



AUTOANTIKÖRPER UND DEREN PATHOGENER
EFFEKT AUF NEURONALE ZELLEN BEIM KINDLICHEN
OPSOKLONUS-MYOKLONUS-SYNDROM

VERENA FÜHLHUBER

INAUGURALDISSERTATION

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

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Autoantikörper und deren pathogener Effekt
auf neuronale Zellen beim kindlichen
Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom**

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

vorgelegt von

Verena Fühlhuber

aus Regensburg

Gießen, 2007

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

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

Tag der Disputation: 06.02.2008

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

Summary

1.	Einleitung	1
1.1.	Das Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom (OMS)	1
1.2.	Autoimmunität und paraneoplastische Syndrome	7
1.3.	Fragestellung	11
2.	Patienten und Methoden	12
2.1.	Patienten	12
2.2.	Methoden	13
2.2.1.	Zellkulturmedien und Puffer	13
2.2.2.	Präparation des Rattenkleinhirns	13
2.2.3.	Zellseparation	14
2.2.4.	Vitalitätsprüfung	15
2.3.	Bestimmung von Autoantikörpern	15
2.3.1.	Indirekter Immunfluoreszenztest	15
2.3.2.	Westernblot	16
2.3.3.	Durchflusszytometrische Untersuchung	17
2.4.	Statistik	20
3.	Resultate	21
3.1.	Autoantikörper gegen intrazelluläre Antigene	21
3.2.	Autoantikörper gegen Bestandteile des Nervensystems	23
3.2.1.	Immunhistochemisches Screening	23
3.2.2.	Westernblot Analyse neuronaler Autoantigene	25
3.3.	Autoantikörper gegen neuronale Oberflächenantigene	29
3.3.1.	Bindung von Autoantikörpern an die Oberfläche der Neuroblastom- zelllinie SKN-SH	29

3.3.2.	Bindung von Autoantikörpern an die Oberfläche von primärkultivierten zerebellären Granularisneuronen (CGN)	30
3.4.	Aktivitätsänderung des MAPKinase Enzyms ERK1/2 in CGN nach Inkubation mit OMS IgG	32
4.	Diskussion	34
4.1.	Autoimmunität beim OMS	34
4.2.	Antikörpern gegen intrazelluläre Autoantigene	35
4.3.	Autoantikörper gegen Oberflächenautoantigene	37
4.4.	Funktionelle Effekte von Autoantikörpern beim OMS	38
5.	Literaturverzeichnis	42
6.	Anhang	50

Zusammenfassung

Einleitung: Das Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom (OMS) ist eine seltene neurologische Erkrankung, die sowohl bei Erwachsenen und Kindern auftreten kann. Dabei treten oszillierende Augenbewegungen, Myoklonien, eine Ataxie und eine zunehmende Entwicklungsverzögerung auf. Sowohl bei der paraneoplastischen Form, die bei Kindern fast immer mit einem Neuroblastom einhergeht, wie auch bei den anderen Fällen wird eine Autoimmunpathogenese diskutiert. Ein gemeinsames Autoantigen konnte bisher nicht identifiziert werden. Wir untersuchten, ob sich bei OMS-Patienten Autoantikörper gegen ein gemeinsames Autoantigen nachweisen lassen und ob diese Autoantikörper einen funktionellen Effekt auf neuronale Zellen haben.

Methoden: Es wurden Seren von 31 Kindern mit OMS auf das Vorkommen antineuronaler Autoantikörper untersucht. Seren von Kindern mit Neuroblastom ohne OMS und Seren von gesunden Kindern dienten als Kontrolle. Die Autoantikörperdiagnostik wurde mittels Immunfluoreszenztest, Westernblot und Durchflusszytomterie durchgeführt. Um einen möglichen funktionellen Effekt dieser Autoantikörper auf neuronale Zellen nachzuweisen, wurde die Aktivierung des MAPKinase pathway bzw. der Einfluß von OMS-IgG auf den Phosphorylierungsgrad des Enzyms ERK-1/2 bestimmt.

Resultate: In den Seren von OMS-Patienten wurden im Immunfluoreszenztest häufiger Antikörper gegen intrazelluläre bzw. antineuronale Autoantigene nachgewiesen als in den Seren der Kontrollgruppen ($p < 0.01$). In der Westernblot Analyse mit Zellen des humanen Cerebellums fand sich ebenfalls bei den OMS-Patienten ein signifikant höheres Vorkommen von Autoantikörpern als bei den Kontrollgruppen ($p < 0.05$). Bei 9/31 der OMS Patienten, jedoch bei keinem Kontrollpatienten wurde ein Autoantikörper gegen ein neuronales 55kD Protein gefunden ($p < 0.01$). Weiterhin konnten durchflußzytometrisch Autoantikörper gegen Oberflächenepitope von zerebellären Granularisneuronen (CGN) ausschließlich bei den OMS-Patienten nachgewiesen werden ($p < 0.05$). Die IgG-Fractionen von OMS-Patienten, nicht aber die der Kontrollen erzeugen in CGN eine Phosphorylierung des Enzyms ERK-1/2 nach 10 Minuten, die nach 30 min wieder rückläufig ist ($p < 0.01$).

Diskussion: Die nachgewiesenen Autoantikörper gegen ein Oberflächenepitop von CGN und die funktionellen Effekte der OMS-IgG-Fractionen in diesen Zellen weisen auf einen humoral vermittelten Autoimmunprozess als wichtiges Element in der Pathogenese dieses Syndroms hin.

Summary

Introduction: Opsoclonus-myoclonus syndrome is a rare neurological disorder in children and adults. Clinically, the patients suffer from oscillating, synchronous, omnidirectional eye movements, myoclonus, ataxia and cognitive and behavioural disturbances. An autoimmune etiology is suspected in both paraneoplastic and other forms of OMS. The paraneoplastic OMS in children is mostly associated with neuroblastoma as an underlying tumour. However, a common autoantigen has not been identified yet. We investigated the sera from OMS patients for autoantibodies binding to a common autoantigen and for functional effects of these autoantibodies.

Methods: Sera of 31 OMS children were analysed for antineuronal autoantibodies. Controls included children with neuroblastoma without OMS and healthy controls. The following methods were used: Immunohistochemistry, Western blot and flow cytometry. The activation of one MAPKinase pathway measured by the degree of phosphorylation of the enzyme ERK-1/2 were analysed to detect a possible functional effect of autoantibodies on neuronal cells.

Results: Immunohistochemistry and Western blot analysis revealed increased prevalence of autoantibodies directed against intracellular neuronal autoantigens in OMS patients compared to controls ($p < 0.05$). Western blot analysis of SKN-SH cells and human cerebellum demonstrated a common 55 kD reactivity in 9/31 OMS sera, but not in controls ($p < 0.01$). Using flow cytometry, autoantibodies against surface epitopes of cerebellar granular cells (CGN) could be detected in OMS sera, but not in controls ($p < 0.05$). OMS-IgG, but not control-IgG increased the phosphorylation of ERK 1/2 after 10 minutes of incubation ($p < 0.01$).

Discussion: Pediatric OMS is associated with autoantibodies against a surface epitope of CGN. These autoantibodies have functional effects on CGN, shown by increased phosphorylation of a key enzyme of the MAP Kinase pathway. These results support the hypothesis of a humoral immune-mediated process contributing to the pathogenesis of OMS.

