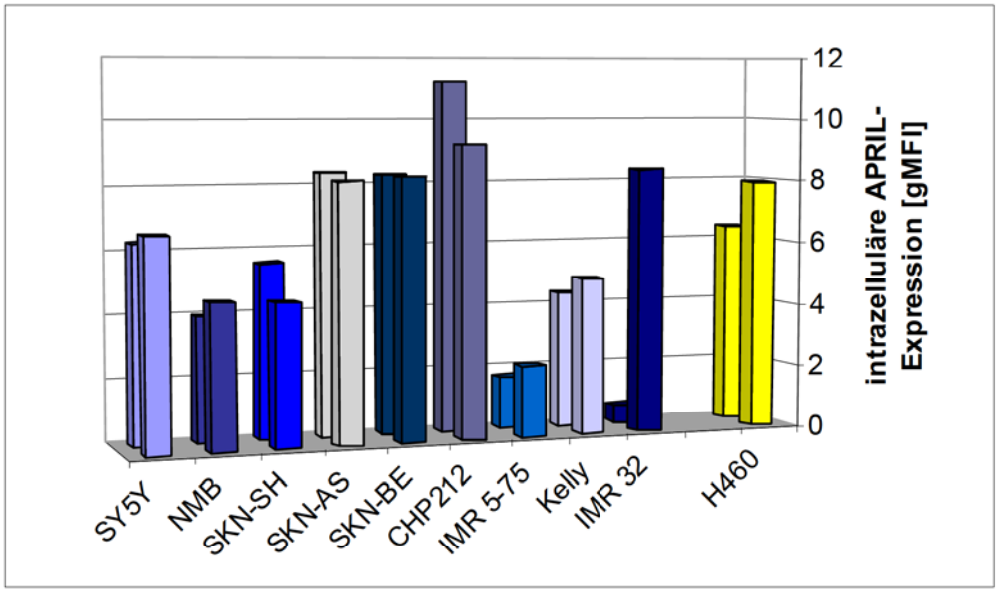

Abbildung 40: APRIL-Expression nach 48 Std. IFN-γ-Stimulation

$1{,}5 \times 10^5$ Zellen pro Well wurden in 6-Well-Platten kultiviert, mit IFN-γ stimuliert und nach einer 48-stündigen Inkubationszeit geerntet. Die Expression von APRIL wurde intrazellulär mit dem Durchflusszytometer bestimmt. Dargestellt ist der geometrische Mittelwert der Fluoreszenz-Intensität (gMFI). Von den APRIL gMFI-Werten der verschiedenen Zelllinien wurden die gMFI-Werte der Isotyp-Kontrolle der jeweiligen Zelllinien abgezogen. Die hinteren Diagramm-Balken geben die Werte der unstimulierten, die vorderen die der stimulierten Zellen wieder.

NB-Zelllinien: SKN-SY5Y, NMB, SKN-SH, SKN-AS, SKN-BE, CHP212, IMR 5-75, Kelly, IMR 32

Kontroll-Zelllinie: H460

Auch nach einer 72-stündigen Stimulation mit IFN-γ konnte weder in den neun verschiedenen NB-Zelllinien, noch in der Kontroll-Zelllinie eine deutliche Steigerung der APRIL-Expression gemessen werden (Abb.41).

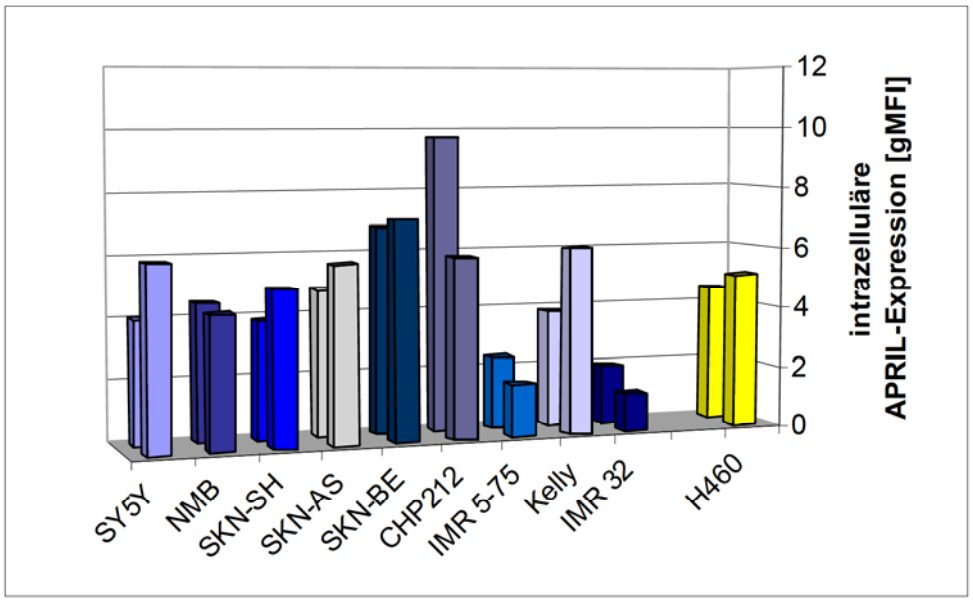

Abbildung 41: APRIL-Expression nach 72 Std. IFN-γ-Stimulation

1,5 x 10^5 Zellen pro Well wurde in 6-Well-Platten kultiviert, mit IFN-γ stimuliert und nach einer 72 stündigen Inkubationszeit geerntet. Die Expression von APRIL wurde intrazellulär mit dem Durchflusszytometer bestimmt. Dargestellt ist der geometrische Mittelwert der Fluoreszenz-Intensität (gMFI). Von den APRIL gMFI-Werten der verschiedenen Zelllinien wurden die gMFI-Werte der Isotyp-Kontrolle der jeweiligen Zelllinien abgezogen. Die hinteren Diagramm-Balken geben die Werte der unstimulierten, die vorderen die der stimulierten Zellen wieder.

NB-Zelllinien: SKN-SY5Y, NMB, SKN-SH, SKN-AS, SKN-BE, CHP212, IMR 5-75, Kelly, IMR 32

Kontroll-Zelllinie: H460

5.4.2.3 BAFF-Expression nach IFN-γ-Stimulation auf Protein-Ebene

Auch zur optimalen Stimulation der BAFF-Expression wurde zur Auswahl der besten Stimulations-Zeiträume ein exemplarischer Vorversuch mit einer NB-Zelllinie und einer Kontroll-Zelllinie durchgeführt. Nach der Stimulation wurden die Zellen genauso behandelt und die intrazelluläre Expression von BAFF bestimmt, wie bereits bei den Untersuchungen zur Bestimmung der basalen BAFF-Expression.

Nach keinem der vier Stimulations-Zeiträume konnte ein deutlicher Unterschied in der intrazellulären BAFF-Expression zwischen stimulierten und unstimulierten Zellen gemessen werden (Abb.42). Weil nach einer längeren Stimulationszeit die BAFF-Expression nicht gesteigert wurde, wurden die zwei kürzesten Inkubationszeiten für die Untersuchung der acht anderen NB-Zelllinien gewählt.

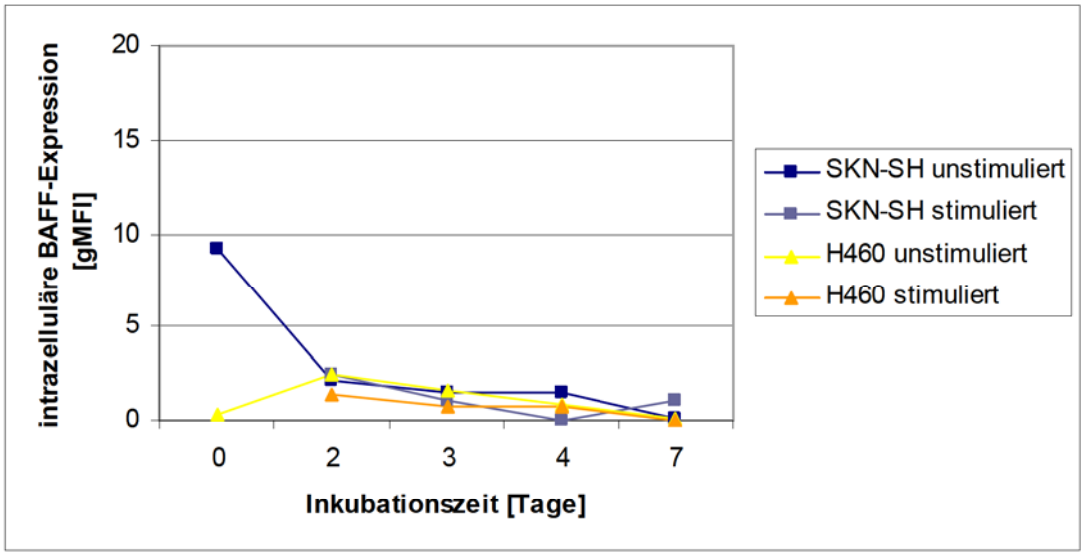

Abbildung 42: Zeitverlauf der BAFF-Expression nach IFN-γ-Stimulation

$1{,}5 \times 10^5$ Zellen pro Well wurden für die zwei- und drei-tägige, 1×10^5 Zellen pro Well für die vier- und sieben-tätige Inkubation in 6-Well-Platten kultiviert, mit IFN-γ stimuliert und nach der Inkubation geerntet. Bei einer sieben-tägigen Stimulationszeit wurde nach drei Tagen ein Mediumwechsel durchgeführt, bei dem erneut IFN-γ zugesetzt wurde. Die Expression von BAFF wurde intrazellulär mit dem Durchflusszytometer gemessen. Dargestellt ist der geometrische Mittelwert der Fluoreszenz-Intensität (gMFI). Von den BAFF gMFI-Werten der verschiedenen Zelllinien wurden die gMFI-Werte der Isotyp-Kontrolle der jeweiligen Zelllinien abgezogen.
NB-Zelllinie: SKN-SH; Kontroll-Zelllinie: HEK

Nach einer 48-stündigen Stimulation mit IFN-γ konnte auch für die acht anderen NB-Zelllinien keine Steigerung der intrazellulären Baff-Expression gemessen werden verglichen mit der BAFF-Expression unstimulierter Zellen (Abb.43).

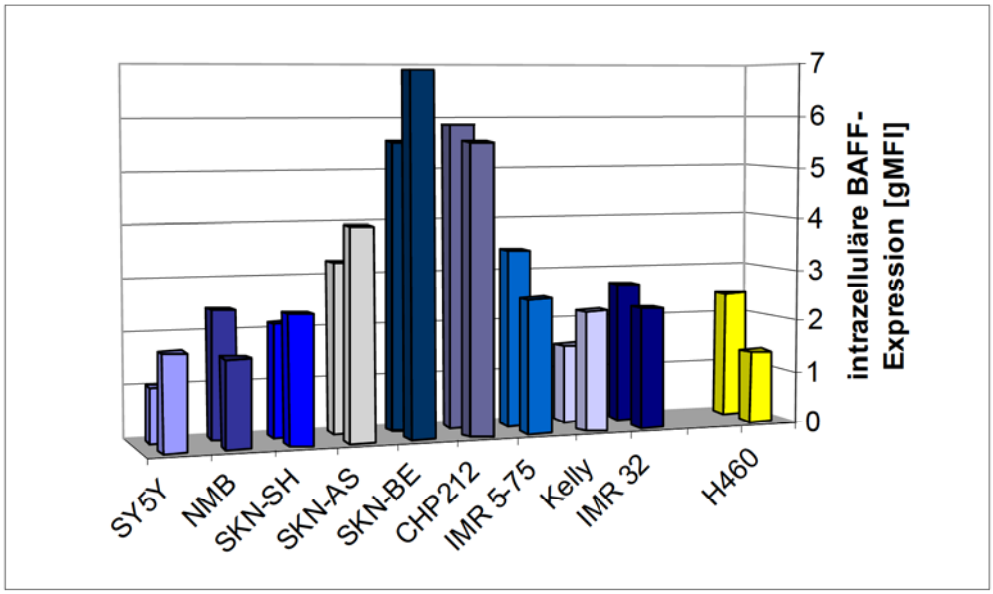

Abbildung 43: BAFF-Expression nach 48 Std. IFN-γ-Stimulation

1,5 x 10^5 Zellen pro Well wurde in 6-Well-Platten kultiviert, mit IFN-γ stimuliert und nach einer 48 stündigen Inkubationszeit geerntet. Die Expression von APRIL wurde intrazellulär mit dem Durchflusszytometer gemessen. Dargestellt ist der geometrische Mittelwert der Fluoreszenz-Intensität (gMFI). Von den BAFF gMFI-Werten der verschiedenen Zelllinien wurden die gMFI-Werte der Isotyp-Kontrolle der jeweiligen Zelllinien abgezogen. Die hinteren Diagramm-Balken geben die Werte der unstimulierten, die vorderen die der stimulierten Zellen wieder.

NB-Zelllinien: SKN-SY5Y, NMB, SKN-SH, SKN-AS, SKN-BE, CHP212, IMR 5-75, Kelly, IMR 32

Kontroll-Zelllinie: H460

Auch nach einer Erhöhung der Stimulationszeit auf 72 Stunden zeigte sich weder bei einer der NB-Zelllinien, noch bei der Kontroll-Zelllinie eine erhöhte intrazelluläre BAFF-Expression verglichen mit der BAFF-Expression unstimulierter Zellen (Abb.44).

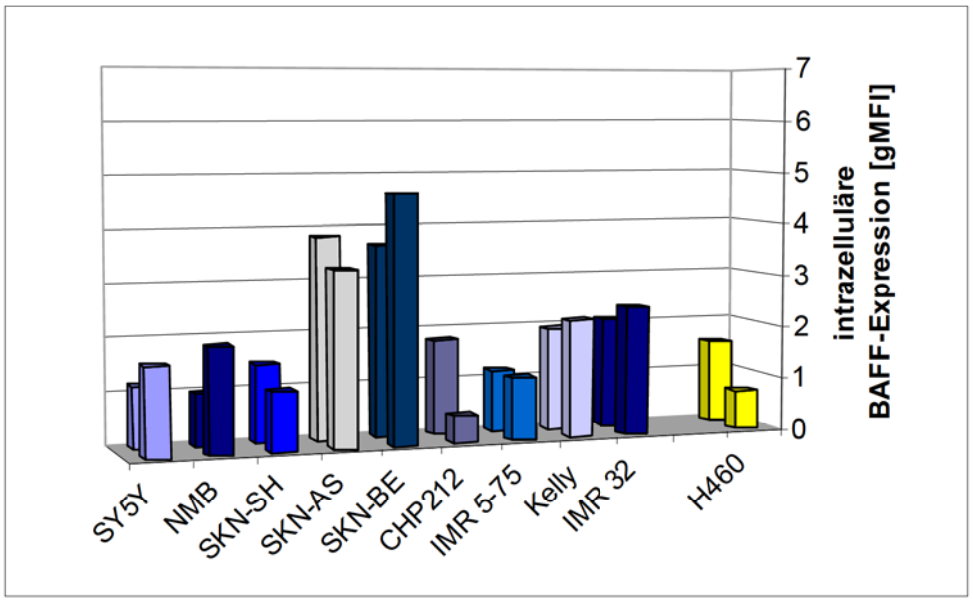

Abbildung 44: BAFF-Expression nach 72 Std. IFN-γ-Stimulation

1,5 x 10^5 Zellen pro Well wurde in 6-Well-Platten kultiviert, mit IFN-γ stimuliert und nach einer 72-stündigen Inkubationszeit geerntet. Die Expression von BAFF wurde intrazellulär mit dem Durchflusszytometer gemessen. Dargestellt ist der geometrische Mittelwert der Fluoreszenz-Intensität (gMFI). Von den BAFF gMFI-Werten der verschiedenen Zelllinien wurden die gMFI-Werte der Isotyp-Kontrolle der jeweiligen Zelllinien abgezogen. Die hinteren Diagramm-Balken geben die Werte der unstimulierten, die vorderen die der stimulierten Zellen wieder.
NB-Zelllinien: SKN-SY5Y, NMB, SKN-SH, SKN-AS, SKN-BE, CHP212, IMR 5-75, Kelly, IMR 32
Kontroll-Zelllinie: H460

5.4.2.4 BAFF-R Expression nach IFN-γ-Stimulation

Die Stimulierbarkeit der BAFF-R Expression auf der Oberfläche von NB- und Kontroll-Zelllinien wurde zur Auswahl der besten Stimulations-Zeiträume in Vorversuchen mit einer NB-Zelllinie und einer Kontroll-Zelllinie getestet. Nach der Stimulation wurden die Zellen genauso behandelt und die Oberflächen-Expression von BAFF-R bestimmt, wie bereits bei den Untersuchungen zur Bestimmung der basalen BAFF-R-Expression.

Weder bei der NB-Zelllinie, noch bei der Kontroll-Zelllinie konnte nach den vier unterschiedlichen Stimulations-Zeiträumen eine Oberflächen-Expression von BAFF-R nachgewiesen werden (Abb.45). Weil auch nach der längsten Stimulationszeit von sieben Tagen keine Oberflächen-Expression von BAFF-R gezeigt werden konnte, wurden zur Untersuchung der anderen acht NB-Zelllinien dieselben Stimulationszeiten gewählt, wie für die APRIL- und BAFF-Expression.

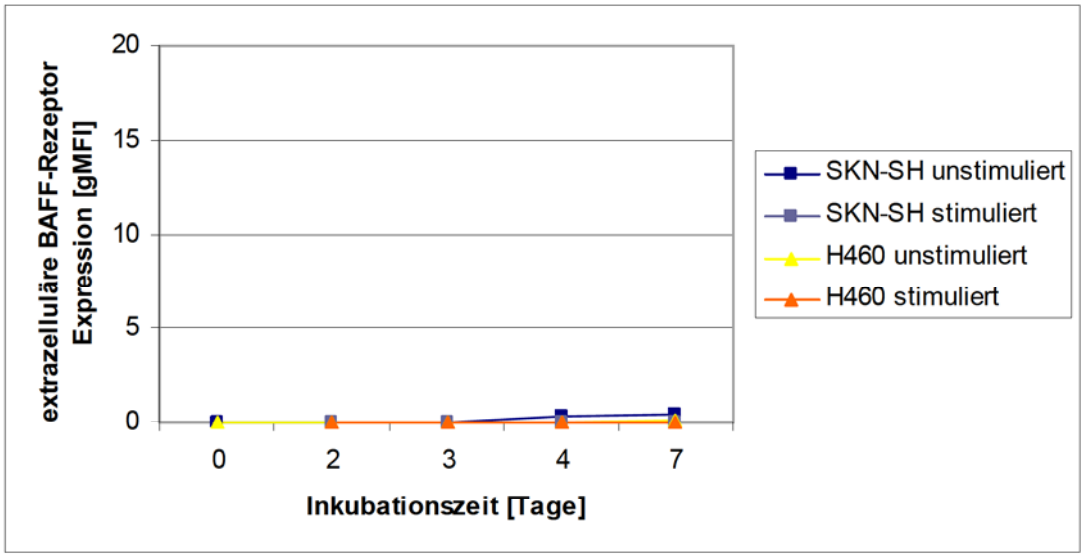

Abbildung 45: Zeitverlauf der BAFF-R Expression nach IFN-γ-Stimulation

$1{,}5 \times 10^5$ Zellen pro Well wurden für die zwei- und drei-tägige, 1×10^5 Zellen pro Well für die vier- und sieben-tägige Inkubation in 6-Well-Platten kultiviert, mit IFN-γ stimuliert und nach der Inkubation geerntet. Bei einer sieben-tägigen Stimulationzeit wurde nach drei Tagen ein Mediumwechsel durchgeführt, bei dem erneut IFN-γ zugesetzt wurde. Die Expression von BAFF-R auf der Oberfläche der Zellen wurde extrazellulär mit dem Durchflusszytometer gemessen. Dargestellt ist der geometrische Mittelwert der Fluoreszenz-Intensität (gMFI). Von den BAFF-R gMFI-Werten der verschiedenen Zelllinien wurden die gMFI-Werte der Isotyp-Kontrolle der jeweiligen Zelllinien abgezogen. NB-Zelllinie: SKN-SH; Kontroll-Zelllinie: HEK

Nach einer 48-stündigen Stimulation mit IFN-γ konnte bei keiner der getesteten NB- und Kontroll-Zelllinien eine Oberflächen-Expression von BAFF-R gezeigt werden, genau wie bei allen unstimulierten Zellen (Abb.46).