1. Einleitung

1.1. Das Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom

Das Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom (OMS), im angloamerikanischen Sprachgebrauch auch „dancing-eyes-syndrome“ oder Kinsbourne syndrome genannt, ist eine seltene neurologische Störung, deren Ätiologie bisher noch weitgehend ungeklärt ist. Erstmals wurde dieses Syndrom, das neben einer Augenbewegungsstörung (Opsoklonus) auch unwillkürliche Muskelzuckungen (Myoklonus), eine Ataxie und intellektuelle Entwicklungsstörungen umfasst, von M. Kinsbourne beschrieben (Kinsbourne, 1962). Das OMS tritt sowohl bei Erwachsenen als auch bei Kindern auf. Es setzt sich aus verschiedenen Komponenten zusammen: Der Opsoklonus ist durch schnelle, unregelmäßige und unwillkürliche, konjugierte Augenbewegungen in unterschiedliche Richtungen gekennzeichnet. Er kann durch das Fixieren eines Gegenstandes mit den Augen ausgelöst werden und bleibt auch während des Schlafes bestehen. Die Häufigkeit der Oszillation ist unregelmäßig, meist liegt sie bei 6 bis 12 Hz (Übersicht in Blaes et al. 2001). Myoklonien sind kurze ruckartige Zuckungen einzelner Muskeln und Muskelgruppen, v.a. der Extremitäten, ohne nennenswerten Bewegungseffekt, die häufig in Verbindung mit einer zerebellären Ataxie auftreten (Klein et al. 2006). Diese kann so stark ausgeprägt sein, dass insbesondere betroffene Kinder nicht mehr in der Lage sind, selbständig zu gehen, zu stehen oder aufrecht zu sitzen (Deconinck et al. 2005). Das OMS bei Kindern geht oftmals mit einer Entwicklungsstörung und dem Verlust bereits erlernter Fähigkeiten, wie Sprache oder Koordination einher. Auch können die Patienten durch verändertes Verhalten, Schlafstörungen oder Reizbarkeit auffallen (Pranzatelli 1996). Das OMS ist mit einer ungünstigen Langzeitprognose verbunden, da die intellektuelle Entwicklungsstörung meist nicht aufgeholt werden kann. Bei den betroffenen Kindern lässt sich häufig eine starke Sprachstörung und Lernbehinderung beobachten (Mitchell et al. 2002).

Bisher beschriebene Ursachen des OMS sind Infektionen, Intoxikationen (z.B. mit Strychnin) und eine Medikamentenüberdosierung (z.B. von Lithium) (Blain, 1982; Cohen, 1974). Das OMS kann einer bakteriellen Infektion, z.B. mit Streptokokken, oder auch viralen Infektion, z.B. mit Enteroviren, folgen (Candler et al. 2006; Wiest et al. 1997). Ebenso können Impfungen ein OMS auslösen (Lapenna et al. 2000). Es

wurde ein Fall beschrieben, in dem OMS bei einem Kind, das an Zöliakie erkrankt war, auftrat (Deconinck et al. 2006). Des Weiteren kann man eine idiopathische und eine paraneoplastische Formen des OMS unterscheiden.

Paraneoplastische Syndrome sind Symptome, die in Zusammenhang mit einem Tumor auftreten, ohne dass die Symptome durch eine lokale Wirkung des Tumors oder seiner Metastasen entstehen und andere Ursachen dieser neurologischen Symptome ausgeschlossen wurden. Diese Syndrome können einem klinisch nachweisbaren Tumor um Monate bis zu einigen Jahren vorausgehen, aber auch gleichzeitig mit dem Tumor oder nach Diagnose des Tumors beobachtet werden. Man unterscheidet klassische von nicht-klassischen paraneoplastischen neurologischen Syndromen. Des Weiteren differenziert man zwischen Syndromen des zentralen Nervensystems (ZNS), Syndromen des peripheren Nervensystems (PNS) und Syndromen der neuromuskulären Einheit und des Muskels. Die klassischen Syndrome des ZNS sind Enzephalomyelitis, limbische Enzephalitis, die subakute zerebelläre Degeneration und das OMS. Als klassische Syndrome des PNS gelten die subakute sensorische Neuronopathie und die chronische gastrointestinale Pseudoobstruktion. Häufig gehen sie mit dem Nachweis onkoneuraler Antikörper einher (Tab.1). Zu den klassischen Syndromen der neuromuskulären Einheit und des Muskels zählt man das Lambert-Eaton-Myasthenie Syndrom und die Dermatomyositis. Diese beiden Syndrome sind nicht mit bekannten onkoneuronalen Antikörpern assoziiert (Graus et al. 2004).

Tab. 1: Übersicht über antineuronale Antikörper bei Paraneoplasien: kennzeichnende Autoantikörper, zugrunde liegende Tumore und klinische Syndrome. Ein Antikörper weist in der Regel auf einen bestimmten assoziierten Tumor hin, kann aber mit verschiedenen klinischen Syndromen assoziiert sein. Benennungen nach Indexpatienten: Hu, Yo, Ri, Ma, Tr, CV2. CRMP 5 Collapsin-response-mediated protein-5. ANNA Antineuronal nukleärer Antikörper. PCA Purkinjenzell-Antikörper. SCLC small cell lung cancer (kleinzelliges Bronchiakarzinom).

<u>Autoantikörper</u>	<u>Assoziierter Tumor</u>	<u>Paraneoplastisches neurologisches Syndrom</u>
anti-Hu	Small cell lung cancer (SCLC)	Limbische Enzephalitis Sensor. Neuronopathie Paraneoplastische Kleinhirndegeneration
anti-Yo	Ovarialkarzinom Mammakarzinom	Paraneoplastische Kleinhirndegeneration
anti-Ri	Mammakarzinom SCLC	Hirnstammenzephalitis
anti-Ma2	Hodenkarzinom Lungenkarzinom	Limbische Enzephalitis Hirnstammenzephalitis
anti-Amphiphysin	Mammakarzinom SCLC	Stiff person Syndrom
anti-Tr	Hodgkin-Lymphom	Paraneoplastische Kleinhirndegeneration
anti-CV2	SCLC Thymom	Sensor. Neuronopathie Paraneoplastische Kleinhirndegeneration Limbische Enzephalitis
anti-ANNA 3	SCLC	Paraneoplastische Neuropathie
anti-PCA2	SCLC	Limbische Enzephalitis Hirnstammenzephalitis

Im Erwachsenenalter nimmt die idiopathische Form einen milderen Verlauf als die paraneoplastische Form des OMS. Die paraneoplastische Form tritt bei Patienten mit Tumorerkrankungen, v.a. einem kleinzelligen (SCLC) oder nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC), Brust- und Ovarialkarzinom, aber auch einem Adenokarzinom des Magens oder einem Nierenkarzinom auf (Bataller et al. 2001; Wong, 2007).