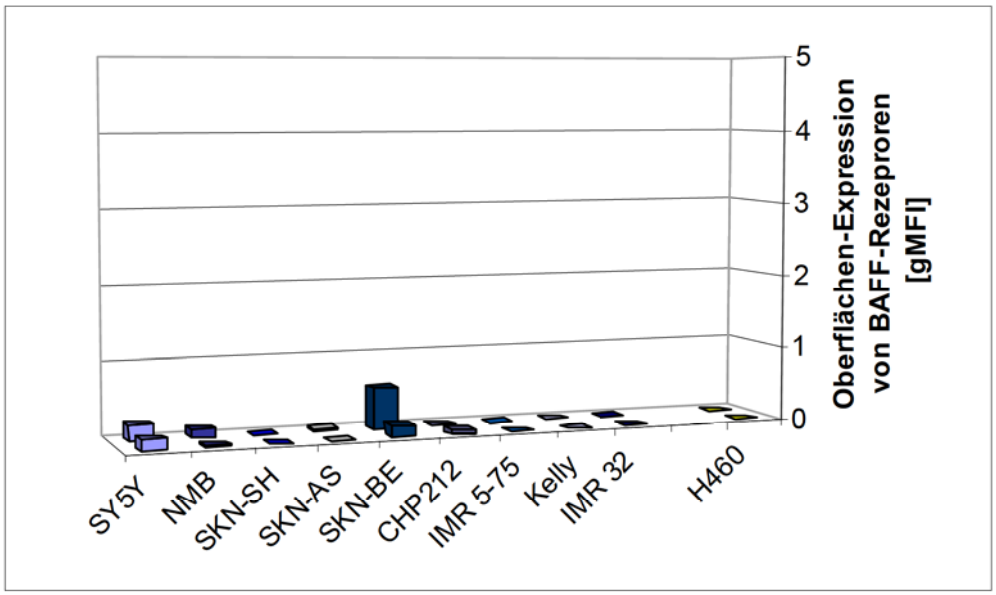

Abbildung 46: BAFF-R Expression nach 48 Std. IFN-γ-Stimulation

1,5 x 10^5 Zellen pro Well wurde in 6-Well-Platten kultiviert, mit IFN-γ stimuliert und nach einer 48-stündigen Inkubationszeit geerntet. Die Oberflächen-Expression von BAFF-R wurde extrazellulär mit dem Durchflusszytometer gemessen. Dargestellt ist der geometrische Mittelwert der Fluoreszenz-Intensität (gMFI). Von den BAFF-R gMFI-Werten der verschiedenen Zelllinien wurden die gMFI-Werte der Isotyp-Kontrolle der jeweiligen Zelllinien abgezogen. Die hinteren Diagramm-Balken geben die Werte der unstimulierten, die vorderen die der stimulierten Zellen wieder.

NB-Zelllinien: SKN-SY5Y, NMB, SKN-SH, SKN-AS, SKN-BE, CHP212, IMR 5-75, Kelly, IMR 32

Kontroll-Zelllinie: H460

Auch nach einer Erhöhung der Stimulationszeit auf 72 Stunden, konnte bei keiner getesteten Zelllinie eine Oberflächen-Expression von BAFF-R gemessen werden (Abb.47).

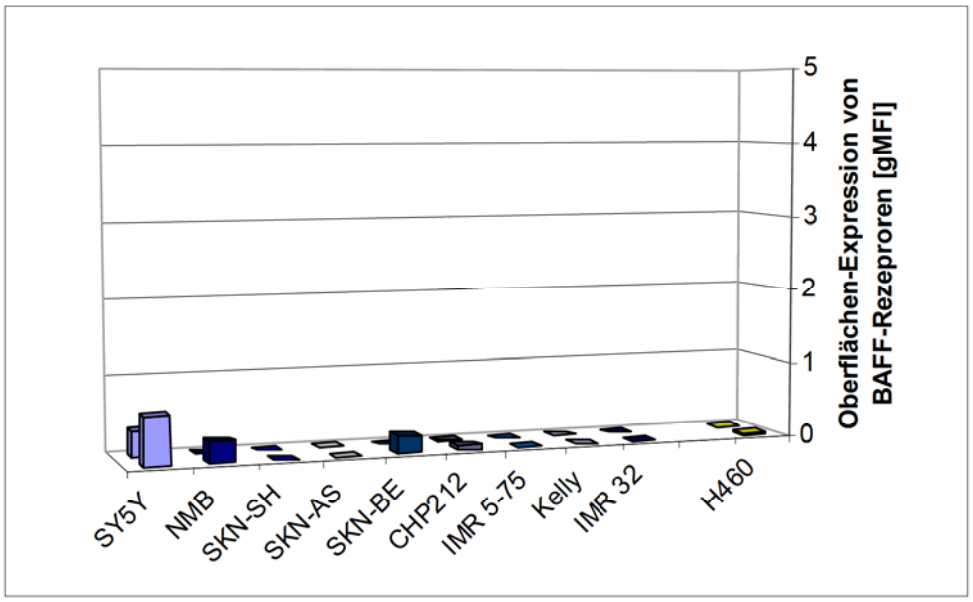

Abbildung 47: BAFF-R Expression nach 72 Std. IFN-γ-Stimulation

1,5 x 10^5 Zellen pro Well wurde in 6-Well-Platten kultiviert, mit IFN-γ stimuliert und nach einer 72-stündigen Inkubationszeit geerntet. Die Oberflächen-Expression von BAFF-R wurde extrazellulär mit dem Durchflusszytometer gemessen. Dargestellt ist der geometrische Mittelwert der Fluoreszenz-Intensität (gMFI). Von den BAFF-R gMFI-Werten der verschiedenen Zelllinien wurden die gMFI-Werte der Isotyp-Kontrolle der jeweiligen Zelllinien abgezogen. Die hinteren Diagramm-Balken geben die Werte der unstimulierten, die vorderen die der stimulierten Zellen wieder.

NB-Zelllinien: SKN-SY5Y, NMB, SKN-SH, SKN-AS, SKN-BE, CHP212, IMR 5-75, Kelly, IMR 32

Kontroll-Zelllinie: H460

5.4.3 APRIL- und BAFF- Sekretion von NB-Zelllinien

Für die Bestimmung der APRIL- und BAFF-Sekretion von NB-Zelllinien wurden die kommerziell erhältliche APRIL- und BAFF-ELISA Kits „human APRIL ELISA® BMS2008“ der Firma Bender MedSystems und „Quantikine® Human BAFF/BLyS“ der Firma R & D Systems verwendet (4.2.7). Die Messungen wurde mit dem ELISA-Reader BEP 2000 Advance bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge 650 nm) durchgeführt. Von jeder Probe wurde eine Doppelbestimmung gemessen, die OD-Werte gemittelt und die Konzentration mit Hilfe einer Verdünnungsreihe des im Kit mitgeliefertem APRIL- bzw. BAFF- Standards (Konzentration bekannt) berechnet. Die Standard-Verdünnungsreihe wurde

für jede Messung neu angesetzt und ebenfalls als Doppelbestimmung mitgeführt (Abb.22 bzw. 28).

5.4.3.1 Basale APRIL- und BAFF- Sekretion

Die Sekretion von APRIL und BAFF wurde mittels ELISA analysiert. Neun verschiedene NB-Zelllinien (SKN-SH, SKN-SY5Y, NMB, LAN1, LAN5, ACN, GIMEN, HTLA230, SKN-BE) und eine Kontroll-Zelllinie (H460) wurden kultiviert und die Überstände gesammelt. Als nächstes wurden unter Verwendung der Zell-Überstände APRIL- und BAFF-ELISA durchgeführt und die APRIL- und BAFF-Konzentrationen mit Hilfe von Standard-Verdünnungsreihen bestimmt (siehe 5.3).
Eine basale Sekretion von APRIL und BAFF konnte weder für eine der NB-Zelllinien, noch für die Kontroll-Zelllinie nachgewiesen werden.

5.4.3.2 APRIL- Sekretion nach Stimulation mit IFN-γ

Nachdem eine Sekretion von APRIL weder für eine der neun untersuchten NB-Zelllinien, noch für die Kontroll-Zelllinie nachgewiesen werden konnte, wurden drei NB-Zelllinien (SKN-SH, SKN-SY5Y, NMB) sowie die Kontroll-Zelllinie (H460) mit IFN-γ stimuliert und die Überstände nach drei, vier und sieben Tagen gesammelt. Mit den Zellüberständen wurde zur APRIL-Konzentrationsbestimmung ein ELISA durchgeführt.
Eine APRIL-Sekretion von einer der NB-Zelllinien oder von der Kontroll-Zelllinie konnte auch nach Stimulation mit IFN-γ nicht gemessen werden.

5.4.3.3 BAFF- Sekretion nach Stimulation mit IFN-γ

Eine BAFF- Sekretion konnte, wie oben erwähnt, weder für eine der neun getesteten NB-Zelllinien, noch für die Kontroll-Zellline gemessen werden. Deshalb wurden drei NB-Zellinien (SKN-SH, SKN-SY5Y, NMB) und die Kontroll-Zelllinie H460 mit IFN-γ stimuliert und die Überstände, wie für die Bestimmung der APRIL-Sekretion nach drei, vier und sieben

Tagen gesammelt. Mit den Zellüberständen wurde zur BAFF-Konzentrationsbestimmung ein ELISA durchgeführt.

Ein Nachweis von sezerniertem BAFF bei einer der drei NB-Zelllinien war auch nach Stimulation mit IFN-γ nicht möglich. Die BAFF-Konzentration im Zellüberstand der Kontroll-Zelllinie lag vor der Stimulation mit IFN-γ unter der Nachweisgrenze. Nach der Stimulation mit IFN-γ konnte die Sekretion von BAFF nachgewiesen werden. Nach einer Stimulationsdauer von drei Tagen wurde eine BAFF-Konzentration von 106,55 pg/ml gemessen, nach vier Tagen Stimulation wurde eine BAFF-Konzentration von 159,86 pg/ml und nach einer sieben-tägigen Stimulationsdauer konnten 158,41 pg/ml BAFF im Zell-Überstand gemessen werden.

5.4.4 Zusammenfassung

In den Tab.19 und 20 wurden die Ergebnisse der Bestimmung der APRIL-, BAFF- und BAFF-R Expression und zur Sekretion von APRIL und BAFF durch NB- und Kontroll-Zelllinien zusammengefasst.

Eine APRIL-Expression wurde sowohl für alle getesteten NB-Zelllinien, als auch für die Kontroll-Zelllinien nachgewiesen. Eine Stimulation mit IFN-γ hatte keine Erhöhung der APRIL-Expression zur Folge. Eine Sekretion von APRIL konnte weder basal noch nach Stimulation mit IFN-γ nachgewiesen werden (Tab.19).

Eine Oberflächen-Expression von BAFF-R konnte auf keiner NB-Zelllinie und auch nicht auf der Kontroll-Zelllinie gezeigt werden (Tab.19).

Eine BAFF-Expression konnte für fast alle NB-Zelllinien auf Protein-Ebene nachgewiesen werden, aber nur für eine der zwei getesteten Kontroll-Zelllinien. BAFF-RNA wurde sowohl bei allen getesteten NB-Zelllinien, als auch bei den Kontroll-Zelllinien nachgewiesen. Allerdings wurde in den meisten NB-Zelllinien eine erhöhte Menge BAFF-RNA transkribiert, verglichen mit den Kontroll-Zelllinien. Eine BAFF-Sekretion konnte auch nach der Stimulation mit IFN-γ für keine NB-Zelllinie nachgewiesen werden. Die Kontroll-Zelllinie H460 sekretierte ohne vorherige Stimulation keine nachweisbare Menge BAFF, aber nach der Stimulation mit IFN-γ konnte BAFF im Zellüberstand gemessen werden. Nach einer Stimulation mit IFN-γ wurde auf Protein-Ebene weder bei den NB-Zelllinien, noch bei der Kontroll-Zelllinie eine erhöhte Menge intrazellulär exprimiertes BAFF gefunden verglichen mit der BAFF-Menge unstimulierter Zellen. Auf RNA-Ebene konnte eine deutliche

Transkriptions-Steigerung des BAFF-Gens bei zwei NB-Zelllinien und der Kontroll-Zelllinie nachgewiesen werden. Eine schwache Transkriptions-Erhöhung des BAFF-Gens wurde bei zwei weiteren NB-Zelllinien gezeigt (Tab.20).

Zelllinie	APRIL					BAFF-R	
	Basal			+ IFN-γ		Basal	+ IFN-γ
	Expression		Sekretion	Expression	Sekretion	Expression	
	FACS	WB	ELISA	FACS	ELISA	FACS	FACS
Kontr.:							
H460	+	(+)	-	-	-	-	-
HEK		+					
NB:							
SKN-BE	+	+	-	-		-	-
SKN-AS	+	+		-		-	-
IMR 5-75	+	+		-		-	-
CHP212	+	+		-		-	-
NMB	+	+	-	-	-	-	-
SKN-SY5Y	+	+	-	-	-	-	-
Kelly	+	+		-		-	-
IMR 32	+	+		-		-	-
SKN-SH	+	+	-	-	-	-	-
ACN		+	-				
GIMEN		+	-				
LAN 5		+	-				
LAN 1			-				
HTLA 230			-				

Tabelle 19: Zusammenfassung der Versuchs-Ergebnisse zur Bestimmung der Expression und Sekretion von APRIL und BAFF-R

Basal = Expression/Sekretion von APRIL bzw. BAFF-R ohne Stimulation, + =Expression/Sekretion nachgewiesen, (+) = Expression/Sekretion nur schwach nachweisbar, - = keine Expression/Sekretion nachweisbar, nicht ausgefüllt = keine Messung durchgeführt

+IFN-γ = Expression/Sekretion von APRIL bzw. BAFF-R nach Stimulation mit IFN-γ, + = Expressions-/Sekretions-Steigerung nach Stimulation mit IFN-γ, - = keine Expressions-/Sekretions-Steigerung nach Stimulation mit IFN-γ

FACS = Ergebnisse der Durchflusszytometrie, WB = Ergebnisse des WesternBlots, ELISA = Ergebnisse des APRIL-ELISA

Zelllinie	BAFF						
	Basal				+ IFN-γ		
	Expression			Sekretion	Expression		Sekretion
	FACS	WB	Realtime-PCR	ELISA	FACS	Realtime-PCR	ELISA
Kontrollen:							
H460	-	-	(+)	-	-	+	+
HEK		+	(+)				
NB:							
SKN-BE	+	+	+	-	-	-	
SKN-AS	+	+	+		-	+	
IMR 5-75	+	+	+		-	(+)	
CHP212	+	+	+		-	+	
NMB	+	+	+	-	-	-	-
SKN-SY5Y	+	+	+	-	-	-	-
Kelly	+	+	+		-	-	
IMR 32	+	+	+		-	(+)	
SKN-SH	+	+	+	-	-	-	-
ACN		-	+	-			
GIMEN		+	+	-			
LAN 5		+	+	-			
LAN 1				-			
HTLA 230				-			

Tabelle 20: Zusammenfassung der Versuchs-Ergebnisse zur Bestimmung der Expression und Sekretion von BAFF

Basal = Expression/Sekretion von BAFF ohne Stimulation, + =Expression/Sekretion nachgewiesen, (+) = Expression/Sekretion nur schwach nachweisbar, - = keine Expression/Sekretion nachweisbar, nicht ausgefüllt = keine Messung durchgeführt

+IFN-γ = Expression/Sekretion von BAFF nach Stimulation mit IFN-γ, + = Expressions-/Sekretions-Steigerung nach Stimulation mit IFN-γ, - = keine Expressions-/Sekretions-Steigerung nach Stimulation mit IFN-γ

FACS = Ergebnisse der Durchflußzytometrie, WB = Ergenisse des WesternBlots, ELISA = Ergebnisse des BAFF-ELISA

6. Diskussion

6.1 IgG-Subklassen Verteilung der Auto-Antikörper von OMS-Patienten

In dieser Studie wurde die IgG-Subklassen Verteilung der Auto-Antikörper (Auto-AK) von OMS-Patienten analysiert. Es wurde festgestellt, dass die nachgewiesenen Auto-AK, welche sowohl an intrazelluläre als auch an Oberflächenepitope von cerebellären Neuronen binden, hauptsächlich zur IgG-Subklasse 3 gehören. In weiteren Versuchen konnte ausgeschlossen werden, dass diese Daten aufgrund einer erhöhten Menge IgG 3 des Gesamt-IgG der Seren von OMS-Patienten resultierten.

Die Hypothese, dass das kindliche OMS das Resultat einer Autoimmunerkrankung ist, stützt sich u.a. darauf, dass bei einigen dieser Patienten Auto-AK gefunden wurden. Anti-Neurofilament-AK, Purkinjezell-AK und anti-Hu AK wurden bei OMS-Patienten nachgewiesen (Connolly 1997, Korfei 2005, Noetzel 1987, Pranzatelli 2002). Anti-Ri AK konnten bisher nur beim adulten OMS festgestellt werden, ein gemeinsames Auto-Antigen konnte bisher beim pädiatrischen OMS noch nicht identifiziert werden (Anderson 1988, Antunes 2000, Bataller 2003, Luque 1991, Pranzatelli 2002). Kürzlich wurden Oberflächenbindende Auto-AK gegen Granularisneurone beschrieben, wobei einige der OMS-Patienten AK gegen dasselbe Oberflächenepitop gebildet hatten (Blaes 2005). Einige IgG-Fraktionen von OMS-Patienten zeigten sogar eine Bindung an Neuroblastom (NB)-Zellen und induzierten pro-apoptotische Effekte in diesen Zellen (Korfei 2005).

Neben der Auto-Antikörper-Produktion sprechen aber auch noch andere Resultate dafür, dass OMS durch eine Störung des Immunsystems entsteht. So sprechen OMS-Patienten sehr gut auf die Behandlung mit Immunsuppressiva an und zeigen entzündliche Veränderungen im Liquor (Pranzatelli 1996).

Eine weitere Autoimmunerkrankung, welche bei Kindern auftritt, ist Typ-I-Diabetes. Bei Patienten mit dieser Erkrankung wurden genau wie bei Kindern mit OMS verschiedene Auto-AK gefunden. Die Auto-AK der Typ-I-Diabetes Patienten sind allerdings gegen Antigene der Inselzellen gerichtet. Diese Auto-AK gehören größtenteils der IgG1-Subklasse an (Hoppu 2004, Fuchtenbusch 2000, Bonifacio 1999). Die Reihenfolge gestaffelt nach der Menge der

zugehörigen Auto-AK bei Typ-I-Diabetes war IgG1 > IgG3 > IgG2 > IgG4 (Hillmann 2004). Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten OMS-Patienten gehörten die nachgewiesenen Auto-AK hauptsächlich zur IgG3-Subklasse gefolgt von IgG1 und IgG2. Autoantikörper, die der IgG4-Subklasse angehören, konnten mit keiner der verwendeten Methoden detektiert werden.

Eine IgG-Subklassen Analyse wurde auch bei verschiedenen adulten Patienten mit paraneoplastischen neurlogischen Syndromen (PNS) durchgeführt (Jean 1994, Greenlee 2001, Blaes 2002, Bernal 2003, Amyes 2001, Futei 2003). Die dominierende Subklasse von anti-Hu Antikörpern von Patienten mit PNS sind IgG1 und IgG3 (Jean 1994, Greenlee 2001). Interessanterweise zeigte sich bei der Untersuchung der Subklassen-Verteilung des Gesamt-IgG bei diesen Patienten eine Verlagerung von IgG1 zu IgG2 (Blaes 2002). In Patienten mit einer paraneoplastischen cerebellären Degeneration und mit der Hodgkins-Krankheit wurden anti-Tr Auto-AK gefunden, welche hauptsächlich zu den Subklassen IgG1 und IgG3 gehörten (Bernal 2003). Ebenfalls wurden anti-Yo AK bei Patienten mit einer paraneoplastischen cerebellären Degeneration identifiziert, welche größtenteils der IgG1-Subklasse angehörten (Amyes 2001). In dermatologischen paraneoplastischen Autoimmunerkrankungen, wie z.B. Pumphigus, gehörten die identifizierten Auto-AK ebenfalls hauptsächlich zur IgG-Subklasse 1. Die nächstkleinere Menge dieser Auto-AK waren allerdings keine IgG3- sondern IgG2-AK (Futei 2003). Im Gegensatz zu anderen kindlichen Autoimmunerkrankungen und adulten Formen von paraneoplastischen neurologischen Syndromen dominieren bei den Auto-AK der kindlichen OMS-Patienten die IgG3-Antikörper. Dies scheint eine Besonderheit von Tumor-assoziierten (paraneoplastischen) Erkrankungen zu sein.

Die Subklassen-Analyse von Auto-AK kann zusätzliche Informationen über die Natur der Auto-Antigene liefern und über mögliche pathogene Mechanismen. An Protein-Antigene binden vermehrt IgG1 und IgG3, an Polysaccharid-Antigene vorwiegend IgG2 und teilweise IgG1, IgG4 richtet sich gegen polyvalente Antigene (Thomas 1984, Maguire 2002). Die menschlichen IgG-Subklassen haben verschiedene Fc-Regionen, was zu unterschiedlichen funktionellen Effekten der IgG-Subklassen führt, u.a. weil sie von unterschiedlichen Immuneffektorzellen erkannt werden (Jefferis 1994, Burton 1986). Die Fc-Bereiche von IgG1 und IgG3 werden u.a. von Fc-Rezeptoren der Phagozyten erkannt, wie z.B. Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und auch NK-Zellen (Jefferis 1995). Diese Zellen binden an IgG-markierte Krankheitserreger bzw. Zellen und nehmen diese auf.

Die Tatsache, dass die Autoantikörper von OMS-Patienten hauptsächlich zur IgG3-Subklasse gehören und in geringerer Menge IgG1-Antikörper sind, zeigt, dass eine Immunreaktion gegen Protein-Antigene wahrscheinlicher ist als gegen Glykolipid-Antigene. Außerdem legen diese Ergebnisse nahe, dass die Autoantikörper von OMS-Patienten eine Erhöhung der Zell-vermittelten Lyse zur Folge haben können.

Es wurden bereits verschiedene als Auto-Antigene in Frage kommende Antigene identifiziert, u.a. durch das Erstellen einer Hirnstamm-cDNA-Bibliothek und der Detektion mit mehreren OMS-Seren (Connolly 1997, Bataller 2003). In einem kompetitiven Bindungs-Assay konnte gezeigt werden, dass einige OMS-Seren um dasselbe Antigen-Epitop konkurrieren (Blaes 2005). Durch eine zweidimensionale-Gelelektrophorese, mit anschließendem WesternBlot und der Detektion von Antigenen durch Seren verschiedener pädiatrischer OMS-Patienten und der anschließenden Identifikation dieser Antigene mittels Massenspektroskopie wurden bereits zwei neue Auto-Antigene identifiziert: α-Enolase und KSRP (RNA-bindendes Protein) (Kirsten 2007). Beides sind glykolytische Enzyme, welche von neuronalen Zellen exprimiert werden (Bergmann 2005). Bisher konnte jedoch kein allgemeines Auto-Antigen gefunden werden. In weiteren Versuchen könnten die bei der Massenspektroskopie identifizierten und ebenfalls als Antigene in Frage kommenden Proteine näher analysiert werden. Dazu könnten die Proteingene in Vektoren kloniert, in Bakterien exprimiert und daraus isoliert werden. Mit den aufgereinigten Proteinen könnte ein ELISA etabliert werden mit dem die Bindung der AK möglichst viele Seren von OMS-Patienten überprüft werden könnte.

6.2 Erhöhte NK-Zell vermittelte Lyse von NB-Zellen durch IgG von OMS-Patienten verglichen mit Kontroll-IgG

NK-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr. Sie identifizieren und lysieren körperfremde, infizierte und schädliche Zellen mit zwei verschiedenen Wirkmechanismen. NK-Zellen erkennen veränderte MHC I Expression und Antikörper-beladener Zellen (ADCC) (Wu 2003, Graziano 1987). Es konnte u.a. gezeigt werden, dass NK-Zellen bei der Abwehr und Zerstörung von Tumorgewebe entscheidend mitwirken (Moretta 2004, Tonn 2001, Trinchieri 1989). Eine NK-Zell vermittelte Lyse von NB-Zellen konnte nicht nur an

verschiedenen NB-Zelllinien nachgewiesen, sondern auch mit frisch isolierten NB-Zellen gezeigt werden (Castriconi 2004).

Etwa 50% der kindlichen OMS-Fälle sind mit einem Neuroblastom assoziiert (Solomon 1968). OMS-Patienten haben AK, welche an die Oberfläche von NB-Zellen binden (Blaes 2005, Korfei 2005). Dieses Ergebnis konnte auch mit der hier verwendeten NB-Zelllinie Kelly reproduziert werden.

Ein Ziel dieser Arbeit war der Nachweis einer Verstärkung der NK-Zell vermittelten Lyse von NB-Zellen ausschließlich durch das IgG von kindlichen OMS-Patienten. Dazu mussten zuerst optimale Versuchbedingungen für einen geeigneten Zytotoxizitäts-Assay entwickelt werden.

6.2.1 Etablierung eines Zytotoxizitäts-Assays zur Ermittlung der NK-Zell vermittelten Lyse von NB-Zellen

Zytotoxizitäts-Assays können für unterschiedliche Fragestellungen Antworten liefern. So wurden sie beispielweise eingesetzt, um die zytotoxische Wirkung von peripheren mononuklearen Blutzellen (Peripheral Blood Mononuclear Cell = PBMC) auf Körperzellen nachzuweisen, um die Wirkungsweise von NK-Zellen weiter zu untersuchen und um die Zytotoxizitäts-steigernde Wirkung von bestimmten Proteinen auf NK-Zellen menschlicher Zellen darzustellen (Konstantinidis 2005, Xu 1999, Zeng 2006). Auch bei der Bestimmung der NK-Zell Aktivierung und die durch diese ausgelöste Lyse von Tumorzellen haben sich Zytotoxizitäts-Assays bei verschiedene Studien bereits bewährt (Armeanu 2005, Jaharian 2007, Wei 2000).

Zur optimalen Bestimmung der NK-Zell vermittelten Lyse von NB-Zellen wurden die Versuchsbedingungen variiert und die beste Kombinationen für die folgenden Versuche ausgewählt.

In mehreren Veröffentlichungen wurden unterschiedliche Verhältnisse von Ziel- zu Effektor-Zellen untersucht und die Ergebnisse gezeigt (Armeanu 2005, Jaharian 2007, Konstantinidis 2005, Liang 2005, Romanski 2005, Wei 2000, Zeng 2006). Deshalb wurden bei der Etablierung des Versuchs in der vorliegenden Arbeit verschiedene Zielzell/Effektorzell-Verhältnisse getestet. Als optimal für die Versuche dieser Studie erwies sich ein Verhältnis von Ziel- zu Effektorzellen von 1/5.

Neben dem Zellverhältnis wurde auch die Zellzahl variiert, um ein gutes Versuchsergebnis zu erzielen. In der Literatur wurden verschiedene Testverfahren zur Zytotoxizitäts-Messung

verwendet, welche auf unterschiedlichen Prinzipien beruhen. Sehr häufig wurde eine Ziel-Zellzahl von 5 x 10^3 Zielzellen/Well einer 96Well-Platte bevorzugt, aber es wurden auch 10^4 Zielzellen/Well verwendet (Jarahian 2007, Liang 2005, Armeanu 2005, Wei 2000, Zeng 005). Für die Versuche dieser Studie mit Patienten-IgG und dem LDH-Assay zeigte eine Zellzahl von 10^4 Zielzellen/Well einer 96Well-Platte die besten Resultate.

Des Weiteren wurden unterschiedliche Inkubationszeiten ausgetestet, weil sich in einer Veröffentlichung von Zeng et al. gezeigt hat, dass diese relevant für die Resultate sind (Zeng 2005).

In verschiedenen Zytotoxizitäts-Studien wurde die NK92-Zelllinie als Effektorzellen verwendet, andere Arbeitsgruppen zogen primäre NK-Zellen von gesunden Spendern vor (Armeanu 2005, Gong 1994, Jaharian 2007, Konstantinidis 2005, Liang 2005, Zeng 2006). In dieser Arbeit wurde die Etablierung der Versuche zunächst mit NK92-Zellen durchgeführt. Bei einem späteren Vergleich der NK92-Zelllinie mit primären NK-Zellen stellte sich heraus, dass die Verstärkung der Lyse von NB-Zellen durch an diese bindende AK mit primären NK-Zellen wesentlich deutlicher ist als bei Verwendung der NK92-Zelllinie. Aus diesem Grund wurden bei den Versuchen mit Patienten-IgG primäre NK-Zellen verwendet.

Die bereits in mehreren Veröffentlichungen erfolgreich bei Zytotoxizitäts-Assays verwendeten AK ch14.18 wurden für Etablierungsversuche und später als zusätzliche Positivkontrolle verwendet (Zeng 2006, Chen 2000). Ch14.18 bindet an membranständiges Glykolipid-Antigen Gangliosid GD_2, welches in großer Menge von NB-Zellen, von gesundem Gewebe, wie z.B. das periphere Nervensystem oder das Kleinhirn, aber nur sehr begrenzt exprimiert wird. Dieser AK eignet sich deshalb zur Etablierung der Versuchsbedingungen, weil bekannt ist, dass Auto-AK von OMS-Patienten ebenfalls an NB-Zellen binden (Blaes 2005, Korfei 2005). Ch14.18 soll auch als Krebstherapie für Patienten mit einem NB eingesetzt werden, klinische Studien dazu wurden u.a. mit Kindern bereits durchgeführt (Gilman 2009, Handgretinger 1995, Simon 2004, Uttenreuther-Fischer 1995, Yu 1998). Hierbei scheint die für die Behandlung eingesetzte AK-Konzentration eine wichtige Rolle zu spielen (Gilman 2009, Handgretinger R, 1995, Ozkaynak MF, 1998). Eine für die geplanten Versuche geeignete IgG-Konzentration wurde erst mit dem an NB-Zellen bindenen ch14.18 AK untersucht und später exemplarisch mit einer Patienten-IgG-Probe und einer Kontroll-IgG-Probe optimiert.

6.2.2 Veränderung der Zytotoxizität durch Zugabe von Patienten-IgG

2005 konnte von Zeng et al. gezeigt werden, dass der gegen NB-Zellen gerichtete AK ch14.18 die Lyse der NB-Zellen durch NK-Zellen verstärken kann (Zeng 2005). Im Serum einiger OMS-Patienten wurden ebenfalls AK gefunden, die NB-Zellen binden (Blaes 2005, Korfei 2005). In einem ersten Versuch konnte dies in dieser Arbeit bestätigt werden. Hierzu wurde aufgereinigtes IgG von OMS-Patienten und NB-Zellen der im weiteren Verlauf der Versuche verwendeten NB-Zelllinie Kelly verwendet. Zur Kontrolle wurde IgG von gesunden Patienten verwendet. Zur Ermittlung der gebundenen AK wurden die Zellen zusätzlich mit einem fluoreszenzmarkierten AK inkubiert, welche dann mit einem Durchflusszytometer detektiert werden konnten. Das IgG wurde mittels Säulenchromatographie aus den Seren der Patienten aufgereinigt.

Nach der erfolgreichen Optimierung der Versuchsbedingungen des LDH-Assays wurde dieser mit dem aufgereinigten Patienten-IgG durchgeführt. Bei den Vorversuchen mit dem AK ch14.18 hatte sich gezeigt, dass durch eine zu hohe AK-Konzentration die NK-Zell Aktivierung herabsetzt wird. Ein ähnliches Ergebnis allerdings in wesentlich geringerer Deutlichkeit lässt sich auch in der Literatur finden (Zeng 2005). Die verschiedenen Isolierungsmethoden der NK-Zellen könnten eine Rolle für die unterschiedliche Sensitivität spielen. Aufgrund der hier vorgelegten sehr deutlichen Ergebnisse wurde eine IgG-Konzentration von 0,2µg/ml verwendet. Diese wurde höher gewählt als die optimale ch14.18-Konzentration, weil es sich um Gesamt-IgG handelte und nicht nur um die an NB-Zellen bindenden AK.

Bei einem ähnlichen Versuchsaufbau eines Zytotoxizitäts-Assay mit dem Serum und dem IgG von Patienten mit Myasthenia Gravis, einer weiteren Autoimmunerkrankung, konnte bereits eine deutliche Erhöhung der Zytotoxizität nachgewiesen werden (Xu 1999). In dieser Studie wurden allerdings keine aufgereinigten NK-Zellen, sondern PBMCs verwendet. Bei dem Vergleich der Wirkung der Seren mit der Wirkung von aufgereinigtem IgG auf die Zytotoxizität zeigte sich, dass neben dem IgG weitere Komponenten im Serum der Patienten Einfluss auf die Stärke der Zytotoxizität von PBMC auf Muskelzellen haben. Es wurde vermutet, dass dabei IgM sowie verschiedene ins Serum sezernierte Zytokine eine wichtige Rolle spielen, welche u.a. auch die NK-Zell-Aktivität erhöhen.

Die Aktivierung der Antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) wird durch verschiedene IgG-Subklassen unterschiedlich stark erhöht. So aktiviert IgG3 die ADCC von

NK-Zellen stärker als die anderen drei IgG-Subklassen, IgG1 hat aber noch eine größere Wirkung als IgG4 und IgG2 (Michaelsen 1992). Auch zwei weitere Veröffentlichungen bestätigen, dass IgG3 und IgG1 eine bedeutend größere Rolle bei der Aktivierung der ADCC spielen als IgG2 und IgG4 (Saalman 1995, Guo 1997). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die IgG-Subklassen 3 und 1 bei pädiatrischen Patienten mit OMS überwiegen. Mit den in dieser Arbeit durchgeführten Zytotoxizitäts-Versuchen konnte gezeigt werden, dass durch die an NB-Zellen bindenen AK von OMS-Patienten im Vergleich zu dem IgG gesunder Kontroll-Patienten die NK-Zell vermittelte Lyse von NB-Zellen deutlich gesteigert wird. Diese Ergebnisse bestätigen die Untersuchungen von Michaelsen et al. in der Annahme, dass IgG der Subklassen 3 und 1 einen stärken Einfluss auf die Aktivierung der ADCC von NK-Zellen haben als IgG der Subklassen 2 und 4, welche im Serum von OMS-Patienten kaum nachgewiesen werden konnten (Michaelsen 1992).
Eine Korrelation der Oberflächenbindung des IgGs von OMS-Patienten an NB-Zellen mit der im Zytotoxizitäts-Assay ermittelten Lyse von NB-Zellen konnte nicht gezeigt werden. Dies könnte an der eingesetzten evtl. noch zu hohen Konzentration von IgG liegen. Durch eine zu hohe IgG-Konzentration können relativ hohe unspezifische Bindungen entstehen. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass nicht alle bindenden AK auch einen Effekt auf die ADCC haben müssen.
Abschließend kann festgestellt werden, dass NK-Zellen an der Eliminierung von NB-Zellen bei kindlichen OMS-Patienten maßgeblich beteiligt sind.

In weiteren Versuchen sollte die NK-Zell vermittelte Lyse von NB-Zellen durch IgG von OMS-Patienten zusätzlich noch mit der durch IgG von NB-Patienten verglichen werden. Eine vorherige Stimulation der NK-Zellen mit Zytokinen könnte evtl. die Ergebnisse dieser Studie noch verdeutlichen.
Es könnte auch interessant sein in die in dieser Arbeit etablierten Versuche statt IgG Serum einzusetzen und die Ergebnisse mit den IgG-Werten zu vergleichen. Dies könnte zeigen, ob neben dem IgG auch andere Komponenten der Seren wie z.B. IgM Einfluss auf die Zytotoxizität haben. Die Ergebnisse einer Veröffentlichung von 1999, bei der ein ähnlicher Versuchsaufbau verwendet wurde, zeigen eine deutlich erhöhte Zytotoxizität bei Verwendung von Serum im Vergleich zu aufgereinigtem IgG der gleichen Patienten (Xu 1999).
Bei anderen Autoimmunerkrankungen, z.B. Myasthenia Gravis, konnten funktionell defekte NK-Zellen nachgewiesen werden (Liu 2006, Nguyen 2006). Deshalb wäre es durchaus interessant auch die NK-Zellen von OMS-Patienten auf ihre Funktionalität zu untersuchen.