Bei Kindern liegt dem paraneoplastischen OMS fast immer ein Neuroblastom zugrunde (Rudnick et al. 2001). Das Neuroblastom zählt zu den embryonalen Tumoren, d.h.: der Tumor geht aus undifferenziertem Gewebe hervor. Diesem extrakraniellen, soliden Tumor liegt eine Entartung oder fehlende Ausdifferenzierung von Nervenzellen des sympathischen Nervensystems zugrunde. Die Tumore sind bisweilen so klein, dass sie erst autoptisch nachgewiesen werden können. Die häufigste Lokalisation des Tumors ist an der Nebenniere. Er kann jedoch auch an beliebiger Stelle des paravertebralen Grenzstrangs entstehen. Der Tumor kann Filiae in Lymphknoten, Leber, Haut, Knochen und Knochenmark, und in seltenen Fällen in das zentrale Nervensystem aussähen. Die Symptome können unspezifisch sein (Fieber, Gewichtsabnahme, Schmerzen) oder sich entsprechend der Lokalisation des Tumors bzw. seiner Metastasen auswirken. Es handelt sich um den häufigsten extrazerebralen malignen Tumor in Kleinkindalter und die zweithäufigste bösartige Erkrankung bei Kindern insgesamt. Etwa 30% der Kinder erkranken im ersten Lebensjahr, 90% der Patienten sind bei Diagnosestellung jünger als sechs Jahre. Bei mehr als 50% der Patienten liegt zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits eine Metastasierung vor (Hero et al. 2002). Die Stadieneinteilung erfolgt nach INSS-Kriterien (International Neuroblastoma Staging System) (Brodeur et al. 1993) (Tab. 2).

Tab.2: Stadieneinteilung des Neuroblastoms nach INSS-Kriterien

<u>Stadium 1:</u>	Lokalisierter Tumor mit makroskopisch kompletter Entfernung; kein Befall ipsi- und kontralateraler Lymphknoten; mit dem Tumor entfernte anhängende Lymphknoten dürfen befallen sein.
<u>Stadium 2a:</u>	Lokalisierter Tumor mit makroskopisch inkompletter Entfernung; ipsilaterale (nicht am Tumor adhärente) Lymphknoten sind histologisch ohne Tumorbefall.
<u>Stadium 2b:</u>	Lokalisierter Tumor mit oder ohne makroskopisch kompletter Entfernung; ipsilaterale nichtadhärente Lymphknoten zeigen Tumorbefall, vergrößerte kontralaterale Lymphknoten müssen histologisch unauffällig sein.
<u>Stadium 3:</u>	Nichtresektabler unilateraler Tumor, der die Mittellinie überschreitet, mit oder ohne Lymphknotenbefall oder unilateral lokalisierter Tumor mit kontralateralem Lymphknotenbefall oder Mittellinientumor mit bilateraler Ausdehnung durch Infiltration (nicht resektabel) oder durch Lymphknotenbefall.
<u>Stadium 4:</u>	Dissemination des Tumors in Fernlymphknoten, Knochen, Knochenmark, Leber, Haut und/oder andere Organe.
<u>Stadium 4S:</u>	Lokalisierter Primärtumor mit Dissemination in Haut, Leber und/oder Knochenmark. Nur bei Säuglingen im ersten Lebensjahr (in Knochenmarksbiopsie oder –aspiration weniger als 10% aller kernhaltiger Zellen maligne. Bei größerem Anteil an Tumorzellen erfolgt die Einordnung als Stadium 4).

Bei der histologischen Aufbereitung des Neuroblastomgewebes von Kindern mit OMS entsprechend der Kriterien der International Neuroblastoma Pathology Classification finden sich meist gut differenzierte Tumore mit ausgeprägter lymphocellulärer Infiltration (Cooper et al. 2001). Enthalten die Zellen des Neuroblastoms weder ein verändertes MYCN-Onkogen noch einen diploiden Chromosomensatz, korreliert dies mit einer günstigen Prognose (Gambini et al. 2003).

2-3% der an einem Neuroblastom erkrankten Kinder entwickeln ein OMS (Antunes et al. 2000), bei etwa 25 - 50% der an einem OMS leidenden Kinder wird ein Neuroblastom diagnostiziert (Blaes, 2007). Mädchen sind von einem OMS häufiger betroffen als Jungen. In früheren Studien wurde eine bessere Prognose bezüglich des Tumorleidens bei Kinder mit Neuroblastom und OMS diskutiert (Altmann et al. 1976). In einer neueren Studie zeigte sich jedoch, dass nach Einbeziehung demographischer Daten und Tumorstadium nur ein geringer Unterschied hinsichtlich der Überlebensrate besteht (Rudnick et al. 2001).

Liquor- IgM und - IgG bei Patienten mit OMS sind in vielen Fällen erhöht. Es lassen sich häufig oligoklonale Banden nachweisen, die zwar unspezifisch sind, aber auf einen entzündlichen Prozess im Nervensystem hinweisen (Pranzatelli, 1996). Das Auftreten des paraneoplastischen Syndroms und der Autoantikörper wurde mit einem langsameren klinischen Verlauf der primären Neoplasie in Verbindung gebracht (Salmaggi et al. 1997). Desweiteren wurden bei Kindern mit OMS eine Pleozytose, eine vier- bis siebenfach höhere Zahl von B-Lymphozyten und ein erhöhter Prozentsatz aktivierter T-Zellen im Liquor als bei den gesunden Kontrollen gemessen (Pranzatelli et al. 2004). Die Liquorkonzentration des B-Zell-Anteils und die prozentuale Veränderung bestimmter T-Zellpopulationen im Liquor korrelierte mit der Schwere der neurologischen Erkrankung. Eine vorausgehende Behandlung mit konventioneller Immuntherapie, Chemotherapie oder Tumorresektion hatte die B-Zell-Konzentration bei Patienten mit fortbestehenden Symptomen nicht normalisiert. Bei Kindern mit Neuroblastom zeigte die Therapie keinen Einfluss auf die immunologischen Veränderungen (Pranzatelli et al. 2004).

Sowohl die idiopathische als auch die paraneoplastische Form des OMS lässt sich durch immunsuppressive Therapie behandeln. Die neurologischen Symptome des OMS bessern sich nach der Gabe von Steroiden, ACTH oder intravenös verabreichter Immunglobuline (Pranzatelli 1996). Sie können allerdings nach einer Dosisreduktion erneut aufflammen (Fisher et al. 1994). Bei Patienten mit paraneoplastischem OMS (OMS-NB+), die nach der Tumorresektion weder Chemo- noch Radiotherapie erhielten, bleibt die neurologische Symptomatik häufig bestehen. Sie kann folglich nicht als Nebenwirkung der postoperativen Behandlung gewertet werden (Fisher et al. 1994). Kinder, die eine Chemotherapie erhalten, haben geringer ausgeprägte neurologische Spätfolgeschäden als Kinder, die keine Chemotherapie bekommen- dies mag an dem immunsuppressiven Effekt der Chemotherapeutika

liegen (Rudnick et al. 2001). Die Störung der kognitiven Fähigkeiten und des Verhaltens sind die am häufigsten auftretenden und am längsten fortbestehenden Spätfolgeschäden des OMS bei Kindern. Hierbei wird der Langzeiteffekt immunsuppressiver Therapien, die in der Akutphase meist gut wirken, in der Literatur kontrovers diskutiert (Mitchell et al. 2002).

Bezüglich der Lokalisation des OMS wird eine Störung im Kleinhirn angenommen. Hierfür spricht nicht nur klinisch die Ataxie. Eine pathologische Veränderung des ZNS bei Kindern - der Untergang von Purkinje- und Körnerzellen mit einhergehender Gliosis - ließ sich bisher ausschließlich im Kleinhirn bioptisch nachweisen (Tuchman et al. 1989).