6.3 BAFF- und APRIL-Konzentrationen im Serum und Liquor von OMS-Patienten

Wie bereits erwähnt deutet vieles darauf hin, dass OMS eine immun-vemittelte Erkrankung ist (Pranzatelli 1996). Eine humorale Autimmunität bei OMS-Patienten konnte von verschiedenen Autoren gezeigt werden (Connolly 1997, Korfei 2005, Noetzel 1987, Pranzatelli 2002, Blaes 2005). Auch haben OMS-Patienten eine B-Zell-dominante Immunantwort im Liquor (Pranzatelli 2004). Wegen der geringen Anzahl an B-Zellen im Liquor und der begrenzten Liquor-Menge bei Kindern ist eine durchflusszytometrische Analyse der B-Zellen im Liquor schwierig. Deshalb wurde ein weiterer verlässlicher Marker der B-Zell Aktivität im Liquor gesucht.

Vor kurzem wurden zwei Proteine identifiziert, welche auf das Überleben und die Differenzierung von B-Zellen Einfluss nehmen, BAFF und APRIL (Castigli 2005). Ebenfalls können BAFF und APRIL den Isotypenwechsel der Immunglobuline auf B-Zellen auslösen (Castigli 2005). Jedes der beiden Proteine bindet an drei spezifische Rezeptoren, welche hauptsächlich von B-Zellen exprimiert werden (Kalled 2005). APRIL bindet an BCMA, TACI und Proteoglykane, BAFF an BCMA, TACI und BAFF-R. BAFF wie auch APRIL sind involviert bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen. Unter anderem wurden erhöhte Konzentrationen beider Proteine im Serum von Sjögrens-Syndrom-Patienten gefunden (Jonsson 2005). Besonders BAFF scheint eine sehr große Rolle bei der Autoimmun-Pathogenese zu spielen, APRIL ist hier, wenn überhaupt, nur in geringem Ausmaß beteiligt. Dies konnte durch unsere Daten bestätigt werden, einen Unterschied in der APRIL-Konzentration im Liquor oder Serum von OMS-Patienten zu Kontroll-Patienten konnte nicht festgestellt werden.

Im Tiermodell induziert eine Überexpression von BAFF Autoimmunerkrankungen (Strohl 2005). Eine erhöhte Menge BAFF wurde nicht nur bei Patienten mit dem Sjögrens-Syndrom, sondern u.a. auch bei verschiedenen rheumatischen Autoimmunerkrankungen gefunden und zusätzlich konnte in diesem Fall eine Korrelation mit der Menge an Auto-AK gezeigt werden (Mariette (Ann Med Interne) 2003, Matsushita 2007). Innerhalb der vorliegenden Arbeit konnte keine Erhöhung der BAFF-Konzentration im Serum von Kindern mit OMS detektiert werden. Es wurde jedoch eine Erhöhung der Liquor/Serum Ratio von BAFF gezeigt. Dass diese Erhöhung auf eine Störung der Blut-Hirn Schranke zurückzuführen ist, konnte experimentell ausgeschlossen werden. Bei Kindern mit entzündlichen Erkrankungen, bei

denen die Liquor/Serum Ratio von BAFF ebenfalls erhöht war, konnte eine Störung der Blut-Hirn Schranke nachgewiesen werden. Aufgrund einer Störung der Blut-Hirn Schranke kann ein passiver Transfer vom Serum in den Liquor stattfinden. Weil dies aber für OMS-Patienten ausgeschlossen werden konnte liegt die Vermutung nahe, dass die erhöhte Konzentration von BAFF im Liquor durch eine intrathekale Synthese zustande kam. Abschließend konnte auch eine Korrelation zwischen der BAFF-Menge und der Menge an Auto-AK im Liquor von OMS-Patienten nachgewiesen werden, welche an die Oberfläche von Granularisneuronen binden. Diese Ergebnisse bestätigen die Resultate einer Studie von Pranzatelli *et al.*, in der eine überwiegende B-Zell Antwort im Liquor, aber nicht im Serum von OMS-Patienten gezeigt wurde (Pranzatelli 2004). In einer vor kurzem veröffentlichten Studie konnte gezeigt werden, dass die BAFF-Konzentration im Liquor und die Höhe der Liquor/Serum Ratio von BAFF von der Art der Behandlung der OMS-Patienten abhängig ist. Durch eine Behandlung mit ACTH oder Kortikosteroiden wird die BAFF-Konzentration bei Kindern mit OMS gesenkt. Kinder, die in Intervallen mit IvIg behandelt wurden hatten höhere BAFF-Konzentrationen im Liquor (Pranzatelli 2008).

Eine Aktivierung des BAFF-Systems, wie sie innerhalb der vorliegenden Arbeit im Liquor von pädiatrischen OMS-Patienten gezeigt werden konnte, wurde auch in Multiple-Sklerose-Läsionen beobachtet. In aktiven Läsionen konnte eine hohe BAFF-Expression von Astrozyten gezeigt werden (Krumbholz 2005). Die starke Assoziation zwischen der BAFF-Konzentration im Liquor und der Menge von Auto-AK im Liquor deutet darauf hin, dass eine quantitative Analyse von BAFF als stellvertretender Marker für die Aktivierung des B-Zell Systems in OMS-Patienten dienen kann.

In dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass einige OMS-Patienten aufgrund einer intrathekalen BAFF-Synthese eine erhöhte BAFF-Konzentration im Liquor aufweisen. Die APRIL-Konzentrationen von OMS-Patienten unterscheiden sich weder im Serum noch im Liquor von denen gesunder Kontroll-Patienten. Bei Kindern mit einer entzündlichen ZNS-Erkrankung wurde im Liquor ebenfalls eine erhöhte BAFF-Menge gemessen. Aufgrund einer deutlichen Störung der Blut-Hirn-Schranke bei Kindern mit entzündlichen ZNS-Erkrankungen muss man annehmen, dass die BAFF-Erhöhung im Liquor bei diesen Kindern durch einen passiven Übertritt aus dem Serum zustande kam. Des Weiteren zeigte sich bei den OMS-Kindern eine Korrelation zwischen der Konzentration von Auto-AK gegen Kleinhirnneurone und der Höhe der BAFF Liquor/Serum Ratio. Dies deutet darauf hin, dass BAFF intrathekal produziert wird und dass bei OMS-Patienten im Liquor überwiegend eine B-Zell Aktivierung stattfindet.

6.4 Expression und Synthese von BAFF, APRIL und BAFF-R durch Neuroblastomzellen

Im vorherigen Abschnitt 6.3 wurden die Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich der Konzentrationen von BAFF und APRIL in Serum und Liquor von OMS-Patienten diskutiert. Es ist bekannt, dass APRIL, BAFF und ihre Rezeptoren nicht nur von Immunzellen exprimiert und synthetisiert werden, sondern u.a. auch von Tumorzellen (Novak und Grote 2004, Novak und Darce 2004, Fu 2006, Kelly 2000, Roth 2001). BAFF steigert, u.a. durch die Bindung an den von B-Zellen auf ihrer Oberfläche exprimierten BAFF-Rezeptor BAFF-R, die Überlebensrate von B-Zellen, ohne BAFF findet keine B-Zellentwicklung statt (Avery 2003, Gross 2001, Rolink 2002, Schiemann 2001, Schneider 1999, Shulga-Monskaya 2004, Thompson 2001, Yan 2001, Yan 2000). APRIL spielt hauptsächlich für das Überleben von Plasmazellen eine Rolle (O´Connor 2004, Avery 2003, Ingold 2005). Ein Neuroblastom scheint die Autoimmun-Erkankung OMS bei Kindern auslösen zu können (Rudnick 2001, Pranzatelli 1996, Dale 2003, De Luca 2002, Solomon 1968). Da in Neuroblastomen von pädiatrischen OMS-Patienten vermehrt B-Zell Follikel gefunden wurden, lag die Vermutung nahe, dass auch NB-Zellen BAFF, APRIL oder ihre Rezeptoren exprimieren, welche maßgeblich am Überleben von B-Zellen beteiligt sind (Gambini 2003, Schneider 1999, Yan 2000, Yu 2000). Aus diesem Grund war ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Überprüfung der Expression von BAFF, APRIL und BAFF-R sowie der Sekretion von APRIL und BAFF durch NB-Zellen. Um ein eindeutiges Ergebnis zu erhalten wurde nicht nur eine, sondern je nach Fragestellung und Methode 9-13 verschiedene NB-Zelllinien untersucht. Bei allen Untersuchungen wurde mindestens eine Kontroll-Zelllinie mitgeführt, um einen Vergleichswert zu erhalten.

Zur Untersuchung der Transkription des BAFF-Gens wurde eine Realtime-PCR verwendet. BAFF-RNA konnte sowohl in den getesteten NB-Zelllinien, wie auch in den Kontroll-Zelllinien nachgewiesen werden. Bei 11 von 12 NB-Zelllinien konnte verglichen mit den Kontroll-Zelllinien eine erhöhte Transkription des BAFF-Gens gezeigt werden.

Um zu überprüfen, ob die transkribierte BAFF-RNA auch translatiert wird und zum Nachweis von APRIL und BAFF-R wurde die Durchflusszytometrie verwendet. In einigen Studien wurde diese Methode bereits erfolgreich zum extrazellulären Nachweis von BAFF-R und zum extrazellulären Bindungsnachweis von BAFF durchgeführt (Craxton 2005, Gorelik 2004, Hase 2004, Matsushita 2006). BAFF-R wurde in dieser Arbeit ebenfalls extrazellulär mit dem

Durchflusszytometer gemessen, um eine Expression von BAFF und APRIL durch NB-Zellen zu zeigen wurde eine intrazelluläre Färbung durchgeführt. Zur Kontrolle der Ergebnisse wurde für BAFF und APRIL zusätzlich ein Western Blot durchgeführt. Mit beiden Methoden wurden BAFF-Proteine in fast allen NB-Zelllinien nachgewiesen, bei einer von zwei Kontroll-Zelllinien wurden keine BAFF-Proteine gefunden. Eine APRIL-Expression wurde nicht nur bei allen getesteten NB-Zellen nachgewiesen, sondern auch bei beiden Kontroll-Zelllinien. Diese Ergebnisse bestätigen die Resultate verschiedener Autoren, dass auch Tumorzellen, z.B. B-Zell und Mantel-Lymphome und maligne Gliomzellen, BAFF oder APRIL exprimieren können (Novak und Grote 2004, Fu 2006, Kelly 2000, Roth 2001). Eine Oberflächen-Expression von BAFF-R konnte weder bei den NB-Zelllinien noch bei den Kontroll-Zelllinien gezeigt werden. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnte bei anderen Tumorzellen, z.B. bei einem Myelom und bei unterschiedlichen Lymphomen, eine Oberflächen-Expression der drei BAFF-Rezeptoren BAFF-R, TACI und BCMA nachgewiesen werden (Novak und Grote 2004, Novak und Darce 2004). Im Weiteren wäre es interessant die Oberflächenexpression der beiden anderen BAFF-Rezeptoren TACI und BCMA auf NB-Zellen zu überprüfen.
Zum Nachweis einer BAFF- bzw. APRIL-Sekretion wurde ein ELISA durchgeführt. Diese Methode hat sich in der Vergangenheit zum Nachweis dieser Proteine im Serum und Liquor von Patienten sowie zur Messungen der Proteinkonzentration von Zellkulturüberständen bewährt (Ittah 2006, Krumbholz 2005). Eine Sekretion von BAFF und APRIL konnte weder bei NB-Zelllinien noch bei einer der Kontroll-Zelllinien nachgewiesen werden.
Somit konnte zwar gezeigt werden, dass NB-Zelllinien BAFF und APRIL intrazellulär exprimieren, allerdings scheinen sie diese nicht zu sezernieren.

Die Expression sowie die Freisetzung von BAFF und APRIL wird von verschiedenen Zytokinen beeinflusst. Bei einigen BAFF-produzierenden Zell-Typen (myeloide Zellen, Speicheldrüsen-Epithelzellen und Astrozyten) konnte durch eine Stimulation mit IFNγ die BAFF-Expression gesteigert werden (Nardelli 2001, Craxton 2003, Scapini 2003, Litinskiy 2002, Ittah 2006, Krumbholz 2005). Deshalb wurden im Anschluss an die Untersuchung der basalen Expression und Sekretion von BAFF, APRIL und BAFF-R, NB-Zellen mit IFNγ stimuliert. Dadurch sollte überprüft werden, ob auch NB-Zellen auf die Behandlung mit IFNγ mit einer Steigerung der BAFF- und APRIL-Expression oder mit einer erhöhten BAFF-R-Expression reagieren.

Durch die IFNγ-Stimulation konnte eine Transkriptionssteigerung des BAFF-Gens bei vier NB-Zelllinien sowie der Kontroll-Zelllinie nachgewiesen werden. Auch bei anderen Zelltypen konnte durch eine solche Behandlung ein erhöhte Menge BAFF-RNA detektiert werden (Scapini 2003, Ittah 2006, Krumbholz 2005). Intrazellulär wurde bei keiner der getesteten NB- und Kontroll-Zelllinien eine erhöhte Konzentration des BAFF-Proteins gefunden. Sezerniertes BAFF konnte auch nach einer IFNγ-Stimulation in keinem Überstand der NB-Zelllinien nachgewiesen werden, allerdings bei der Kontroll-Zelllinie. Wie bereits erwähnt konnte bei anderen Zelltypen durch eine IFNγ-Stimulation eine erhöhte Freisetzung von BAFF bewirkt werden (Nardelli 2001). Bei Astrozyten führte eine Stimulation mit IFNγ und TNFα zu einer messbar erhöhten BAFF-Sekretion (Krumbholz 2005). Eine Behandlung mit TNFα kann allerdings auch zur Apoptose der Zellen führen. Es ist deshalb schwer sicherzustellen, dass die in den Überständen ermittelten BAFF-Konzentration wirklich durch Sekretion zustande kommen. Eine Stimulation mit IFNα oder Interleukinen könnte auch zu einer erfolgreichen Transkriptions-, Expressions- und Sekretions-Steigerung von BAFF führen.

Die Stimulation mit IFNγ hatte keine Steigerung der APRIL-Expression zur Folge, auch die Sekretion von APRIL durch die NB-Zelllinien oder die Kontroll-Zelllinie konnte nicht induziert werden. Die Verwendung eines anderen Zytokins oder einer Doppelstimulation zur Erhöhung der Expression und Sekretion von APRIL könnte auch hier in Erwägung gezogen werden.

Eine Expression von BAFF-R auf der Zelloberfläche konnte durch die IFNγ-Stimulation nicht induziert werden. Weil BAFF-R aber hauptsächlich von B-Zellen auf der Zelloberfläche exprimiert wird, war dieses Ergebnis eher erwartet.

7. Zusammenfassung

Das pädiatrische Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom (OMS) ist eine seltene neurologische Erkrankung mit Augenbewegungs- und Koordinationsstörungen, die oft in Zusammenhang mit Neuroblastomen (NB) als paraneolastisches Syndrom auftritt. Nachdem im Serum einiger Patienten auch Auto-Antikörper (Auto-AK) gegen Oberflächenepitope von NB-Zellen und Kleinhirnneuronen nachgewiesen wurden, wird eine Autoimmunpathogenese des OMS diskutiert. Ein gemeinsames Auto-Antigen konnte bisher noch nicht identifiziert werden.

Zur Eingrenzung der möglichen Auto-Antigene wurde in der vorliegenden Arbeit zuerst eine IgG-Subklassen-Analyse durchgeführt. Sowohl die Auto-AK gegen intrazelluläre als auch gegen Oberflächen-Epitope von zerebellären Neuronen gehörten hauptsächlich zur IgG-Subklasse 3 und IgG-Subklasse 1, was auf ein Protein-Antigen hindeutet.

IgG1 und IgG3 werden u.a. von Makrophagen und NK-Zellen erkannt. Da OMS-Patienten eine bessere Prognose hinsichtlich des zugrunde liegenden Tumorleides haben, wurde postuliert, dass die Auto-AK von OMS-Patienten eine Erhöhung der NK-vermittelten Tumorzelllyse zur Folge haben. Wenn NB-Zellen vor der Ko-Kultivierung mit NK-Zellen mit OMS-IgG inkubiert wurden, war eine signifikante Steigerung der Zytotoxizität nachweisbar (Zytotoxizität: gesunde Kontroll-Patienten = 34,02 %, OMS-Patienten = 53,09 %; $p < 0,005$).

OMS-Patienten zeigen im Liquor hauptsächlich eine B-Zell Antwort. Wegen der geringen Anzahl B-Zellen im Liquor ist eine durchflusszytometrische Analyse der B-Zellen im Liquor schwierig und die Liquor-Menge bei Kleinkindern ist limitiert. Deshalb wurde ein weiterer verlässlicher Marker der B-Zell Aktivität im Liquor gesucht.

Einiges deutet darauf hin, dass an der Entstehung von Autoimmunerkrankungen zwei Proteine der Tumor-Nekrose-Faktor-Familie (TNF-Familie) beteiligt sind, BAFF (B-Zell aktivierender Faktor aus der TNF-Familie) und APRIL (A proliferation inducing ligand). Beide Proteine wirken in unterschiedlichem Maße an der Entwicklung und dem Überleben von B-Zellen mit.

Ich konnte eine erhöhte BAFF-Konzentration im Liquor von OMS-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen nachweisen (Mittelwerte: GK = 0,09 ng/ml, OMS = 0,36 ng/ml). Da bei den OMS-Patienten keine Störung der Blut-Hirn-Schranke nachweisbar war, muss die erhöhte Menge BAFF intrathekal produziert worden sein. Die APRIL-Konzentrationen von OMS-Patienten unterschieden sich nicht von denen gesunder Kontroll-Patienten. Weitere Versuche zeigten, dass eine Korrelation zwischen den Oberflächen-bindenen AK gegen

Kleinhirnneurone mit der BAFF-Konzentration im Liquor bestand. Dies macht eine quantitative Analyse von BAFF als stellvertretendem Marker für die Aktivierung des B-Zell Systems in OMS-Patienten möglich.

Es ist bekannt, dass APRIL, BAFF und ihre Rezeptoren von Immunzellen sowie Tumorzellen exprimiert und synthetisiert werden. Die Neuroblastome von pädiatrischen OMS-Patienten enthalten vermehrt aktive Lymphfollikel, die vorwiegend B-Zellen enthalten. Daher wurde die Synthese und die Sekretion von BAFF und APRIL, sowie die Oberflächenexpression von BAFF-R durch NB-Zellen überprüft. Es konnte sowohl für NB- als auch für Kontroll-Zelllinien eine Synthese von APRIL gezeigt werden. Eine Sekretion von APRIL konnte bei keiner der getesteten Zelllinien nachgewiesen werden. BAFF wurde von fast allen getesteten NB-Zelllinien synthetisiert, aber nur von einer der zwei Kontoll-Zelllinien. BAFF-RNA konnte sowohl bei allen getesteten NB-Zelllinien, als auch bei den Kontroll-Zelllinien nachgewiesen werden, wobei im Schnitt die Menge an BAFF-RNA in NB-Zelllinien höher war als in den Kontroll-Zelllinien. Eine BAFF-Sekretion oder eine Oberflächen-Expression von BAFF-R konnte in keiner NB-Zelllinie gemessen werden. Eine Stimulation von NB-Zellen mit dem proinfammatorischen Zytokin Interferon (IFN)-γ hatte keine Erhöhung der APRIL-Expression zur Folge. Die Sekretion von APRIL und BAFF konnte nach Stimulation mit IFN-γ bei keiner NB-Zelllinie nachgewiesen werden, obwohl auf RNA-Ebene eine Transkriptions-Steigerung des BAFF-Gens bei vier NB-Zelllinien nachgewiesen werden konnte. Allerdings wurde weder bei den NB-, noch bei der Kontroll-Zelllinie eine erhöhte Menge intrazellulär exprimiertes BAFF gefunden. Auch eine Expression von BAFF-R auf der Zelloberfläche konnte durch die IFNγ-Stimulation nicht induziert werden.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass beim pädiatrischen OMS vorwiegend Oberflächen-bindende Auto-AK der Subklassen IgG1 und IgG3 vorliegen, welche die NK-Zell-vermittelte Tumorzelllyse von NB-Zellen steigern können. Diese Auto-AK korrelieren im Liquor mit der Konzentration des B-Zell-aktivierenden Faktors BAFF, der möglicherweise als Surrogatmarker für die Aktivität des B-Zell-Systems im Liquor geeignet ist.

8. Literaturverzeichnis

1. **Aggarwal, B. B.** 2003. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. Nat Rev Immunol **3:**745-56.
2. **Altman, A. J., and R. L. Baehner.** 1976. Favorable prognosis for survival in children with coincident opso-myoclonus and neuroblastoma. Cancer **37:**846-52.
3. **Amanna, I. J., K. Clise-Dwyer, F. E. Nashold, K. A. Hoag, and C. E. Hayes.** 2001. Cutting edge: A/WySnJ transitional B cells overexpress the chromosome 15 proapoptotic Blk gene and succumb to premature apoptosis. J Immunol **167:**6069-72.
4. **Amyes, E., J. Curnow, Z. Stark, L. Corlett, I. Sutton, and A. Vincent.** 2001. Restricted IgG1 subclass of anti-Yo antibodies in paraneoplastic cerebellar degeneration. J Neuroimmunol **114:**259-64.
5. **Anderson, N. E., C. Budde-Steffen, M. K. Rosenblum, F. Graus, D. Ford, B. J. Synek, and J. B. Posner.** 1988. Opsoclonus, myoclonus, ataxia, and encephalopathy in adults with cancer: a distinct paraneoplastic syndrome. Medicine (Baltimore) **67:**100-9.
6. **Andersson, J., A. Coutinho, W. Lernhardt, and F. Melchers.** 1977. Clonal growth and maturation to immunoglobulin secretion in vitro of every growth-inducible B lymphocyte. Cell **10:**27-34.
7. **Antunes, N. L., Y. Khakoo, K. K. Matthay, R. C. Seeger, D. O. Stram, E. Gerstner, L. E. Abrey, and J. Dalmau.** 2000. Antineuronal antibodies in patients with neuroblastoma and paraneoplastic opsoclonus-myoclonus. J Pediatr Hematol Oncol **22:**315-20.
8. **Armeanu, S., M. Bitzer, U. M. Lauer, S. Venturelli, A. Pathil, M. Krusch, S. Kaiser, J. Jobst, I. Smirnow, A. Wagner, A. Steinle, and H. R. Salih.** 2005. Natural killer cell-mediated lysis of hepatoma cells via specific induction of NKG2D ligands by the histone deacetylase inhibitor sodium valproate. Cancer Res **65:**6321-9.
9. **Avery, D. T., S. L. Kalled, J. I. Ellyard, C. Ambrose, S. A. Bixler, M. Thien, R. Brink, F. Mackay, P. D. Hodgkin, and S. G. Tangye.** 2003. BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. J Clin Invest **112:**286-97.
10. **Baker, K. P., B. M. Edwards, S. H. Main, G. H. Choi, R. E. Wager, W. G. Halpern, P. B. Lappin, T. Riccobene, D. Abramian, L. Sekut, B. Sturm, C. Poortman, R. R. Minter, C. L. Dobson, E. Williams, S. Carmen, R. Smith, V. Roschke, D. M. Hilbert, T. J. Vaughan, and V. R. Albert.** 2003. Generation and characterization of LymphoStat-B, a human monoclonal antibody that antagonizes the bioactivities of B lymphocyte stimulator. Arthritis Rheum **48:**3253-65.
11. **Balazs, M., F. Martin, T. Zhou, and J. Kearney.** 2002. Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. Immunity **17:**341-52.
12. **Bannish, G., E. M. Fuentes-Panana, J. C. Cambier, W. S. Pear, and J. G. Monroe.** 2001. Ligand-independent signaling functions for the B lymphocyte

antigen receptor and their role in positive selection during B lymphopoiesis. J Exp Med **194:**1583-96.

13. **Barao, I., and J. L. Ascensao.** 1998. Human natural killer cells. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) **46:**213-29.
14. **Bataller, L., M. R. Rosenfeld, F. Graus, J. J. Vilchez, N. K. Cheung, and J. Dalmau.** 2003. Autoantigen diversity in the opsoclonus-myoclonus syndrome. Ann Neurol **53:**347-53.
15. **Batten, M., J. Groom, T. G. Cachero, F. Qian, P. Schneider, J. Tschopp, J. L. Browning, and F. Mackay.** 2000. BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes. J Exp Med **192:**1453-66.
16. **Benner, R., W. Hijmans, and J. J. Haaijman.** 1981. The bone marrow: the major source of serum immunoglobulins, but still a neglected site of antibody formation. Clin Exp Immunol **46:**1-8.
17. **Bergmann, S., M. Rohde, K. T. Preissner, and S. Hammerschmidt.** 2005. The nine residue plasminogen-binding motif of the pneumococcal enolase is the major cofactor of plasmin-mediated degradation of extracellular matrix, dissolution of fibrin and transmigration. Thromb Haemost **94:**304-11.
18. **Bernal, F., S. Shams'ili, I. Rojas, R. Sanchez-Valle, A. Saiz, J. Dalmau, J. Honnorat, P. Sillevis Smitt, and F. Graus.** 2003. Anti-Tr antibodies as markers of paraneoplastic cerebellar degeneration and Hodgkin's disease. Neurology **60:**230-4.
19. **Biron, C. A., K. B. Nguyen, G. C. Pien, L. P. Cousens, and T. P. Salazar-Mather.** 1999. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. Annu Rev Immunol **17:**189-220.
20. **Bischof, D., S. F. Elsawa, G. Mantchev, J. Yoon, G. E. Michels, A. Nilson, S. L. Sutor, J. L. Platt, S. M. Ansell, G. von Bulow, and R. J. Bram.** 2006. Selective activation of TACI by syndecan-2. Blood **107:**3235-42.
21. **Blaes, F., V. Fuhlhuber, M. Korfei, M. Tschernatsch, W. Behnisch, K. Rostasy, B. Hero, M. Kaps, and K. T. Preissner.** 2005. Surface-binding autoantibodies to cerebellar neurons in opsoclonus syndrome. Ann Neurol **58:**313-7.
22. **Blaes, F., M. Klotz, D. Funke, M. Strittmatter, J. Kraus, and M. Kaps.** 2002. Disturbance in the serum IgG subclass distribution in patients with anti-Hu positive paraneoplastic neurological syndromes. Eur J Neurol **9:**369-72.
23. **Blain, P. G., S. Nightingale, and J. C. Stoddart.** 1982. Strychnine poisoning: abnormal eye movements. J Toxicol Clin Toxicol **19:**215-7.
24. **Bodmer, J. L., P. Schneider, and J. Tschopp.** 2002. The molecular architecture of the TNF superfamily. Trends Biochem Sci **27:**19-26.
25. **Bonci, D., M. Hahne, N. Felli, C. Peschle, and R. De Maria.** 2004. Potential role of APRIL as autocrine growth factor for megakaryocytopoiesis. Blood **104:**3169-72.
26. **Bonifacio, E., M. Scirpoli, K. Kredel, M. Fuchtenbusch, and A. G. Ziegler.** 1999. Early autoantibody responses in prediabetes are IgG1 dominated and suggest antigen-specific regulation. J Immunol **163:**525-32.
27. **Bossen, C., and P. Schneider.** 2006. BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling. Semin Immunol **18:**263-75.
28. **Braxton, D. B., M. Williams, D. Kamali, S. Chin, R. Liem, and N. Latov.** 1989. Specificity of human anti-neurofilament autoantibodies. J Neuroimmunol **21:**193-203.
29. **Bubenik, J.** 2004. MHC class I down-regulation: tumour escape from immune surveillance? (review). Int J Oncol **25:**487-91.

30. **Burton, D. R., L. Gregory, and R. Jefferis.** 1986. Aspects of the molecular structure of IgG subclasses. Monogr Allergy **19:**7-35.
31. **Carswell, E. A., L. J. Old, R. L. Kassel, S. Green, N. Fiore, and B. Williamson.** 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. Proc Natl Acad Sci U S A **72:**3666-70.
32. **Castigli, E., S. Scott, F. Dedeoglu, P. Bryce, H. Jabara, A. K. Bhan, E. Mizoguchi, and R. S. Geha.** 2004. Impaired IgA class switching in APRIL-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A **101:**3903-8.
33. **Castigli, E., S. A. Wilson, S. Scott, F. Dedeoglu, S. Xu, K. P. Lam, R. J. Bram, H. Jabara, and R. S. Geha.** 2005. TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells. J Exp Med **201:**35-9.
34. **Castriconi, R., A. Dondero, M. V. Corrias, E. Lanino, D. Pende, L. Moretta, C. Bottino, and A. Moretta.** 2004. Natural killer cell-mediated killing of freshly isolated neuroblastoma cells: critical role of DNAX accessory molecule-1-poliovirus receptor interaction. Cancer Res **64:**9180-4.
35. **Chen, R. L., C. P. Reynolds, and R. C. Seeger.** 2000. Neutrophils are cytotoxic and growth-inhibiting for neuroblastoma cells with an anti-GD2 antibody but, without cytotoxicity, can be growth-stimulating. Cancer Immunol Immunother **48:**603-12.
36. **Chicheportiche, Y., P. R. Bourdon, H. Xu, Y. M. Hsu, H. Scott, C. Hession, I. Garcia, and J. L. Browning.** 1997. TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. J Biol Chem **272:**32401-10.
37. **Cohen, W. J., and N. H. Cohen.** 1974. Lithium carbonate, haloperidol, and irreversible brain damage. JAMA **230:**1283-7.
38. **Coico, R. F., B. S. Bhogal, and G. J. Thorbecke.** 1983. Relationship of germinal centers in lymphoid tissue to immunologic memory. VI. Transfer of B cell memory with lymph node cells fractionated according to their receptors for peanut agglutinin. J Immunol **131:**2254-7.
39. **Connolly, A. M., A. Pestronk, S. Mehta, M. R. Pranzatelli, 3rd, and M. J. Noetzel.** 1997. Serum autoantibodies in childhood opsoclonus-myoclonus syndrome: an analysis of antigenic targets in neural tissues. J Pediatr **130:**878-84.
40. **Cooper, M. A., T. A. Fehniger, and M. A. Caligiuri.** 2001. The biology of human natural killer-cell subsets. Trends Immunol **22:**633-40.
41. **Cooper, M. A., T. A. Fehniger, S. C. Turner, K. S. Chen, B. A. Ghaheri, T. Ghayur, W. E. Carson, and M. A. Caligiuri.** 2001. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. Blood **97:**3146-51.
42. **Craxton, A., K. E. Draves, A. Gruppi, and E. A. Clark.** 2005. BAFF regulates B cell survival by downregulating the BH3-only family member Bim via the ERK pathway. J Exp Med **202:**1363-74.
43. **Craxton, A., D. Magaletti, E. J. Ryan, and E. A. Clark.** 2003. Macrophage- and dendritic cell--dependent regulation of human B-cell proliferation requires the TNF family ligand BAFF. Blood **101:**4464-71.
44. **Cyster, J. G., K. M. Ansel, K. Reif, E. H. Ekland, P. L. Hyman, H. L. Tang, S. A. Luther, and V. N. Ngo.** 2000. Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles. Immunol Rev **176:**181-93.
45. **Dale, R. C.** 2003. Childhood opsoclonus myoclonus. Lancet Neurol **2:**270.

46. **Dalmau, J., F. Graus, M. K. Rosenblum, and J. B. Posner.** 1992. Anti-Hu--associated paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuronopathy. A clinical study of 71 patients. Medicine (Baltimore) **71:**59-72.
47. **Davies, D. R., and H. Metzger.** 1983. Structural basis of antibody function. Annu Rev Immunol **1:**87-117.
48. **De Luca, S., C. Terrone, S. Crivellaro, A. De Zan, P. Polo, M. C. Vigliani, and A. Tizzani.** 2002. Opsoclonus-myoclonus syndrome as a paraneoplastic manifestation of renal cell carcinoma. a case report and review of the literature. Urol Int **68:**206-8.
49. **Do, R. K., E. Hatada, H. Lee, M. R. Tourigny, D. Hilbert, and S. Chen-Kiang.** 2000. Attenuation of apoptosis underlies B lymphocyte stimulator enhancement of humoral immune response. J Exp Med **192:**953-64.
50. **Edelman, G. M.** 1991. Antibody structure and molecular immunology. Scand J Immunol **34:**1-22.
51. **Ertle, F., W. Behnisch, N. A. Al Mulla, M. Bessisso, D. Rating, G. Mechtersheimer, B. Hero, and A. E. Kulozik.** 2008. Treatment of neuroblastoma-related opsoclonus-myoclonus-ataxia syndrome with high-dose dexamethasone pulses. Pediatr Blood Cancer **50:**683-7.
52. **Erttmann, R., T. Tafese, F. Berthold, R. Kerbl, J. Mann, L. Parker, F. Schilling, P. Ambros, H. Christiansen, M. Favrot, H. Kabisch, B. Hero, and T. Philip.** 1998. 10 years' neuroblastoma screening in Europe: preliminary results of a clinical and biological review from the Study Group for Evaluation of Neuroblastoma Screening in Europe (SENSE). Eur J Cancer **34:**1391-7.
53. **Farag, S. S., T. A. Fehniger, L. Ruggeri, A. Velardi, and M. A. Caligiuri.** 2002. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. Blood **100:**1935-47.
54. **Farina, C., F. Aloisi, and E. Meinl.** 2007. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. Trends Immunol **28:**138-45.
55. **Fearon, D. T., and R. M. Locksley.** 1996. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. Science **272:**50-3.
56. **Fisher, P. G., D. S. Wechsler, and H. S. Singer.** 1994. Anti-Hu antibody in a neuroblastoma-associated paraneoplastic syndrome. Pediatr Neurol **10:**309-12.
57. **Fu, L., Y. C. Lin-Lee, L. V. Pham, A. Tamayo, L. Yoshimura, and R. J. Ford.** 2006. Constitutive NF-kappaB and NFAT activation leads to stimulation of the BLyS survival pathway in aggressive B-cell lymphomas. Blood **107:**4540-8.
58. **Fuchtenbusch, M., K. Kredel, E. Bonifacio, O. Schnell, and A. G. Ziegler.** 2000. Exposure to exogenous insulin promotes IgG1 and the T-helper 2-associated IgG4 responses to insulin but not to other islet autoantigens. Diabetes **49:**918-25.
59. **Futei, Y., M. Amagai, T. Hashimoto, and T. Nishikawa.** 2003. Conformational epitope mapping and IgG subclass distribution of desmoglein 3 in paraneoplastic pemphigus. J Am Acad Dermatol **49:**1023-8.
60. **Gambini, C., M. Conte, G. Bernini, P. Angelini, A. Pession, P. Paolucci, A. Donfrancesco, E. Veneselli, K. Mazzocco, G. P. Tonini, L. Raffaghello, C. Dominici, A. Morando, F. Negri, A. Favre, B. De Bernardi, and V. Pistoia.** 2003. Neuroblastic tumors associated with opsoclonus-myoclonus syndrome: histological, immunohistochemical and molecular features of 15 Italian cases. Virchows Arch **442:**555-62.

61. **Gaur, U., and B. B. Aggarwal.** 2003. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. Biochem Pharmacol **66:**1403-8.
62. **Gavin, A. L., D. Ait-Azzouzene, C. F. Ware, and D. Nemazee.** 2003. DeltaBAFF, an alternate splice isoform that regulates receptor binding and biopresentation of the B cell survival cytokine, BAFF. J Biol Chem **278:**38220-8.
63. **Gavin, A. L., B. Duong, P. Skog, D. Ait-Azzouzene, D. R. Greaves, M. L. Scott, and D. Nemazee.** 2005. deltaBAFF, a splice isoform of BAFF, opposes full-length BAFF activity in vivo in transgenic mouse models. J Immunol **175:**319-28.
64. **Gilman, A. L., M. F. Ozkaynak, K. K. Matthay, M. Krailo, A. L. Yu, J. Gan, A. Sternberg, J. A. Hank, R. Seeger, G. H. Reaman, and P. M. Sondel.** 2009. Phase I study of ch14.18 with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2 in children with neuroblastoma after autologous bone marrow transplantation or stem-cell rescue: a report from the Children's Oncology Group. J Clin Oncol **27:**85-91.
65. **Gobin, S. J., and P. J. van den Elsen.** 2000. Transcriptional regulation of the MHC class Ib genes HLA-E, HLA-F, and HLA-G. Hum Immunol **61:**1102-7.
66. **Gong, J. H., G. Maki, and H. G. Klingemann.** 1994. Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. Leukemia **8:**652-8.
67. **Gorelik, L., A. H. Cutler, G. Thill, S. D. Miklasz, D. E. Shea, C. Ambrose, S. A. Bixler, L. Su, M. L. Scott, and S. L. Kalled.** 2004. Cutting edge: BAFF regulates CD21/35 and CD23 expression independent of its B cell survival function. J Immunol **172:**762-6.
68. **Gorelik, L., K. Gilbride, M. Dobles, S. L. Kalled, D. Zandman, and M. L. Scott.** 2003. Normal B cell homeostasis requires B cell activation factor production by radiation-resistant cells. J Exp Med **198:**937-45.
69. **Gras, M. P., Y. Laabi, G. Linares-Cruz, M. O. Blondel, J. P. Rigaut, J. C. Brouet, G. Leca, R. Haguenauer-Tsapis, and A. Tsapis.** 1995. BCMAp: an integral membrane protein in the Golgi apparatus of human mature B lymphocytes. Int Immunol **7:**1093-106.
70. **Graziano, R. F., and M. W. Fanger.** 1987. Fc gamma RI and Fc gamma RII on monocytes and granulocytes are cytotoxic trigger molecules for tumor cells. J Immunol **139:**3536-41.
71. **Greenlee, J. E., J. W. Boyden, M. Pingree, H. R. Brashear, S. A. Clawson, and P. M. Keeney.** 2001. Antibody types and IgG subclasses in paraneoplastic neurological syndromes. J Neurol Sci **184:**131-7.
72. **Groom, J., S. L. Kalled, A. H. Cutler, C. Olson, S. A. Woodcock, P. Schneider, J. Tschopp, T. G. Cachero, M. Batten, J. Wheway, D. Mauri, D. Cavill, T. P. Gordon, C. R. Mackay, and F. Mackay.** 2002. Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjogren's syndrome. J Clin Invest **109:**59-68.
73. **Gross, J. A., S. R. Dillon, S. Mudri, J. Johnston, A. Littau, R. Roque, M. Rixon, O. Schou, K. P. Foley, H. Haugen, S. McMillen, K. Waggie, R. W. Schreckhise, K. Shoemaker, T. Vu, M. Moore, A. Grossman, and C. H. Clegg.** 2001. TACI-Ig neutralizes molecules critical for B cell development and autoimmune disease. impaired B cell maturation in mice lacking BLyS. Immunity **15:**289-302.