1.2. Autoimmunität und Paraneoplastische Syndrome

Das Immunsystem hat die Aufgabe, den Organismus vor schädlichen Einflüssen zu schützen. Zu den schädlichen Einflüssen zählen: Viren, Bakterien, Umwelttoxene - also Stoffe, die von außen an den Körper herantreten, aber auch Schadstoffe, die der Körper selbst hervorbringt, z.B. Tumorzellen. Bei intaktem Immunsystem können diese Zellen rechtzeitig erkannt und durch eine entsprechende Reaktion abgetötet werden. Neben verschiedenen unspezifischen Abwehrmechanismen bildet das Immunsystem spezifische Immunreaktionen gegen definierte Antigene. Bei dieser Antigen-spezifischen Immunantwort kann eine humorale von einer zellulären Immunantwort unterschieden werden. Die zellulär spezifische Immunantwort wird durch T-Zellen bewerkstelligt. Für die Aktivierung von T-Lymphozyten sind mehrere Kostimulantien notwendig. Konventionelle Antigene aktivieren bis zu 1% der T-Zellen. Sogenannte Super-Antigene, die T-Zellen direkt, ohne vorausgehende zelluläre Prozessierung und Darbietung durch antigenpräsentierende Zellen (APCs) aktivieren können, aktivieren 20-30% der peripheren T-Zellen. Eine Störung des Gleichgewichts der T-Helfer- und der T-Suppressor-Zellen kann zur Autoimmunität führen (Konzept der klonalen Balance). T-Zellen, die während des Reifungsprozesses im Thymus nicht in ausreichendem Maße zwischen körpereigenen und körperfremden Proteinen zu unterscheiden lernen, besitzen autoaggressives Potential. Sie tragen Rezeptoren, die organspezifische Eigenantigene bzw. deren kryptische Bestandteile erkennen. So könnten z.B.: ZNS-

spezifische Antigene, die in den Blutkreislauf gelangen, als Fremdartigene erkannt werden und zur Autosensibilisierung führen.

Die spezifische humorale Immunantwort wird durch Antikörper, die im Blut zirkulieren, bewerkstelligt. Diese werden von reifen B-Lymphozyten bzw. Plasmazellen gebildet und an die Körperflüssigkeit abgegeben. B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, Makrophagen und Monozyten sind Bestandteil der zellulären Immunantwort. Es gibt zwei Klassen von B-Lymphozyten: Plasmazellen und Gedächtniszellen. Plasmazellen bilden und sezernieren zunächst IgM- (während etwa der ersten zwei Tage der Immunantwort), später IgG-Antikörper. Gedächtniszellen führen bei erneutem Kontakt mit dem gleichen Antigen zur schnelleren, stärkeren und länger anhaltenden Bildung von IgG-Antikörpern, deren Affinität zum Antigen höher ist. Auf der Zelloberfläche der B-Lymphozyten befinden sich IgM- und IgG-Rezeptoren. Bindet an diese Rezeptoren ein Antigen, kommt es unter dem Einfluss von T-Lymphozyten und akzessorischen Zellen der zellulären Immunantwort zur Proliferation (Klonierung) und Differenzierung der B-Lymphozyten. B-Lymphozyten erkennen viele körpereigene Strukturen (körpereigene „Antigene“) - man kann sie als natürlich auftretende, multireaktive Abwehrzellen bezeichnen. Sie können beispielsweise gegen ein Organ nach einer vorausgegangenen Schädigung anderer Ursache gebildet werden. In diesem Fall sind die Autoantikörper die Folge eines auslösenden Agens und nicht die Ursache der Schädigung. Produzieren die B-Lymphozyten aufgrund unspezifischer polyklonaler Stimulation übermäßig viele oder strukturell veränderte autoreaktive Klone, kann das der Grund für das Auftreten pathologischer Autoantikörper sein. Diese Stimulation kann z.B. durch Viren oder Neoplasien induziert werden.

Das Gehirn ist durch die Blut-Hirn-Schranke vor Angriffen des Immunsystems geschützt. Nichtaktivierte T- und B-Lymphozyten können die Blut-Hirn-Schranke nicht durchdringen. Aktivierte T-Zellen, die bis ins Gehirn vordringen, verlassen es aufgrund der fehlenden Restimulation durch ein Fremdartigen wieder. Aktivierte B-Zellen können ebenfalls in das Gehirn wandern. Dies würde die intrathekale Ig-Synthese erklären, die bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen des ZNS beobachtet werden kann. Es ist jedoch unklar, welchen Stimuli die B-Lymphozyten auf ihrer Migration durch die Blut-Hirn-Schranke folgen. Die niedrige Expression von MHC-I- und MHC-II- Molekülen auf Neuronen schützt diese normalerweise vor der Induktion autoimmuner Geschehnisse im ZNS. Erkennen Lymphozyten neuronale

Antigene jedoch als Fremdproteine, führt dies zur Proliferation und Stimulation der Lymphozyten (Übersicht in Pranzatelli,1996).

Alle an der regulären Immunantwort beteiligten Komponenten können durch Ausfall oder Überreaktion zu einer Autoimmunerkrankung beitragen. Dabei werden körpereigene Strukturen fälschlicherweise als Fremdartigen erkannt. Die Autoimmunantwort wird, wie auch die normale Immunreaktion, durch genetische, hormonelle oder umweltbedingte Faktoren ausgelöst. Sie wird durch die Darbietung von Fremdartigen (Viren, Bakterien), von normalerweise verborgenen, körpereigenen Antigenen (z.B. Proteine des Nervensystems, die jenseits der Blut-Hirn-Schranke sitzen; durch die Lyse virusinfizierter Zellen) oder durch eine Störung der Immunregulation getriggert.

Richtet sich ein Antikörper gegen ein Fremdprotein und zugleich gegen ein körpereigenes Protein spricht man von einer Kreuzreaktion. Die fremden und die körpereigenen Komponenten müssen hierfür eine gewisse Strukturähnlichkeit (molekulares Mimikry) aufweisen. Zugleich müssen sie sich in ausreichendem Maße von einander unterscheiden, um die Immuntoleranz aufzuheben. Das Fremdartigen wird vom Immunsystem erkannt und die entsprechende Immunantwort wird eingeleitet. In gleichem Maße richtet sich die Immunreaktion aber auch gegen die körpereigene Struktur und kann diese in ihrer Funktion stören oder sie gänzlich zerstören. Dabei können Autoantikörper, die sich gegen Zelloberflächenepitope, wie Adhäsionsmoleküle oder Rezeptoren richten, direkt pathogen wirksam sein. Eine Autoimmunerkrankung, bei der dieser Pathomechanismus nachgewiesen wurde, ist die Myasthenie. Bei der Myasthenia gravis binden Autoantikörper mit hoher Affinität an die extrazellulären Epitope von Acetylcholinrezeptoren (AChR) (Vincent et al. 1987). Durch die dadurch ausgelöste Internalisierung der AChR und den nachfolgenden Abbau der AChR wird die Rezeptordichte an der postsynaptischen Membran reduziert (Heinemann et al. 1977). Infolgedessen ist die postsynaptische Depolarisation zu gering, um das notwendige Schwellenpotential zur Öffnung der spannungsabhängigen Kaliumkanäle einzuleiten und ein Muskelfaseraktionspotential auszulösen (Vincent et al. 2006). Serum-IgG-Antikörper von OMS-Patienten binden nachweislich an Oberflächenantigene von Neuroblastomzellen und beeinträchtigen deren Funktion (Korfei et al. 2005). Dagegen ist eine direkt pathogene Wirkung von Autoantikörpern, die gegen intrazelluläre Antigene gerichtet sind, umstritten (Blaes et al. 2000; Alacorn-Segovia et al. 1996; Reichlin, 1998).

Beim paraneoplastischen OMS des Erwachsenen wurden anti-Hu- und anti-Ri-Antikörper als definierte antineuronale Immunreaktionen identifiziert. Anti-Hu-Antikörper reagieren mit einer Gruppe RNA-bindender Proteine in Neuronen des ZNS und PNS (Dalmau et al. 1992). Die entsprechenden Hu-Antigene werden in den Kernen differenzierter, reifer Neurone und auch in Neuroblastomzellen, in chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks und in Bronchialzellen exprimiert (Marusich et al. 1994). Anti-Ri-Antikörper binden ausschließlich an zentralnervöse Neurone (Budde-Steffen et al. 1988). Zwei Antigene konnten als Zielantigen des anti-Ri Autoantikörpers identifiziert werden: NOVA-1 ist ein intrazelluläres Protein, das von Tumoren und Neuronen exprimiert wird (Anderson et al. 1988; Dalmau et al. 1990). Es ist in seinem Vorkommen auf subkortikale Neurone beschränkt und fungiert als nukleäres RNA-Bindungsprotein (Buckanovich et al. 1996). Anti-Ri-Antikörper blockieren die RNA-Bindungsstelle von NOVA-1 (Buckanovich et al. 1996). NOVA-2, ebenfalls ein RNA-Bindungsprotein, ist eng verwandt mit NOVA-1. Sein neuronales Expressionsmuster (v.a. Neokortex und Hippocampus) legt eine Rolle in der Entwicklung kognitiver Defizite bei OMS-Patienten nahe (Yang et al. 1998). Im Gegensatz zum OMS beim Erwachsenen konnte beim kindlichen OMS bisher kein gemeinsames Autoantigen in einer Mehrheit der Patienten beobachtet werden. Insbesondere konnten anti-Ri Antikörper beim kindlichen OMS nie beobachtet werden (Blaes et al. 2007).

In den Seren von Kindern mit OMS wurden Autoantikörper, die gegen die hochmolekulare Untereinheit (210kD) des Neurofilamentproteins gerichtet waren, identifiziert (Noetzel et al. 1987). Es stellte sich jedoch heraus, dass diese Autoantikörper auch bei Patienten mit anderen neurologischen oder rheumatologischen Erkrankungen und sogar bei gesunden Individuen nachgewiesen werden konnten (Stefansson et al. 1985; Braxton et al. 1989; Salih et al. 1998).

Es wurde ein Fall beschrieben, in dem bei einem an einem Neuroblastom erkrankten Kind in Serum und Liquor anti-Hu Autoantikörper gefunden wurden (Fisher et al. 1994). Neuroblastome sind in etwa 75% der Fälle positiv für Hu-Antigene, aber nur in etwa 4% für Serum-anti-Hu Antikörper (Pranzatelli 1996). Das alleinige Vorhandensein der Antigene reicht offensichtlich nicht aus, die Antikörperbildung zu aktivieren (Salmaggi et al. 1997). Ebenso wenig können anti-Hu Antikörper der alleinige Auslöser des OMS sein, da sie auch bei Neuroblastompatienten ohne OMS vorkommen (Antunes et al. 2000). Bei Kindern mit OMS konnte ein spezifisches

Bindungsmuster an neuronales Gewebe (Purkinjezellzytoplasma, Axone peripherer Nerven und weiße Substanz des Cerebellums) nachgewiesen werden. Es blieb bisher unklar, gegen welches Antigen die nachgewiesenen Autoantikörper gerichtet sind, ob sie einen pathogenen Effekt haben oder ob sie lediglich als Marker für eine zugrunde liegende Tumorerkrankung zu werten sind (Conolly et al. 1997). Das häufige Vorkommen von antineuronalen Autoantikörpern legt jedoch nahe, dass OMS immunvermittelt ist (Antunes et al. 2000).

Mittels cDNA bank screening wurden zahlreiche Proteine (PP1, Kinesin 5B, Kinesin 21B, kolorektales Suppressorprotein) identifiziert, die am Aufbau der postsynaptischen Einheit beteiligt sind und an der Entstehung eines OMS beteiligt sein könnten. Diese Proteine sind an der Bildung eines Komplexes mit Oberflächenproteinen beteiligt oder intrazellulär lokalisiert. An einige dieser Proteine binden Serum-Antikörper von OMS-Patienten. Eine immunologische Entdifferenzierung oder Schädigung der Synapsen könnte eine neurologische Dysfunktion ohne Zelltod verursachen (Bataller et al. 2003). Die genannten Antigene wurden zum Teil nur bei einzelnen Patienten beschrieben, ein gemeinsames Antigen für alle Patienten wurde nicht beschrieben. Aufgrund der intrazellulären Lokalisation ist es unwahrscheinlich, dass diese Antigene die Bildung pathogen wirksamer Auto-Antikörper induzieren.

1.3. Fragestellung

In den Seren von Kindern mit OMS werden häufig Autoantikörper, die bisher noch nicht identifiziert werden konnten, gefunden. Ebenso ist unklar, gegen welches Antigen diese Autoantikörper gerichtet sind und ob diese Autoantikörper eine funktionelle Wirkung innehaben. Vor diesem Hintergrund beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit folgenden Fragen:

- 1.) Ist bei Kindern mit Neuroblastom und Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom ein einheitlicher Autoantikörper im Serum nachweisbar ?
- 2.) Welches Bindungsverhalten zeigen diese Autoantikörper (intra- oder extrazelluläre Bindung) an neuronalen Zellen?
- 3.) Bewirken die Autoantikörper eine Aktivitätsänderung bestimmter Enzyme von intrazellulären Signalwegen in Kleinhirnzellen?

2. Patienten und Methoden

2.1. Patienten

In dieser Studie wurden Seren von insgesamt 31 Patienten mit Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom auf das Vorkommen von Autoantikörpern gegen neuronales Gewebe untersucht. 23 Seren stammten von weiblichen, neun Seren von männlichen Probanden. Das Durchschnittsalter der Patienten bei Erkrankungsbeginn lag bei 28.8 ± 14.1 Monaten (Mittelwert \pm Standardabweichung). 10 Patienten hatten ein Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom ohne Neuroblastom (OMS-NB-, mittleres Alter 33.2 ± 18.9 Mon), bei 21 Patienten lag ein Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom mit Neuroblastom (OMS-NB+, mittleres Alter 26.7 ± 11.2 Mon) vor. Kein Patient hatte vor Abnahme des Serums eine Therapie (chirurgisch, immunsuppressiv, IVIG) erhalten. Als Kontrolle wurden Seren von 20 Kindern mit Neuroblastom (NB) ohne begleitendes Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom (Seren von Patienten der Deutschen Neuroblastomstudie, 11 weiblich / 9 männlich, mittleres Alter 21.8 ± 9.1 Mon) und 15 Seren gesunder Probanden, 9 weiblich / 6 männlich, (gesunde Kontrollen (HC), mittleres Alter 26.9 ± 14.7 Mon) verwendet.

Die Verteilung der Tumorstadien ist in Tab.3 angegeben.

Tab.3: Tumorstadienverteilung der OMS- und Neuroblastompatienten. Die Einteilung in Stadien erfolgte nach den INSS-Kriterien. In der Kontrollgruppe wurden Patienten mit Neuroblastom in unterschiedlichen Stadien ohne begleitendes OMS zusammengefasst.

Tumor	Stadium I	Stadium IIa	Stadium IIb	Stadium III	Stadium IV
Ganglioblastom (OMS-NB+)	1/21	1/21	-	-	-
Neuroblastom (OMS-NB+)	9/21	5/21	1/21	2/21	2/21
Kontrollgruppe Neuroblastom (NB)	7/20	5/20	2/20	3/20	3/20

Die Seren der Kinder wurden nach Aufklärung der Eltern und deren Einverständniserklärung abgenommen. Die Patienten der Kontrollgruppe bzw. deren Eltern waren mit der Verwendung der Seren für diese Studie einverstanden.