74. **Gross, J. A., J. Johnston, S. Mudri, R. Enselman, S. R. Dillon, K. Madden, W. Xu, J. Parrish-Novak, D. Foster, C. Lofton-Day, M. Moore, A. Littau, A. Grossman, H. Haugen, K. Foley, H. Blumberg, K. Harrison, W. Kindsvogel, and C. H. Clegg.** 2000. TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. Nature **404:**995-9.

75. **Guo, J., J. C. Jaume, B. Rapoport, and S. M. McLachlan.** 1997. Recombinant thyroid peroxidase-specific Fab converted to immunoglobulin G (IgG) molecules: evidence for thyroid cell damage by IgG1, but not IgG4, autoantibodies. J Clin Endocrinol Metab **82:**925-31.

76. **Hahne, M., T. Kataoka, M. Schroter, K. Hofmann, M. Irmler, J. L. Bodmer, P. Schneider, T. Bornand, N. Holler, L. E. French, B. Sordat, D. Rimoldi, and J. Tschopp.** 1998. APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth. J Exp Med **188:**1185-90.

77. **Han, W., J. Mou, J. Sheng, J. Yang, and Z. Shao.** 1995. Cryo atomic force microscopy: a new approach for biological imaging at high resolution. Biochemistry **34:**8215-20.

78. **Handgretinger, R., K. Anderson, P. Lang, R. Dopfer, T. Klingebiel, M. Schrappe, P. Reuland, S. D. Gillies, R. A. Reisfeld, and D. Neithammer.** 1995. A phase I study of human/mouse chimeric antiganglioside GD2 antibody ch14.18 in patients with neuroblastoma. Eur J Cancer **31A:**261-7.

79. **Hardy, R. R., C. E. Carmack, S. A. Shinton, J. D. Kemp, and K. Hayakawa.** 1991. Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. J Exp Med **173:**1213-25.

80. **Hase, H., Y. Kanno, M. Kojima, K. Hasegawa, D. Sakurai, H. Kojima, N. Tsuchiya, K. Tokunaga, N. Masawa, M. Azuma, K. Okumura, and T. Kobata.** 2004. BAFF/BLyS can potentiate B-cell selection with the B-cell coreceptor complex. Blood **103:**2257-65.

81. **Hendriks, J., L. Planelles, J. de Jong-Odding, G. Hardenberg, S. T. Pals, M. Hahne, M. Spaargaren, and J. P. Medema.** 2005. Heparan sulfate proteoglycan binding promotes APRIL-induced tumor cell proliferation. Cell Death Differ **12:**637-48.

82. **Hero, B., N. Graf, T. Simon, A. Weirich, J. Troger, and F. Berthold.** 2002. Neuroblastoma preoperatively treated as nephroblastoma: does inadequate therapy worsen the prognosis? Klin Padiatr **214:**157-61.

83. **Hersh, B., J. Dalmau, F. Dangond, S. Gultekin, E. Geller, and P. Y. Wen.** 1994. Paraneoplastic opsoclonus-myoclonus associated with anti-Hu antibody. Neurology **44:**1754-5.

84. **Hillman, M., C. Torn, H. Thorgeirsson, and M. Landin-Olsson.** 2004. IgG4-subclass of glutamic acid decarboxylase antibody is more frequent in latent autoimmune diabetes in adults than in type 1 diabetes. Diabetologia **47:**1984-9.

85. **Hoppu, S., M. S. Ronkainen, T. Kimpimaki, S. Simell, S. Korhonen, J. Ilonen, O. Simell, and M. Knip.** 2004. Insulin autoantibody isotypes during the prediabetic process in young children with increased genetic risk of type 1 diabetes. Pediatr Res **55:**236-42.

86. **Horwitz, D. A., J. D. Gray, K. Ohtsuka, M. Hirokawa, and T. Takahashi.** 1997. The immunoregulatory effects of NK cells: the role of TGF-beta and implications for autoimmunity. Immunol Today **18:**538-42.

87. **Hsu, B. L., S. M. Harless, R. C. Lindsley, D. M. Hilbert, and M. P. Cancro.** 2002. Cutting edge: BLyS enables survival of transitional and mature B cells through distinct mediators. J Immunol **168:**5993-6.

88. **Huard, B., L. Arlettaz, C. Ambrose, V. Kindler, D. Mauri, E. Roosnek, J. Tschopp, P. Schneider, and L. E. French.** 2004. BAFF production by antigen-presenting cells provides T cell co-stimulation. Int Immunol **16:**467-75.
89. **Huard, B., P. Schneider, D. Mauri, J. Tschopp, and L. E. French.** 2001. T cell costimulation by the TNF ligand BAFF. J Immunol **167:**6225-31.
90. **Ingold, K., A. Zumsteg, A. Tardivel, B. Huard, Q. G. Steiner, T. G. Cachero, F. Qiang, L. Gorelik, S. L. Kalled, H. Acha-Orbea, P. D. Rennert, J. Tschopp, and P. Schneider.** 2005. Identification of proteoglycans as the APRIL-specific binding partners. J Exp Med **201:**1375-83.
91. **Ito, M.** 1984. The modifiable neuronal network of the cerebellum. Jpn J Physiol **34:**781-92.
92. **Ittah, M., C. Miceli-Richard, J. Eric Gottenberg, F. Lavie, T. Lazure, N. Ba, J. Sellam, C. Lepajolec, and X. Mariette.** 2006. B cell-activating factor of the tumor necrosis factor family (BAFF) is expressed under stimulation by interferon in salivary gland epithelial cells in primary Sjogren's syndrome. Arthritis Res Ther **8:**R51.
93. **Jarahian, M., C. Watzl, Y. Issa, P. Altevogt, and F. Momburg.** 2007. Blockade of natural killer cell-mediated lysis by NCAM140 expressed on tumor cells. Int J Cancer **120:**2625-34.
94. **Jean, W. C., J. Dalmau, A. Ho, and J. B. Posner.** 1994. Analysis of the IgG subclass distribution and inflammatory infiltrates in patients with anti-Hu-associated paraneoplastic encephalomyelitis. Neurology **44:**140-7.
95. **Jefferis, R., J. Lund, and M. Goodall.** 1995. Recognition sites on human IgG for Fc gamma receptors: the role of glycosylation. Immunol Lett **44:**111-7.
96. **Jefferis, R., J. Pound, J. Lund, and M. Goodall.** 1994. Effector mechanisms activated by human IgG subclass antibodies: clinical and molecular aspects. Review article. Ann Biol Clin (Paris) **52:**57-65.
97. **Jonsson, M. V., P. Szodoray, S. Jellestad, R. Jonsson, and K. Skarstein.** 2005. Association between circulating levels of the novel TNF family members APRIL and BAFF and lymphoid organization in primary Sjogren's syndrome. J Clin Immunol **25:**189-201.
98. **Kalled, S. L.** 2005. The role of BAFF in immune function and implications for autoimmunity. Immunol Rev **204:**43-54.
99. **Kalled, S. L., C. Ambrose, and Y. M. Hsu.** 2005. The biochemistry and biology of BAFF, APRIL and their receptors. Curr Dir Autoimmun **8:**206-42.
100. **Karpusas, M., T. G. Cachero, F. Qian, A. Boriack-Sjodin, C. Mullen, K. Strauch, Y. M. Hsu, and S. L. Kalled.** 2002. Crystal structure of extracellular human BAFF, a TNF family member that stimulates B lymphocytes. J Mol Biol **315:**1145-54.
101. **Kee, B. L., and C. J. Paige.** 1995. Murine B cell development: commitment and progression from multipotential progenitors to mature B lymphocytes. Int Rev Cytol **157:**129-79.
102. **Kelly, K., E. Manos, G. Jensen, L. Nadauld, and D. A. Jones.** 2000. APRIL/TRDL-1, a tumor necrosis factor-like ligand, stimulates cell death. Cancer Res **60:**1021-7.
103. **Kern, C., J. F. Cornuel, C. Billard, R. Tang, D. Rouillard, V. Stenou, T. Defrance, F. Ajchenbaum-Cymbalista, P. Y. Simonin, S. Feldblum, and J. P. Kolb.** 2004. Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway. Blood **103:**679-88.
104. **Khare, S. D., I. Sarosi, X. Z. Xia, S. McCabe, K. Miner, I. Solovyev, N. Hawkins, M. Kelley, D. Chang, G. Van, L. Ross, J. Delaney, L. Wang, D.**

Lacey, W. J. Boyle, and H. Hsu. 2000. Severe B cell hyperplasia and autoimmune disease in TALL-1 transgenic mice. Proc Natl Acad Sci U S A **97:**3370-5.

105. **Kinsbourne, M.** 1962. Myoclonic encephalopathy of infants. J Neurol Neurosurg Psychiatry **25:**271-276.
106. **Kirsten, A., S. Beck, V. Fuhlhuber, M. Kaps, T. Kreutz, M. Korfei, S. Schmitt, K. T. Preissner, and F. Blaes.** 2007. New autoantibodies in pediatric opsoclonus myoclonus syndrome. Ann N Y Acad Sci **1110:**256-60.
107. **Koh, P. S., J. G. Raffensperger, S. Berry, M. B. Larsen, H. S. Johnstone, P. Chou, S. R. Luck, M. Hammer, and S. L. Cohn.** 1994. Long-term outcome in children with opsoclonus-myoclonus and ataxia and coincident neuroblastoma. J Pediatr **125:**712-6.
108. **Konstantinidis, K. V., E. Alici, A. Aints, B. Christensson, H. G. Ljunggren, and M. S. Dilber.** 2005. Targeting IL-2 to the endoplasmic reticulum confines autocrine growth stimulation to NK-92 cells. Exp Hematol **33:**159-64.
109. **Korfei, M., V. Fuhlhuber, T. Schmidt-Woll, M. Kaps, K. T. Preissner, and F. Blaes.** 2005. Functional characterisation of autoantibodies from patients with pediatric opsoclonus-myoclonus-syndrome. J Neuroimmunol **170:**150-7.
110. **Kos, F. J.** 1998. Regulation of adaptive immunity by natural killer cells. Immunol Res **17:**303-12.
111. **Krumbholz, M., D. Theil, T. Derfuss, A. Rosenwald, F. Schrader, C. M. Monoranu, S. L. Kalled, D. M. Hess, B. Serafini, F. Aloisi, H. Wekerle, R. Hohlfeld, and E. Meinl.** 2005. BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma. J Exp Med **201:**195-200.
112. **Kuban, K. C., M. A. Ephros, R. L. Freeman, L. B. Laffell, and M. J. Bresnan.** 1983. Syndrome of opsoclonus-myoclonus caused by Coxsackie B3 infection. Ann Neurol **13:**69-71.
113. **Laabi, Y., M. P. Gras, F. Carbonnel, J. C. Brouet, R. Berger, C. J. Larsen, and A. Tsapis.** 1992. A new gene, BCM, on chromosome 16 is fused to the interleukin 2 gene by a t(4;16)(q26;p13) translocation in a malignant T cell lymphoma. EMBO J **11:**3897-904.
114. **Lanier, L. L., A. M. Le, C. I. Civin, M. R. Loken, and J. H. Phillips.** 1986. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. J Immunol **136:**4480-6.
115. **Lee, J. K., T. J. Sayers, A. D. Brooks, T. C. Back, H. A. Young, K. L. Komschlies, J. M. Wigginton, and R. H. Wiltrout.** 2000. IFN-gamma-dependent delay of in vivo tumor progression by Fas overexpression on murine renal cancer cells. J Immunol **164:**231-9.
116. **Liang, S., J. Zhang, H. Wei, R. Sun, and Z. Tian.** 2005. Differential roles of constitutively activated ERK1/2 and NF-kappa B in cytotoxicity and proliferation by human NK cell lines. Int Immunopharmacol **5:**839-48.
117. **Linette, G. P., and S. J. Korsmeyer.** 1994. Differentiation and cell death: lessons from the immune system. Curr Opin Cell Biol **6:**809-15.
118. **Litinskiy, M. B., B. Nardelli, D. M. Hilbert, B. He, A. Schaffer, P. Casali, and A. Cerutti.** 2002. DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL. Nat Immunol **3:**822-9.
119. **Liu, W., A. Szalai, L. Zhao, D. Liu, F. Martin, R. P. Kimberly, T. Zhou, and R. H. Carter.** 2004. Control of spontaneous B lymphocyte autoimmunity with adenovirus-encoded soluble TACI. Arthritis Rheum **50:**1884-96.

120. **Liu, Y., L. Xu, N. Opalka, J. Kappler, H. B. Shu, and G. Zhang.** 2002. Crystal structure of sTALL-1 reveals a virus-like assembly of TNF family ligands. Cell **108:**383-94.
121. **Liu, Y. J., J. Zhang, P. J. Lane, E. Y. Chan, and I. C. MacLennan.** 1991. Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens. Eur J Immunol **21:**2951-62.
122. **Ljunggren, H. G., and K. Karre.** 1985. Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. J Exp Med **162:**1745-59.
123. **Loffert, D., S. Schaal, A. Ehlich, R. R. Hardy, Y. R. Zou, W. Muller, and K. Rajewsky.** 1994. Early B-cell development in the mouse: insights from mutations introduced by gene targeting. Immunol Rev **137:**135-53.
124. **Lopez-Fraga, M., R. Fernandez, J. P. Albar, and M. Hahne.** 2001. Biologically active APRIL is secreted following intracellular processing in the Golgi apparatus by furin convertase. EMBO Rep **2:**945-51.
125. **Lott, I., and M. Kinsbourne.** 1986. Myoclonic encephalopathy of infants. Adv Neurol **43:**127-36.
126. **Lucisano Valim, Y. M., and P. J. Lachmann.** 1991. The effect of antibody isotype and antigenic epitope density on the complement-fixing activity of immune complexes: a systematic study using chimaeric anti-NIP antibodies with human Fc regions. Clin Exp Immunol **84:**1-8.
127. **Luque, F. A., H. M. Furneaux, R. Ferziger, M. K. Rosenblum, S. H. Wray, S. C. Schold, Jr., M. J. Glantz, K. A. Jaeckle, H. Biran, M. Lesser, and et al.** 1991. Anti-Ri: an antibody associated with paraneoplastic opsoclonus and breast cancer. Ann Neurol **29:**241-51.
128. **Lutz, C. T., and Z. B. Kurago.** 1999. Human leukocyte antigen class I expression on squamous cell carcinoma cells regulates natural killer cell activity. Cancer Res **59:**5793-9.
129. **Mackay, F., and J. L. Browning.** 2002. BAFF: a fundamental survival factor for B cells. Nat Rev Immunol **2:**465-75.
130. **Mackay, F., P. Schneider, P. Rennert, and J. Browning.** 2003. BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. Annu Rev Immunol **21:**231-64.
131. **Mackay, F., S. A. Woodcock, P. Lawton, C. Ambrose, M. Baetscher, P. Schneider, J. Tschopp, and J. L. Browning.** 1999. Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. J Exp Med **190:**1697-710.
132. **Maguire, G. A., D. S. Kumararatne, and H. J. Joyce.** 2002. Are there any clinical indications for measuring IgG subclasses? Ann Clin Biochem **39:**374-7.
133. **Manz, R. A., A. Thiel, and A. Radbruch.** 1997. Lifetime of plasma cells in the bone marrow. Nature **388:**133-4.
134. **Mariette, X.** 2003. [Pathophysiology of Sjogren's syndrome]. Ann Med Interne (Paris) **154:**157-68.
135. **Mariette, X., S. Roux, J. Zhang, D. Bengoufa, F. Lavie, T. Zhou, and R. Kimberly.** 2003. The level of BLyS (BAFF) correlates with the titre of autoantibodies in human Sjogren's syndrome. Ann Rheum Dis **62:**168-71.
136. **Marsters, S. A., M. Yan, R. M. Pitti, P. E. Haas, V. M. Dixit, and A. Ashkenazi.** 2000. Interaction of the TNF homologues BLyS and APRIL with the TNF receptor homologues BCMA and TACI. Curr Biol **10:**785-8.

137. **Marusich, M. F., H. M. Furneaux, P. D. Henion, and J. A. Weston.** 1994. Hu neuronal proteins are expressed in proliferating neurogenic cells. J Neurobiol **25:**143-55.
138. **Matsushita, T., M. Hasegawa, Y. Matsushita, T. Echigo, T. Wayaku, M. Horikawa, F. Ogawa, K. Takehara, and S. Sato.** 2007. Elevated serum BAFF levels in patients with localized scleroderma in contrast to other organ-specific autoimmune diseases. Exp Dermatol **16:**87-93.
139. **Matsushita, T., M. Hasegawa, K. Yanaba, M. Kodera, K. Takehara, and S. Sato.** 2006. Elevated serum BAFF levels in patients with systemic sclerosis: enhanced BAFF signaling in systemic sclerosis B lymphocytes. Arthritis Rheum **54:**192-201.
140. **Melchers, F., E. ten Boekel, T. Seidl, X. C. Kong, T. Yamagami, K. Onishi, T. Shimizu, A. G. Rolink, and J. Andersson.** 2000. Repertoire selection by pre-B-cell receptors and B-cell receptors, and genetic control of B-cell development from immature to mature B cells. Immunol Rev **175:**33-46.
141. **Michaelsen, T. E., A. Aase, L. Norderhaug, and I. Sandlie.** 1992. Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity induced by chimeric mouse-human IgG subclasses and IgG3 antibodies with altered hinge region. Mol Immunol **29:**319-26.
142. **Mitchell, W. G., Y. Davalos-Gonzalez, V. L. Brumm, S. K. Aller, E. Burger, S. B. Turkel, M. S. Borchert, S. Hollar, and S. Padilla.** 2002. Opsoclonus-ataxia caused by childhood neuroblastoma: developmental and neurologic sequelae. Pediatrics **109:**86-98.
143. **Moore, P. A., O. Belvedere, A. Orr, K. Pieri, D. W. LaFleur, P. Feng, D. Soppet, M. Charters, R. Gentz, D. Parmelee, Y. Li, O. Galperina, J. Giri, V. Roschke, B. Nardelli, J. Carrell, S. Sosnovtseva, W. Greenfield, S. M. Ruben, H. S. Olsen, J. Fikes, and D. M. Hilbert.** 1999. BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. Science **285:**260-3.
144. **Moreaux, J., F. W. Cremer, T. Reme, M. Raab, K. Mahtouk, P. Kaukel, V. Pantesco, J. De Vos, E. Jourdan, A. Jauch, E. Legouffe, M. Moos, G. Fiol, H. Goldschmidt, J. F. Rossi, D. Hose, and B. Klein.** 2005. The level of TACI gene expression in myeloma cells is associated with a signature of microenvironment dependence versus a plasmablastic signature. Blood **106:**1021-30.
145. **Moretta, A., C. Bottino, M. Vitale, D. Pende, C. Cantoni, M. C. Mingari, R. Biassoni, and L. Moretta.** 2001. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytolysis. Annu Rev Immunol **19:**197-223.
146. **Moretta, L., and A. Moretta.** 2004. Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. EMBO J **23:**255-9.
147. **Mostov, K. E.** 1994. Transepithelial transport of immunoglobulins. Annu Rev Immunol **12:**63-84.
148. **Mukhopadhyay, A., J. Ni, Y. Zhai, G. L. Yu, and B. B. Aggarwal.** 1999. Identification and characterization of a novel cytokine, THANK, a TNF homologue that activates apoptosis, nuclear factor-kappaB, and c-Jun NH2-terminal kinase. J Biol Chem **274:**15978-81.
149. **Nardelli, B., O. Belvedere, V. Roschke, P. A. Moore, H. S. Olsen, T. S. Migone, S. Sosnovtseva, J. A. Carrell, P. Feng, J. G. Giri, and D. M. Hilbert.** 2001. Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells. Blood **97:**198-204.