Alle Seren wurden bis zu ihrer Austestung bei -20 °C gelagert.

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkulturmedien und Puffer

Hank's balanced salt solution (HBSS, Gibco), welches für die Zellseparation benötigt wurde, wurde unmittelbar vor Gebrauch steril filtriert.

Die Zellseparation wurde mit Trypsin/DNAse I Solution (Trypsin, Sigma) und DNAse I Solution (DNAse I, Sigma) durchgeführt. Für die Trypsin/DNAse I Solution benötigten wir 0,1g Trypsin, 10mg DNAse I, 100µg 80mMol MgCl, 10ml HBSS. Der pH-Wert wurde auf 7,8 eingestellt.

Die DNAse I Solution setzte sich aus 10mg DNAse I, 50mg Glucose, 20ml MEM (Minimal essential medium, Invitrogen) zusammen. Beide Lösungen wurden steril filtriert und bis zu ihrer Verwendung in 1ml Aliquots bei -20 °C gelagert.

Für die Inkubation der HEK 293-Zellen und der SKN-SH-Zellen (Neuroblastomzellen) wurde RPMI-1640 (Gibco) verwendet. Dieses enthielt zusätzlich 10% fetales Kälberserum (FCS, Gibco), 1%-ige Penicillin-Streptomycin-Mischung (PS, Gibco) und 1% Glutamin (Gibco).

Für die FACS-Untersuchung wurde ein spezieller FACS-Puffer und ein Permeabilisationspuffer (Permeab-puffer) benötigt. Der FACS-Puffer wurde aus PBS (1 Liter aqua destillata, 8,5g NaCl, 1,42g Na₂HPO₄, 0,29g NaH₂PO₄), 1% FCS und 0,1% Natriumazid (NaN₃, Sigma) zusammengesetzt. Der Permeabilisationspuffer bestand aus FACS-Puffer angereichert mit 0,1% Saponin (Sigma).

2.2.2. Präparation des Rattenkleinhirns

Zur Gewinnung des Rattenkleinhirns wurden sechs bis sieben Tage alte Wistar Ratten beiderlei Geschlechtes verwendet. Anhand von Voruntersuchungen hatte sich gezeigt, dass Tiere diesen Alters am besten für die Experimente dieser Studie

geeignet waren, da die Nerven- und Gliazellen des Kleinhirns in diesem Alter noch gut aus dem Zellverband zu lösen sind.

Die Tiere wurden durch Dekapitation getötet. Der Kopf wurde mit einer gebogenen Pinzette hinter den Ohren fixiert. Haut, Muskulatur und Ohren wurden vom Hinterhaupt mit Hilfe einer kleinen Schere entfernt. Die Schere wurde in die Öffnung des Rückenmarkkanals (Foramen magnum) eingeführt und die noch knorpelige Schädelkapsel mit einem Längsschnitt eröffnet. Dieser Schnitt wurde auf Höhe der Ohren beidseits waagrecht geführt, so dass nun die beiden Hälften der Schädelkapsel aufgeklappt werden konnten. Das Kleinhirn wurde mit einer feinen gebogenen Pinzette entnommen und in eiskaltes, sterilfiltriertes HBSS gelegt. Unter einem Stereomikroskop wurde das Kleinhirn von Blutgefäßen und Hirnhäuten befreit. Anschließend wurde das gesäuberte Kleinhirn in frisches, sterilfiltriertes und ebenfalls gekühltes HBSS überführt und in drei Stücke geschnitten.

2.2.3. Zellseparation

Die Zellseparation des Kleinhirns wurde in einer Sterilbank durchgeführt.

Die Kleinhirnstücke wurden in eine 15ml Falcon tube gegeben und dreimal mit 5ml HBSS gespült. Das HBSS wurde entfernt, 1ml Trypsin/DNAse Lösung wurde zugegeben und für 15 Minuten inkubiert. Nach Verstreichen der Inkubationszeit wurde die Trypsin/DNAse Lösung abpipettiert und 1ml DNAse Lösung hinzugefügt.

Nun wurde das Kleinhirn homogenisiert: Hierfür wurden Pasteurpipetten mit abgerundeter Öffnung in absteigendem Durchmesser (10ml, 5ml, 1ml) verwendet. Die Lösung wurde mit jeder Pasteurpipette etwa zehnmal angesaugt und abgegeben. Schließlich wurden 5ml eisgekühltes HBSS beigemischt und die Suspension wurde für 5 Minuten auf Eis gestellt. Lagerten sich auf dem Boden der Falcon tube sichtbar Zellen ab, so waren diese ungenügend suspendiert. In diesem Fall wurde die übrige Flüssigkeit abgesaugt und eine neue Falcon tube überführt.

Die gut suspendierte Lösung wurde für die Dauer von 15 Minuten bei 100g und 4°C in einer JOUAN Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert mit 1ml eiskaltem PBS auf einem Vortexschüttler resuspendiert.

2.2.4. Vitalitätsprüfung

Vor der Zentrifugation der Zellsuspension wurde eine Vitalitätsprüfung der erhaltenen Zellen durchgeführt. Dafür wurden 4/5 Zellsuspension mit 1/5 Lösung Trypanblau (0,5% in 0,9%-igem NaCl, Boehringer, Mannheim) angesetzt. Dieses Gemisch wurde danach in eine Neubauer Zählkammer gegeben, und unter dem Mikroskop (Olympus, Japan) wurden alle blau gefärbten und alle ungefärbten Zellen bei 100-facher Vergrößerung gezählt (tote Zellen: blau, lebende Zellen: ungefärbt). Trypanblau kann tote Zellen permeabilisieren und somit diese avitalen Zellen blau färben, da deren Zellwand beschädigt ist. Zellwände gesunder Zellen kann dieser Farbstoff nicht durchdringen, wodurch diese Zellen ungefärbt bleiben.

Durchschnittlich fanden sich circa 90-95 % lebende Zellen, die überwiegende Mehrheit davon zerebelläre Körnerzellen (CGN).

2.3. Bestimmung von Autoantikörpern

2.3.1. Indirekter Immunfluoreszenztest (IFT)

Dazu wurden nicht fixierte Gefrierschnitte von Primatendarm, Kleinhirn und von humanen Epithelzellkulturen (HEp-2 Zellen) (Euroimmun) benutzt. Die Verdünnung der Seren mit PBS mit 0,2% Tween 20 (Tween 20, Merck) betrug 1:32. Die Präparate wurden mit 65µl einer Probe je Feld 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Im Anschluß wurden die Objektträger in PBS-Tween 0,2% gewaschen und es folgte der zweite Inkubationsschritt. Auf die Präparate wurden 67µl des monoklonalen Fluorescein-markierten Anti-Human-IgG-Antikörpers aus der Maus gegeben (FITC anti-Human-IgG, Dako, Verdünnung 1/50, Inkubationszeit 30 min im Dunklen). Nachfolgend wurden die Objektträger erneut in PBS Tween 0,2% gewaschen, mit Mounting Medium (Euroimmun) beschichtet und mit Deckgläsern versehen.

Als Positivkontrolle diente ein bereits ausgetestetes Patientenserum mit Anti-Hu-positivem Antikörpernachweis.

Als Negativkontrollen wurden die Objektträger nur mit PBS-Tween 0,2%, nur FITC-markiertem anti-human IgG und gesunden Kontrollseren inkubiert.

Die Beurteilung der Präparate erfolgte unter einem Zeiss Fluoreszenzmikroskop.

2.3.2. Westernblot

Die Westernblotuntersuchung wurde an drei verschiedenen löslichen Proteinfractionen vorgenommen: diese wurden aus HEK 293-Zellen, SKN-SH-Zellen und humanem Kleinhirn hergestellt.

Die Aufbereitung der Zellen erfolgte nach standardisiertem Verfahren: Zu dem Zellpellet wurde 1ml phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) gegeben. Diese Lösung wurde homogenisiert, es wurden 100µl Proteinase-Inhibitor Cocktail (Proteinase-Inhibitor Cocktail, Sigma) hinzugefügt und die am Zapfen des Homogenisators verbliebenen Zellen wurden mit 200-300µl PBS abgespült. Um eine bestmögliche Homogenisierung zu erreichen, wurde diese Lösung mehrmals durch eine Insulinspritze aufgezogen, anschließend bei 4 °C 4x15 Sekunden Ultraschallhomogenisiert (Bandelin Sonopuls). Das Homogenisat wurde zentrifugiert (Hettich Universal 32 R, 13000U/10sec), die Proteine in Probenpuffer (NUPAGE LDS Sample Buffer 4x, Invitrogen) aufgelöst und bei 90°C für 5 Minuten erhitzt. Diese Proteinlösung wurde in 100µl-Portionen bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert. Vor Gebrauch wurden die löslichen Proteinfractionen 5 Minuten auf 70°C erhitzt und es wurden 10µl Reducing Agent (NUPAGE Sample Reducing Agent, Novex) hinzugegeben, um die Zellmembran aufzulösen.

Die Proteinfraction wurde mittels Elektrophorese auf einem 4-12% Gradientenpolyacrylamidgel (NUPAGE Gel, Invitrogen) aufgetrennt (zunächst 10 Minuten bei 20mA, dann eineinhalb Stunden bei 100 mA). Die Proteine wurden in einer Bloteinheit (Novex Xcell Sure Lock, Invitrogen) bei 150 mA für zwei Stunden auf Nitrocellulosefolie transferiert. Um den Proteintransfer nachzuweisen, wurde die Nitrocellulosefolie mit Tintenstain (1% Tinte, 1% HAC, 98% H₂O) gefärbt, anschließend mit 0,1mol NaOH entfärbt, in aqua dest. gespült, getrocknet und in Streifen geschnitten.

Zur Austestung wurde jeder Streifen mit dem Patientenserum für eine Stunde inkubiert (Initialverdünnung 1:100 in Mischpuffer; Mischpuffer: 4,5g NaCl, 0,71g Na₂HPO₄, 0,15g NaH₂PO₄, 5,5g Milchpulver, 2,5ml Tween20 in 500ml aqua dest.) und danach dreimal je fünf Minuten in Mischpuffer gespült. Um spezifische Reaktionen sichtbar zu machen, verwendeten wir einen monoklonalen Alkalische-Phosphatase(AP)-konjugierten anti-human-IgG-Antikörper (Dako, 1 Stunde Inkubationszeit), 1:750 mit Mischpuffer verdünnt, der ebenfalls dreimal je fünf

Minuten mit Mischpuffer ausgespült wurde und BCIP-NBT (Euroimmun) als Färbereagenz. Die ungefähren Molekulargewichte wurden mittels Mark 12 Standard (Novex) abgeschätzt. Dazu wurde die vom Hersteller mitgelieferte Schablone (Mark 12 Standard), die Banden definierter Molekulargewichte zeigte, an die Teststreifen angelegt und auf Höhe der angefärbten Banden das Molekulargewicht abgelesen.

2.3.3. Durchflußzytometrische Untersuchung (FACS)

Diese Methode diente zum einen dazu, extra- bzw. intrazelluläre Bindung von Autoantikörpern an ganze Zellen festzustellen. Außerdem wurde der Phosphorylierungsstatus eines Enzyms des MAPKinase-Weges, ERK 1/2, mit dieser Methode bestimmt. Die Versuche wurden an drei verschiedenen Zelltypen durchgeführt: HEK 293-Zellen, SKN-SH-Zellen (Neuroblastomzellen) und primärkultivierten CGN. Die CGN wurden unmittelbar nach der Präparation bzw. Separation für den Versuch verwendet. Eine Anzucht dieser Zellen fand nicht statt.

Die HEK 293-Zellen wie auch die Neuroblastomzelllinien (SKN-SH) sind in unserem Labor etabliert. Die für den Versuch benötigte Zellsuspension wurde folgendermaßen hergestellt: Mit Trypsin (0.1%) wurde der Zellrasen vom Boden der Inkubationsflasche gelöst, das Trypsin wurde anschließend mit FCS neutralisiert. Die Zelllösung wurde zentrifugiert, der Überstand abgekippt und die Zellen wurden in 5ml PBS auf einem Vortexschüttler resuspendiert. Die Zellen wurden in einer Neubauer Zählkammer gezählt, erneut zentrifugiert, der Überstand abgekippt, das Zellpellet in PBS auf dem Vortexschüttler resuspendiert.

Diese Zellsuspension wurde auf die wells einer 96-Loch-Platte verteilt (100.000 Zellen pro well) und vier Minuten bei 1200U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt, die Zellen resuspendiert und anschließend in 100µl FACS-Puffer je well gewaschen.

Nachweis von Autoantikörpern gegen Oberflächenepitope

Im 1. Inkubationsschritt wurden die Zellen mit 50µl Serum in FACS-Puffer (Verdünnung 1:50) 30 Minuten inkubiert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die lediglich mit FACS-Puffer inkubiert wurden, als Positivkontrollen Zellen, die mit monoklonalem Antikörper (MHC1, NCAM; Verdünnung 1:100) inkubiert wurden. Die

Zellen wurden anschließend zweimal in FACS Puffer gewaschen, zentrifugiert und resuspendiert.

Im 2. Inkubationsschritt wurden die Zellen für 20 Minuten mit dem Zweitantikörper (Rabbit-anti-human-IgG FITC, Dako) in 50µl FACS-Puffer (Verdünnung 1:75) inkubiert. Die Zellen der Negativkontrolle wurden wiederum mit reinem FACS-Puffer inkubiert, die Zellen der Positivkontrolle mit Rabbit-anti-mouse-IgG FITC (Dako). Anschließend wurden die Zellen in 100 µl FACS Puffer zweimal gewaschen. Die Zellsuspensionen in den wells wurden mit jeweils 300 µl FACS-Puffer gut durchmischt und in FACS-Röhrchen gegeben.

Danach wurden die Probenröhrchen bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt bis sie am FACScan (Becton Dickinson, USA) durchflusszytometrisch untersucht wurden. Die Auswertung erfolgte mittels der CellQuest® Software.

Nachweis von Autoantikörpern gegen intrazelluläre Antigene

Zum Fixieren wurden die Zellen zunächst 15 Minuten lang bei 4°C mit 1%-igem Paraformaldehyd (Verdünnung 1:6 in PBS), 75µl je well, inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert, der Überstand abgekippt und die Zellen auf einem Vortexschüttler resuspendiert. Es folgte ein Waschschrift mit 100µl FACS-Puffer je well, erneute Zentrifugation, abkippen des Überstandes und Resuspendierung der Zellen. Ein weiterer Waschschrift mit 100µl Permeab-Puffer schloss sich an.