150. **Ng, L. G., A. P. Sutherland, R. Newton, F. Qian, T. G. Cachero, M. L. Scott, J. S. Thompson, J. Wheway, T. Chtanova, J. Groom, I. J. Sutton, C. Xin, S. G. Tangye, S. L. Kalled, F. Mackay, and C. R. Mackay.** 2004. B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF)-R is the principal BAFF receptor facilitating BAFF costimulation of circulating T and B cells. J Immunol **173:**807-17.
151. **Noetzel, M. J., L. P. Cawley, V. L. James, B. J. Minard, and H. C. Agrawal.** 1987. Anti-neurofilament protein antibodies in opsoclonus-myoclonus. J Neuroimmunol **15:**137-45.
152. **Nossal, G. J.** 1994. Negative selection of lymphocytes. Cell **76:**229-39.
153. **Novak, A. J., J. R. Darce, B. K. Arendt, B. Harder, K. Henderson, W. Kindsvogel, J. A. Gross, P. R. Greipp, and D. F. Jelinek.** 2004. Expression of BCMA, TACI, and BAFF-R in multiple myeloma: a mechanism for growth and survival. Blood **103:**689-94.
154. **Novak, A. J., D. M. Grote, M. Stenson, S. C. Ziesmer, T. E. Witzig, T. M. Habermann, B. Harder, K. M. Ristow, R. J. Bram, D. F. Jelinek, J. A. Gross, and S. M. Ansell.** 2004. Expression of BLyS and its receptors in B-cell non-Hodgkin lymphoma: correlation with disease activity and patient outcome. Blood **104:**2247-53.
155. **O'Connor, B. P., V. S. Raman, L. D. Erickson, W. J. Cook, L. K. Weaver, C. Ahonen, L. L. Lin, G. T. Mantchev, R. J. Bram, and R. J. Noelle.** 2004. BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. J Exp Med **199:**91-8.
156. **Oren, D. A., Y. Li, Y. Volovik, T. S. Morris, C. Dharia, K. Das, O. Galperina, R. Gentz, and E. Arnold.** 2002. Structural basis of BLyS receptor recognition. Nat Struct Biol **9:**288-92.
157. **Ozkaynak, M. F., P. M. Sondel, M. D. Krailo, J. Gan, B. Javorsky, R. A. Reisfeld, K. K. Matthay, G. H. Reaman, and R. C. Seeger.** 2000. Phase I study of chimeric human/murine anti-ganglioside G(D2) monoclonal antibody (ch14.18) with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in children with neuroblastoma immediately after hematopoietic stem-cell transplantation: a Children's Cancer Group Study. J Clin Oncol **18:**4077-85.
158. **Parker, D. C.** 1993. T cell-dependent B cell activation. Annu Rev Immunol **11:**331-60.
159. **Pelletier, M., J. S. Thompson, F. Qian, S. A. Bixler, D. Gong, T. Cachero, K. Gilbride, E. Day, M. Zafari, C. Benjamin, L. Gorelik, A. Whitty, S. L. Kalled, C. Ambrose, and Y. M. Hsu.** 2003. Comparison of soluble decoy IgG fusion proteins of BAFF-R and BCMA as antagonists for BAFF. J Biol Chem **278:**33127-33.
160. **Pohl, K. R., J. Pritchard, and J. Wilson.** 1996. Neurological sequelae of the dancing eye syndrome. Eur J Pediatr **155:**237-44.
161. **Poljak, R. J.** 1991. Structure of antibodies and their complexes with antigens. Mol Immunol **28:**1341-5.
162. **Porter, R. R.** 1991. Lecture for the Nobel Prize for physiology or medicine 1972: Structural studies of immunoglobulins. 1972. Scand J Immunol **34:**381-9.
163. **Pradet-Balade, B., J. P. Medema, M. Lopez-Fraga, J. C. Lozano, G. M. Kolfschoten, A. Picard, A. C. Martinez, J. A. Garcia-Sanz, and M. Hahne.** 2002. An endogenous hybrid mRNA encodes TWE-PRIL, a functional cell surface TWEAK-APRIL fusion protein. EMBO J **21:**5711-20.

164. **Pranzatelli, M. R.** 1996. The immunopharmacology of the opsoclonus-myoclonus syndrome. Clin Neuropharmacol **19:**1-47.
165. **Pranzatelli, M. R., E. D. Tate, E. R. Hoefgen, J. A. Swan, and J. A. Colliver.** 2008. Therapeutic down-regulation of central and peripheral B-cell-activating factor (BAFF) production in pediatric opsoclonus-myoclonus syndrome. Cytokine **44:**26-32.
166. **Pranzatelli, M. R., E. D. Tate, A. Wheeler, N. Bass, A. P. Gold, M. L. Griebel, M. Gumbinas, P. T. Heydemann, P. J. Holt, P. Jacob, S. Kotagal, C. J. Minarcik, and H. S. Schub.** 2002. Screening for autoantibodies in children with opsoclonus-myoclonus-ataxia. Pediatr Neurol **27:**384-7.
167. **Pranzatelli, M. R., A. L. Travelstead, E. D. Tate, T. J. Allison, and S. J. Verhulst.** 2004. CSF B-cell expansion in opsoclonus-myoclonus syndrome: a biomarker of disease activity. Mov Disord **19:**770-7.
168. **Rajewsky, K.** 1996. Clonal selection and learning in the antibody system. Nature **381:**751-8.
169. **Renard, V., A. Cambiaggi, F. Vely, M. Blery, L. Olcese, S. Olivero, M. Bouchet, and E. Vivier.** 1997. Transduction of cytotoxic signals in natural killer cells: a general model of fine tuning between activatory and inhibitory pathways in lymphocytes. Immunol Rev **155:**205-21.
170. **Rennert, P., P. Schneider, T. G. Cachero, J. Thompson, L. Trabach, S. Hertig, N. Holler, F. Qian, C. Mullen, K. Strauch, J. L. Browning, C. Ambrose, and J. Tschopp.** 2000. A soluble form of B cell maturation antigen, a receptor for the tumor necrosis factor family member APRIL, inhibits tumor cell growth. J Exp Med **192:**1677-84.
171. **Robertson, M. J., and J. Ritz.** 1990. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. Blood **76:**2421-38.
172. **Rolink, A. G., and F. Melchers.** 2002. BAFFled B cells survive and thrive: roles of BAFF in B-cell development. Curr Opin Immunol **14:**266-75.
173. **Rolink, A. G., F. Melchers, and J. Andersson.** 1999. The transition from immature to mature B cells. Curr Top Microbiol Immunol **246:**39-43; discussion 44.
174. **Romanski, A., G. Bug, S. Becker, M. Kampfmann, E. Seifried, D. Hoelzer, O. G. Ottmann, and T. Tonn.** 2005. Mechanisms of resistance to natural killer cell-mediated cytotoxicity in acute lymphoblastic leukemia. Exp Hematol **33:**344-52.
175. **Roschke, V., S. Sosnovtseva, C. D. Ward, J. S. Hong, R. Smith, V. Albert, W. Stohl, K. P. Baker, S. Ullrich, B. Nardelli, D. M. Hilbert, and T. S. Migone.** 2002. BLyS and APRIL form biologically active heterotrimers that are expressed in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. J Immunol **169:**4314-21.
176. **Rosenberg, N., and P. W. Kincade.** 1994. B-lineage differentiation in normal and transformed cells and the microenvironment that supports it. Curr Opin Immunol **6:**203-11.
177. **Ross, M. E., and M. A. Caligiuri.** 1997. Cytokine-induced apoptosis of human natural killer cells identifies a novel mechanism to regulate the innate immune response. Blood **89:**910-8.
178. **Rostasy, K., B. Wilken, M. Baumann, K. Muller-Deile, I. Bieber, J. Gartner, P. Moller, P. Angelini, and B. Hero.** 2006. High dose pulsatile dexamethasone therapy in children with opsoclonus-myoclonus syndrome. Neuropediatrics **37:**291-5.

179. **Roth, W., B. Wagenknecht, A. Klumpp, U. Naumann, M. Hahne, J. Tschopp, and M. Weller.** 2001. APRIL, a new member of the tumor necrosis factor family, modulates death ligand-induced apoptosis. Cell Death Differ **8:**403-10.
180. **Rudnick, E., Y. Khakoo, N. L. Antunes, R. C. Seeger, G. M. Brodeur, H. Shimada, R. B. Gerbing, D. O. Stram, and K. K. Matthay.** 2001. Opsoclonus-myoclonus-ataxia syndrome in neuroblastoma: clinical outcome and antineuronal antibodies-a report from the Children's Cancer Group Study. Med Pediatr Oncol **36:**612-22.
181. **Russo, C., S. L. Cohn, M. J. Petruzzi, and P. A. de Alarcon.** 1997. Long-term neurologic outcome in children with opsoclonus-myoclonus associated with neuroblastoma: a report from the Pediatric Oncology Group. Med Pediatr Oncol **28:**284-8.
182. **Saalman, R., U. I. Dahlgren, S. P. Fallstrom, L. A. Hanson, A. E. Wold, and S. Ahlstedt.** 1995. ADCC-mediating capacity in children with cow's milk protein intolerance in relation to IgG subclass profile of serum antibodies to beta-lactoglobulin. Scand J Immunol **42:**140-6.
183. **Saikali, P., J. P. Antel, J. Newcombe, Z. Chen, M. Freedman, M. Blain, R. Cayrol, A. Prat, J. A. Hall, and N. Arbour.** 2007. NKG2D-mediated cytotoxicity toward oligodendrocytes suggests a mechanism for tissue injury in multiple sclerosis. J Neurosci **27:**1220-8.
184. **Salazar-Mather, T. P., T. A. Hamilton, and C. A. Biron.** 2000. A chemokine-to-cytokine-to-chemokine cascade critical in antiviral defense. J Clin Invest **105:**985-93.
185. **Salih, A. M., N. B. Nixon, P. T. Dawes, and D. L. Mattey.** 1998. Prevalence of antibodies to neurofilament polypeptides in patients with rheumatoid arthritis complicated by peripheral neuropathy. Clin Exp Rheumatol **16:**689-94.
186. **Scapini, P., B. Nardelli, G. Nadali, F. Calzetti, G. Pizzolo, C. Montecucco, and M. A. Cassatella.** 2003. G-CSF-stimulated neutrophils are a prominent source of functional BLyS. J Exp Med **197:**297-302.
187. **Schatz, D. G., M. A. Oettinger, and M. S. Schlissel.** 1992. V(D)J recombination: molecular biology and regulation. Annu Rev Immunol **10:**359-83.
188. **Schiemann, B., J. L. Gommerman, K. Vora, T. G. Cachero, S. Shulga-Morskaya, M. Dobles, E. Frew, and M. L. Scott.** 2001. An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. Science **293:**2111-4.
189. **Schneider, P.** 2005. The role of APRIL and BAFF in lymphocyte activation. Curr Opin Immunol **17:**282-9.
190. **Schneider, P., N. Holler, J. L. Bodmer, M. Hahne, K. Frei, A. Fontana, and J. Tschopp.** 1998. Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. J Exp Med **187:**1205-13.
191. **Schneider, P., F. MacKay, V. Steiner, K. Hofmann, J. L. Bodmer, N. Holler, C. Ambrose, P. Lawton, S. Bixler, H. Acha-Orbea, D. Valmori, P. Romero, C. Werner-Favre, R. H. Zubler, J. L. Browning, and J. Tschopp.** 1999. BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. J Exp Med **189:**1747-56.
192. **Schneider, P., H. Takatsuka, A. Wilson, F. Mackay, A. Tardivel, S. Lens, T. G. Cachero, D. Finke, F. Beermann, and J. Tschopp.** 2001. Maturation of marginal zone and follicular B cells requires B cell activating factor of the

tumor necrosis factor family and is independent of B cell maturation antigen. J Exp Med **194:**1691-7.

193. **Sensel, M. G., L. M. Kane, and S. L. Morrison.** 1997. Amino acid differences in the N-terminus of C(H)2 influence the relative abilities of IgG2 and IgG3 to activate complement. Mol Immunol **34:**1019-29.
194. **Seshasayee, D., P. Valdez, M. Yan, V. M. Dixit, D. Tumas, and I. S. Grewal.** 2003. Loss of TACI causes fatal lymphoproliferation and autoimmunity, establishing TACI as an inhibitory BLyS receptor. Immunity **18:**279-88.
195. **Seyler, T. M., Y. W. Park, S. Takemura, R. J. Bram, P. J. Kurtin, J. J. Goronzy, and C. M. Weyand.** 2005. BLyS and APRIL in rheumatoid arthritis. J Clin Invest **115:**3083-92.
196. **Shu, H. B., W. H. Hu, and H. Johnson.** 1999. TALL-1 is a novel member of the TNF family that is down-regulated by mitogens. J Leukoc Biol **65:**680-3.
197. **Shulga-Morskaya, S., M. Dobles, M. E. Walsh, L. G. Ng, F. MacKay, S. P. Rao, S. L. Kalled, and M. L. Scott.** 2004. B cell-activating factor belonging to the TNF family acts through separate receptors to support B cell survival and T cell-independent antibody formation. J Immunol **173:**2331-41.
198. **Simon, T., B. Hero, A. Faldum, R. Handgretinger, M. Schrappe, D. Niethammer, and F. Berthold.** 2004. Consolidation treatment with chimeric anti-GD2-antibody ch14.18 in children older than 1 year with metastatic neuroblastoma. J Clin Oncol **22:**3549-57.
199. **Sivori, S., D. Pende, C. Bottino, E. Marcenaro, A. Pessino, R. Biassoni, L. Moretta, and A. Moretta.** 1999. NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. Eur J Immunol **29:**1656-66.
200. **Slifka, M. K., R. Antia, J. K. Whitmire, and R. Ahmed.** 1998. Humoral immunity due to long-lived plasma cells. Immunity **8:**363-72.
201. **Smith, C. A., T. Farrah, and R. G. Goodwin.** 1994. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. Cell **76:**959-62.
202. **Solomon, G. E., and A. M. Chutorian.** 1968. Opsoclonus and occult neuroblastoma. N Engl J Med **279:**475-7.
203. **Stavnezer, J.** 1996. Antibody class switching. Adv Immunol **61:**79-146.
204. **Stefansson, K., L. S. Marton, M. E. Dieperink, G. K. Molnar, W. W. Schlaepfer, and C. M. Helgason.** 1985. Circulating autoantibodies to the 200,000-dalton protein of neurofilaments in the serum of healthy individuals. Science **228:**1117-9.
205. **Stein, J. V., M. Lopez-Fraga, F. A. Elustondo, C. E. Carvalho-Pinto, D. Rodriguez, R. Gomez-Caro, J. De Jong, A. C. Martinez, J. P. Medema, and M. Hahne.** 2002. APRIL modulates B and T cell immunity. J Clin Invest **109:**1587-98.
206. **Stohl, W., D. Xu, K. S. Kim, M. N. Koss, T. N. Jorgensen, B. Deocharan, T. E. Metzger, S. A. Bixler, Y. S. Hong, C. M. Ambrose, F. Mackay, L. Morel, C. Putterman, B. L. Kotzin, and S. L. Kalled.** 2005. BAFF overexpression and accelerated glomerular disease in mice with an incomplete genetic predisposition to systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum **52:**2080-91.
207. **Sutherland, A. P., L. G. Ng, C. A. Fletcher, B. Shum, R. A. Newton, S. T. Grey, M. S. Rolph, F. Mackay, and C. R. Mackay.** 2005. BAFF augments certain Th1-associated inflammatory responses. J Immunol **174:**5537-44.

208. **Takahashi, Y., P. R. Dutta, D. M. Cerasoli, and G. Kelsoe.** 1998. In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. V. Affinity maturation develops in two stages of clonal selection. J Exp Med **187:**885-95.
209. **Tarte, K., J. De Vos, T. Thykjaer, F. Zhan, G. Fiol, V. Costes, T. Reme, E. Legouffe, J. F. Rossi, J. Shaughnessy, Jr., T. F. Orntoft, and B. Klein.** 2002. Generation of polyclonal plasmablasts from peripheral blood B cells: a normal counterpart of malignant plasmablasts. Blood **100:**1113-22.
210. **Tew, J. G., R. M. DiLosa, G. F. Burton, M. H. Kosco, L. I. Kupp, A. Masuda, and A. K. Szakal.** 1992. Germinal centers and antibody production in bone marrow. Immunol Rev **126:**99-112.
211. **Thomas, L.** 1984. Labor und Diagnose. Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik
212. **Thompson, J. S., S. A. Bixler, F. Qian, K. Vora, M. L. Scott, T. G. Cachero, C. Hession, P. Schneider, I. D. Sizing, C. Mullen, K. Strauch, M. Zafari, C. D. Benjamin, J. Tschopp, J. L. Browning, and C. Ambrose.** 2001. BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF. Science **293:**2108-11.
213. **Thompson, J. S., P. Schneider, S. L. Kalled, L. Wang, E. A. Lefevre, T. G. Cachero, F. MacKay, S. A. Bixler, M. Zafari, Z. Y. Liu, S. A. Woodcock, F. Qian, M. Batten, C. Madry, Y. Richard, C. D. Benjamin, J. L. Browning, A. Tsapis, J. Tschopp, and C. Ambrose.** 2000. BAFF binds to the tumor necrosis factor receptor-like molecule B cell maturation antigen and is important for maintaining the peripheral B cell population. J Exp Med **192:**129-35.
214. **Thompson, R. F.** 2001. Das Gehirn - Von der Nervenzelle zur Verhaltenssteuerung; 3. Auflage.
215. **Tonn, T., S. Becker, R. Esser, D. Schwabe, and E. Seifried.** 2001. Cellular immunotherapy of malignancies using the clonal natural killer cell line NK-92. J Hematother Stem Cell Res **10:**535-44.
216. **Trepel, M.** 2004. Neuroanatomie - Struktur und Funktion; 3. Auflage.
217. **Trinchieri, G.** 1989. Biology of natural killer cells. Adv Immunol **47:**187-376.
218. **Tuchman, R. F., L. A. Alvarez, A. B. Kantrowitz, F. G. Moser, J. Llena, and S. L. Moshe.** 1989. Opsoclonus-myoclonus syndrome: correlation of radiographic and pathological observations. Neuroradiology **31:**250-2.
219. **Uttenreuther-Fischer, M. M., C. S. Huang, and A. L. Yu.** 1995. Pharmacokinetics of human-mouse chimeric anti-GD2 mAb ch14.18 in a phase I trial in neuroblastoma patients. Cancer Immunol Immunother **41:**331-8.
220. **Varfolomeev, E., F. Kischkel, F. Martin, D. Seshasayee, H. Wang, D. Lawrence, C. Olsson, L. Tom, S. Erickson, D. French, P. Schow, I. S. Grewal, and A. Ashkenazi.** 2004. APRIL-deficient mice have normal immune system development. Mol Cell Biol **24:**997-1006.
221. **Voice, J. K., and P. J. Lachmann.** 1997. Neutrophil Fc gamma and complement receptors involved in binding soluble IgG immune complexes and in specific granule release induced by soluble IgG immune complexes. Eur J Immunol **27:**2514-23.
222. **Wallweber, H. J., D. M. Compaan, M. A. Starovasnik, and S. G. Hymowitz.** 2004. The crystal structure of a proliferation-inducing ligand, APRIL. J Mol Biol **343:**283-90.

223. **Wei, S., D. L. Gilvary, B. C. Corliss, S. Sebti, J. Sun, D. B. Straus, P. J. Leibson, J. A. Trapani, A. D. Hamilton, M. J. Weber, and J. Y. Djeu.** 2000. Direct tumor lysis by NK cells uses a Ras-independent mitogen-activated protein kinase signal pathway. J Immunol **165:**3811-9.
224. **Wu, J., and L. L. Lanier.** 2003. Natural killer cells and cancer. Adv Cancer Res **90:**127-56.
225. **Wu, Y., D. Bressette, J. A. Carrell, T. Kaufman, P. Feng, K. Taylor, Y. Gan, Y. H. Cho, A. D. Garcia, E. Gollatz, D. Dimke, D. LaFleur, T. S. Migone, B. Nardelli, P. Wei, S. M. Ruben, S. J. Ullrich, H. S. Olsen, P. Kanakaraj, P. A. Moore, and K. P. Baker.** 2000. Tumor necrosis factor (TNF) receptor superfamily member TACI is a high affinity receptor for TNF family members APRIL and BLyS. J Biol Chem **275:**35478-85.
226. **Xu, B. Y., R. Pirskanen, and A. K. Lefvert.** 1999. Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity--an additional mechanism in human autoimmune myasthenia gravis. J Neuroimmunol **99:**183-8.
227. **Yamaguchi, Y., H. Kim, K. Kato, K. Masuda, I. Shimada, and Y. Arata.** 1995. Proteolytic fragmentation with high specificity of mouse immunoglobulin G. Mapping of proteolytic cleavage sites in the hinge region. J Immunol Methods **181:**259-67.
228. **Yan, M., J. R. Brady, B. Chan, W. P. Lee, B. Hsu, S. Harless, M. Cancro, I. S. Grewal, and V. M. Dixit.** 2001. Identification of a novel receptor for B lymphocyte stimulator that is mutated in a mouse strain with severe B cell deficiency. Curr Biol **11:**1547-52.
229. **Yan, M., S. A. Marsters, I. S. Grewal, H. Wang, A. Ashkenazi, and V. M. Dixit.** 2000. Identification of a receptor for BLyS demonstrates a crucial role in humoral immunity. Nat Immunol **1:**37-41.
230. **Yao, L., C. Sgadari, K. Furuke, E. T. Bloom, J. Teruya-Feldstein, and G. Tosato.** 1999. Contribution of natural killer cells to inhibition of angiogenesis by interleukin-12. Blood **93:**1612-21.
231. **Yoon, S. J., D. S. Heo, J. O. Kang, S. G. Lee, C. D. Kim, M. W. Sung, and N. K. Kim.** 1998. Synergistic anti-tumor effects with co-expression of GM-CSF and IFN-gamma in murine tumors. Int J Cancer **77:**907-12.
232. **Yu, A. L., M. M. Uttenreuther-Fischer, C. S. Huang, C. C. Tsui, S. D. Gillies, R. A. Reisfeld, and F. H. Kung.** 1998. Phase I trial of a human-mouse chimeric anti-disialoganglioside monoclonal antibody ch14.18 in patients with refractory neuroblastoma and osteosarcoma. J Clin Oncol **16:**2169-80.
233. **Yu, G., T. Boone, J. Delaney, N. Hawkins, M. Kelley, M. Ramakrishnan, S. McCabe, W. R. Qiu, M. Kornuc, X. Z. Xia, J. Guo, M. Stolina, W. J. Boyle, I. Sarosi, H. Hsu, G. Senaldi, and L. E. Theill.** 2000. APRIL and TALL-I and receptors BCMA and TACI: system for regulating humoral immunity. Nat Immunol **1:**252-6.
234. **Zeng, M. H., C. Y. Fang, S. S. Wang, M. Zhu, L. Xie, R. Li, L. Wang, X. W. Wu, and S. Chen.** 2006. A study of soluble HLA-G1 protecting porcine endothelial cells against human natural killer cell-mediated cytotoxicity. Transplant Proc **38:**3312-4.
235. **Zeng, Y., S. Fest, R. Kunert, H. Katinger, V. Pistoia, J. Michon, G. Lewis, R. Ladenstein, and H. N. Lode.** 2005. Anti-neuroblastoma effect of ch14.18 antibody produced in CHO cells is mediated by NK-cells in mice. Mol Immunol **42:**1311-9.

236. **Zhang, J., V. Roschke, K. P. Baker, Z. Wang, G. S. Alarcon, B. J. Fessler, H. Bastian, R. P. Kimberly, and T. Zhou.** 2001. Cutting edge: a role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus. J Immunol **166:**6-10.
237. **Zhukovsky, E. A., J. O. Lee, M. Villegas, C. Chan, S. Chu, and C. Mroske.** 2004. TNF ligands: is TALL-1 a trimer or a virus-like cluster? Nature **427:**413-4; discussion 414.
238. **Zitvogel, L.** 2002. Dendritic and natural killer cells cooperate in the control/switch of innate immunity. J Exp Med **195:**F9-14.

9. Abkürzungsverzeichnis

Ø	Durchschnitt
Σ	Summe
%	Prozent
°C	Grad Celsius
x g	Mal die Gravitation
µg	Mikrogramm, 10^{-6} g
µl	Mikroliter, 10^{-6} L
µm	Mikrometer, 10^{-6} m
Abb.	Abbildung
ACTH	Adreno-Coricotrope-Hormone
ADCC	Antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität
AK	Antikörper
ANA	Anti-nukleoläre AK
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Antigenpräsentierende Zellen
APRIL	A proliferation inducing ligand
APS	Ammoniumpersulfat
BAFF	B-Zell aktivierender Faktor aus der TNF-Familie
BAFF-R	BAFF-Rezeptor, TNFRSF 13C
BCIP/NBT	5-bromo 4-chloro 3-indolyl phosphate / nitro-blue tetrazolium chloride
BCMA	B cell maturation antigen, TNFRSF 17
BlyS (=BAFF)	B Lymphocyte Stimulator
BR3 (BAFF-R)	BLyS receptor 3
BSA	Rinderserum-Albumin (Bovine Serum Albumine)
Bzw.	Beziehungsweise
ca.	Zirka
CD 3	T-Zell-Marker
CD 16	FcγIII-Rezeptor

cDNA	copy DNA
CGN`s	cerebelläre Granularis-Neurone
cm	Zentimeter, 10^{-2} m
cm^2	Quadratzentimeter
CO_2	Kohlendioxid
CT	Zyklen der ersten Detektion
Cut-off	Mittelwert der gesunden Kontrollen + (2,5 x Standardabweichung)
DMEM	Dulbeccco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Enzym, welches DNA zerstört
dNTP	Deoxyribonukleotidtriphosphat
Dr. Arbeit	Doktorarbeit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsoptionstest
ENE	Patienten mit entzündlichen neurologischen Erkrankungen
et al.	und Andere
evtl.	Eventuell
FACS	fluorescence activated cell sorting
FB	Fachbereich
FCS	Fötales Kälberserum
FDU	5-Fluoro-2`-deoxyuridine
FITC	Fluoroisothiozyanat
G	Gramm
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GD_2	Glykolipid-Antigen Gangliosid
ggf.	Gegebenenfalls
GK	Gesunde Kontrollpatienten
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony stimulating factor
gMFI	geometrisch gemittelte Fluoreszenzintensität
H_2O	Wasser

H_2O_{dest} / dH_2O	destilliertes Wasser
HRP	Horseradish peroxidase
Hu-AK	Autoantikörper nach Indexpatient benannt, tritt u.a. bei PNS auf, bindet an verschiedene Proteine (HuC, HuD, Hel-N1) in Neuronen und Tumorzellen, wie u.a. Neuroblastome
IFNα, β, γ	Interferon alfa, beta, gamma
IgA	Immunoglobulin A
IgD	Immunoglobulin D
IgE	Immunoglobulin E
IgG	Immunoglobulin G
IgG1, 2, 3, 4	Immunglobuline G der Subklassen 1, 2, 3, 4
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
IVIG	intravenöse Immunglobuline
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo-Dalton
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
Kontr.	Kontrolle
KSRP	K-homology splicing regulator protein (RNA-bindendes Protein, glykolytisches Enzym)
L	Liter
LDH	Laktat Dehydrogenase
M	Molar
mA	Milliampere, 10^{-3} A
mfi	mittlere Fluoreszenz-Intensität
mg	Milligramm, 10^{-3} g
$MgSO_4$	Magnesiumsufat
MHC	Major Histocompatibility Complex
Min.	Minute(n)
ml	Milliliter, 10^{-3} L
mM	Millimolar, 10^{-3} M
mm	Millimeter, 10^{-3} m

mm^3	Kubikmillimeter
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
$NaHCO_3$	Natriumhydrogencarbonat
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH_2PO_4	Natriumdihydrogenphoaphat
NaN_3	Natriumazid
NB	Neuroblastom
N-CAM / CD 56	Neural-cell adhesion molcule
Ng	Milligramm, 10^{-9} g
Nm	Millimeter, 10^{-9} m
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
n.sign.	nicht signifikant
OD	optische Dichte
OMS	Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom
PBGD	Porphobilinogen Desaminase
PBMC	Periphere monunukleare Blutzellen
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE / RPE	Phytoerytrin
PerCP-Cy5	Peridinin-Chlorophyll-Protein-Cyanine 5
PFA	Paraformaldehyd
Pg	Pikogramm, 10^{-12} g
PLL	Poly-L-Lysin
Pmol	Pikomolar, 10^{-12} M
PNS	paraneoplastischen neurlogischen Syndromen
Ri-AK	Autoantikörper nach Indexpatient benannt, tritt u.a. bei PNS auf
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transcriptions-PCR

s / Sek.	Sekunden
Std.	Stunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TACI	transmembran activator and CAML interactor, TNFRSF13B
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TALL-1 (=BAFF)	TNF- and ApoL related leukocyte-expressed ligand 1
TALL-2 (=APRIL)	TNF- and ApoL-related leukocyte-expressed ligand-2
THANK (=BAFF)	TNF Homolog activates apoptosis, nuclear factor-κB und c-Jun NH_2-terminal kinase
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNFSF13 (=APRIL)	TNF superfamily member 13
TNFSF13b (=BAFF)	TNF-Superfamily Member 13b
TNFRSF17 (BAFF-R)	TNF receptor superfamily member 17
TRDL-1 (=APRIL)	TNF-related death ligand-1
Tr-AK	Autoantikörper nach Indexpatient benannt, tritt u.a. bei PNS auf
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Units
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolet
V	Volt
WB	WesternBlot
WT	Wildtyp
Yo-AK	Autoantikörper nach Indexpatient benannt, tritt u.a. bei PNS auf
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
zTNF4 (=BAFF)	z-tumor necrosis factor 4

10. Anhang

10.1 Vorbereitende Versuche für weiterführende Untersuchungen

6.2.2 Bestimmung der Oberflächen-Bindung von Patienten-IgG an NB-Zellen der Zelllinie Kelly mit zusätzlichen OMS- und Kontroll-Patienten

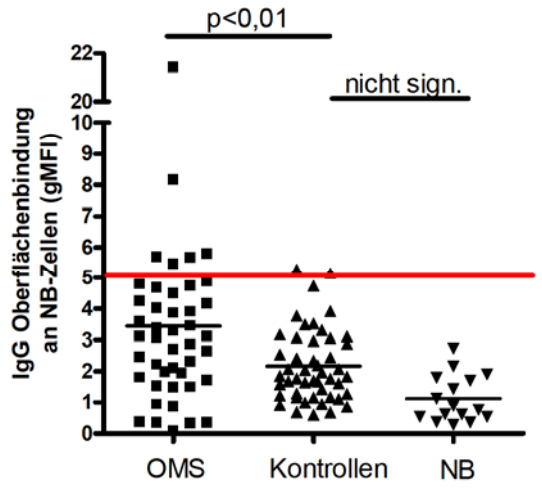

Abbildung 48: Bestimmung der IgG Oberflächen-Bindung an NB-Zellen

Zellen der NB-Zelllinie Kelly wurden mit Patienten-Seren (Verdünnung 1:50) inkubiert und die gebundenen AK wurden mit einem fluoreszenzmarkierten Zweit-AK (rabbit anti-human IgG FITC von DAKO, Verdünnung 1:75) detektiert. Für die Messung wurden Seren von OMS-Patienten (OMS), gesunden Kontroll-Patienten (Kontrollen) und von Patienten mit einem NB aber ohne OMS (NB) verwendet. Die gemessenen IgG-Mengen waren zwischen den gesunden Kontroll-Patienten und den OMS-Patienten signifikant unterschiedlich ($p<0,01$), zwischen den gesunden Kontrollen und den NB-Patienten nicht (nicht signifikant). Der Cut-off (rote Linie) lag bei einem gMFI-Wert von 5,07 / 3,94.

gMFI = geometrisch gemittelte Fluoreszenzintensität; Cut-off = Mittelwert der Kontrollen + (2,5 x Standardabweichung der Kontrollen)

10.3 Publikationen

[1] **S. Beck**, V. Fühlhuber, I. Krasenbrink, M. Tschernatsch, N. Kneifel, A. Kirsten, C. Jaeger, M.Kaps, K.T. Preissner, B. Lang, K.Rostasy, F. Blaes; "IgG subclass distribution of autoantibodies in pediatric opsoclonus-myoclonus syndrome.", *J. Neuroimmunol.* **2007**, *185*(1-2), 145-9.

[2] A. Kirsten, **S. Beck**, V. Fühlhuber, M. Kaps, T. Kreutz, M. Korfei, S. Schmitt, K.T. Preissner, F. Blaes; "New autoantibodies in pediatric opsoclonus myoclonus syndrome.", *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2007**, *1110*, 256-60.

[3] V. Fühlhuber, S. Bick, A. Kirsten, A. Hahn, T. Gerriets, M. Tschernatsch, M. Kaps, K.T. Preissner, F. Blaes, **S. Altenkämper**; „Elevated B-cell activating factor BAFF, but not APRIL, correlates with CSF cerebellar autoantibodies in pediatric opsoclonus-myoclonus syndrome", *J. Neuorimmunol.* **2008**. *accepted*

[4] **S. Altenkämper**, S. Bick, I. Krasenbrink, M. Tschernatsch, A. Kirsten, F. Blaes, V. Fühlhuber; „Surface-binding autoantibodies and B-cell activating factor (BAFF) in pediatric opsoclonus-myoclonus syndrome" *Buchbeitrag* **2008**, 335-342.

[5] **S. Altenkämper**, V. Fühlhuber, A. Kirsten, D. Vautz, M. Kaps, F. Blaes; "Serum and CSF BAFF (BLys) levels in paediatric opsoclonus-myoclonus syndrome - correlation with neuronal surface-binding autoantibodies", *6th international congress on Autoimmunity; Porto, Portugal September 10-14* **2008**, Vortrag.

10.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit

Charakterisierung der B-Zell-Regulation und funktioneller Effekte von Autoantikörpern bei Kindern mit Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinem sonstigen Prüfungszweck gedient.

Giessen, den 22.April 2009 Stefanie Altenkämper

11. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. W. Clauss ganz herzlich für die Bereitschaft die Betreuung meiner Doktorarbeit am Fachbereich Biologie zu übernehmen. Auch den Mitgliedern der Prüfungskommission danke ich sehr herzlich.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD. Dr. F. Baes für die interessante und spannende Aufgabenstellung, die Betreuung und Unterstützung während meiner Zeit in seiner Arbeitsgruppe, sowie die zahlreichen Möglichkeiten der fachlichen Weiterbildung und dem Erlernen neuer Methoden.

Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der finanziellen Mittel danke ich ganz herzlich Herrn PD. F. Blaes, Herrn Prof. M. Kaps und Herrn Prof. K.T. Preissner.

Meinen Laborkollegen/innen Sandra Bick , Oliver Gross, Jutta Hosch, Antje Kirsten, Nina Kneifel, Danielle Kohr, Pratibha Singh, Dr. Marlene Tschernatsch, Diana Vautz sowie allen MTA´s „unseres Labors“ möchte ich ganz besonders für die Unterstützung im Laboralltag und die sehr hilfreichen fachlichen und privaten Gespräche bei neuen oder problematischen Fragestellungen danken. Nina Kneifel und Oliver Gross möchte ich dabei besonders für die herzliche Aufnahme ins Team und Einweihung in die FACS-Geheimnisse danken, Pratibha Singh für Ihre Hilfe und Geduld besonders bei englischen „Problemchen“ und bei Sandra Bick für die gute NK-Zell- und BAFF-Zusammenarbeit.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich auch an Verena & Jochen und Judith & Karsten für die schönen Abende mit den vielen fröhlichen, aufbauenden und auch fachlich-methodischen Gesprächen und Diskussionen richten.

Bei Familie Schäfer, Familie Jakob/Gottwald sowie Jutta und Cord von Drathen und auch den anderen „Nordlichtern“ möchte ich mich für die vielen aufbauenden Gespräche und ablenkenden Unternehmungen bedanken, bei denen ich mich gut vom Laboralltag erholen und ausspannen konnte, so dass ich wieder gestärkt an meiner Doktorarbeit weiterarbeiten konnte.

Meinen Eltern, meiner Großmutti, meinen Schwiegereltern und dem Rest meiner Familie möchte ich ganz besonders herzlich für den familiären Rückhalt und ihre Unterstützung danken, die mir auch über schwierigere Zeiten hinweggeholfen haben.

Meinem Mann Mirko (ohne den meine Doktoranden-Zeit nur halb so schön gewesen wäre) danke ich ganz besonders für seine Unterstützung in allen Bereichen, für sein Verständnis und seine Geduld sowie für seine Liebe und den unendlichen Rückhalt in guten und auch schlechten Zeiten.
Unserem noch ungeborenen Kind danke ich für die tollen Erlebnisse und Eindrücke bei den Ultraschalluntersuchungen und für die vielen Tritte, die mich wissen lassen, dass es ihr/ihm gut geht.

…Danke auch allen Anderen, die ich natürlich nur in dieser Danksagung vergessen habe…;-)