Im 1. Inkubationsschritt wurden die Zellen mit 50µl Serum in Permeab-Puffer (Verdünnung 1:50) für 20 Minuten inkubiert. Für die Negativkontrolle wurden die Zellen mit Permeab-Puffer inkubiert, für die Positivkontrolle mit monoklonalem Antikörper (Verdünnung 1:100). In einem Waschschrift mit 100µl Permeab-Puffer je well wurden die Zellen von überschüssigem Erstantikörper gereinigt. Sie wurden erneut zentrifugiert, der Überstand entfernt und die Zellen wurden resuspendiert.

Im 2. Inkubationsschritt wurden die Zellen mit 50µl Zweitantikörper (Rabbit-anti-human-IgG FITC bzw. Rabbit-anti-mouse-IgG FITC für die Positivkontrolle, Dako) in Permeab-Puffer (Verdünnung 1:75) 20 Minuten inkubiert, die Negativkontroll-Zellen mit reinem Permeab-Puffer. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert, der Überstand abgekippt, die Zellen resuspendiert.

Nach einem erneuten Waschschrift mit 100µl FACS-Puffer pro well wurden die Zellen mit je 300µl FACS-Puffer in die FACS-Röhrchen überführt und am FACScan

(Becton Dickinson, USA) durchflusszytometrisch untersucht. Die Auswertung wurde mit CellQuest® Software durchgeführt.

Protokoll für die Bestimmung der Aktivitätsänderung von phospho-ERK1/2:

Alle Versuchsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt.

Für den 1. Inkubationsschritt wurden die wells mit je 100µl IgG in PBS (Konzentration 1mg/ml) beschickt, die Zellen der Negativkontrolle mit reinem PBS, die Zellen der Positivkontrolle mit Doxorubicin (0,2µM). Die Inkubationszeiten betragen 5, 10 und 30 Minuten für jede IgG-Fraktion.

Dann wurden die Zellen zentrifugiert, der Überstand wurde abgekippt, die Zellen wurden resuspendiert.

Die Zellen wurden zweimal in kaltem (4°C) PBS (100µl/well) gewaschen, nach den jedem Waschschritten zentrifugiert, abgekippt, resuspendiert.

Nun wurden die Zellen mit 1%-igem Paraformaldehyd (75µl/well) 15 Minuten lang fixiert, anschließend zentrifugiert, abgekippt, resuspendiert. Es folgten wiederum zwei Waschschrritte mit je 100µl kaltem PBS pro well (s.o.).

Für den 2. Inkubationsschritt wurden die Zellen zunächst 10 Minuten lang mit kaltem Permeab FACS-Puffer (100µl/well) bei Raumtemperatur inkubiert, danach zentrifugiert, der Überstand wurde abgekippt, die Zellen resuspendiert.

Dann wurden die Zellen mit 75µl Anti-phospho-ERK1/2 je well bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, anschließend folgten zwei Waschschrritte, einmal mit 100µl Permeab FACS-Puffer pro well, einmal mit 100µl PBS pro well. An jeden Waschschrtritt schloss sich ein Zentrifugationsschritt an.

Die Zellen wurden mit 300µl FACS-Puffer in die FACS-Röhrchen gegeben und durchflußzytometrisch am FACScan (Becton Dickinson, USA) untersucht. Die Daten wurden mit der CellQuest® Software ausgewertet.

2.4. Statistik

Häufigkeitsvergleiche zwischen den Gruppen wurden mit Hilfe des Fisher's exact test, Titerunterschiede mit Hilfe des U-Testes und Vergleiche sonstiger Werte mit Hilfe des t-Testes (bei Vergleichen von mehr als zwei Gruppen ANOVA-Test) auf ihre Signifikanz überprüft.

Die Berechnungen von Spezifität und Sensitivität der Autoantikörperbestimmungen wurden mit Hilfe einer Vierfeldertafel bestimmt und die Signifikanz mit dem Chi-Quadrat-Test überprüft. Ein $p < 0.05$ wurde als signifikant betrachtet.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Graphpad Prism 4[®].

3. Resultate

3.1. Autoantikörper gegen intrazelluläre Antigene

Initial wurden die Seren der Patienten und Kontrollen mittels eines indirekten Immunfluoreszenztests untersucht. Bei 14/31 (45.0%) der OMS-Patienten, aber nur bei 3/20 (15.0%) der NB-Patienten und bei 1/14 (6.7%) der gesunden Kontrollen konnten im Immunfluoreszenztest Autoantikörper nachgewiesen werden ($p < 0.01$, Abb.1).

Davon hatten 4/31 (12.9%) OMS-Patienten antinukleäre Autoantikörper (ANA), 2/31 (6.4%) OMS-Patienten hatten Autoantikörper gegen Fasern und weiße Substanz, 1/31 (3.2%) Patient hatte Autoantikörper gegen Granulariszellen, 4/31 (12.9%) OMS-Patienten hatten Autoantikörper gegen das Zytoplasma von Purkinjezellen und 3/31 OMS-Patienten (9.6%) hatten antineuronal-nukleäre Autoantikörper.

Die OMS-Patienten mit (OMS-NB+) und ohne assoziiertes Neuroblastom (OMS-NB-) unterschieden sich nicht signifikant hinsichtlich der Häufigkeit von Autoantikörpern (OMS-NB+ 52.4% vs. OMS-NB- 30.0%, n. sign.). Auch ließen sich bei den OMS-NB+ Patienten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Häufigkeit des Auftretens von Autoantikörpern in den einzelnen Tumorstadien nachweisen (Abb. 2).

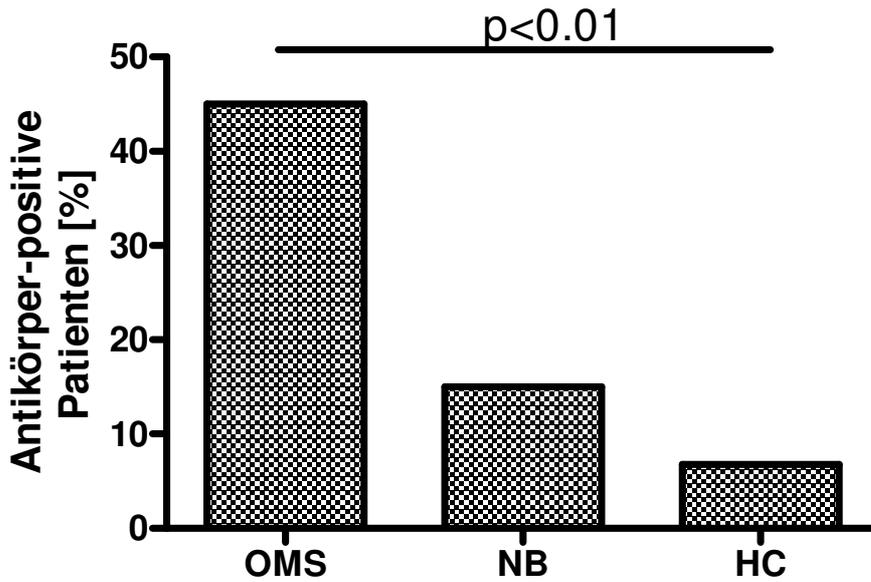


Abb.1: Häufigkeit der Bindung von Autoantikörpern an Gewebsschnitten im Immunfluoreszenztest. Patienten mit OMS haben häufiger Autoantikörper im Serum als Neuroblastompatienten ohne OMS oder gesunde Kontrollen.

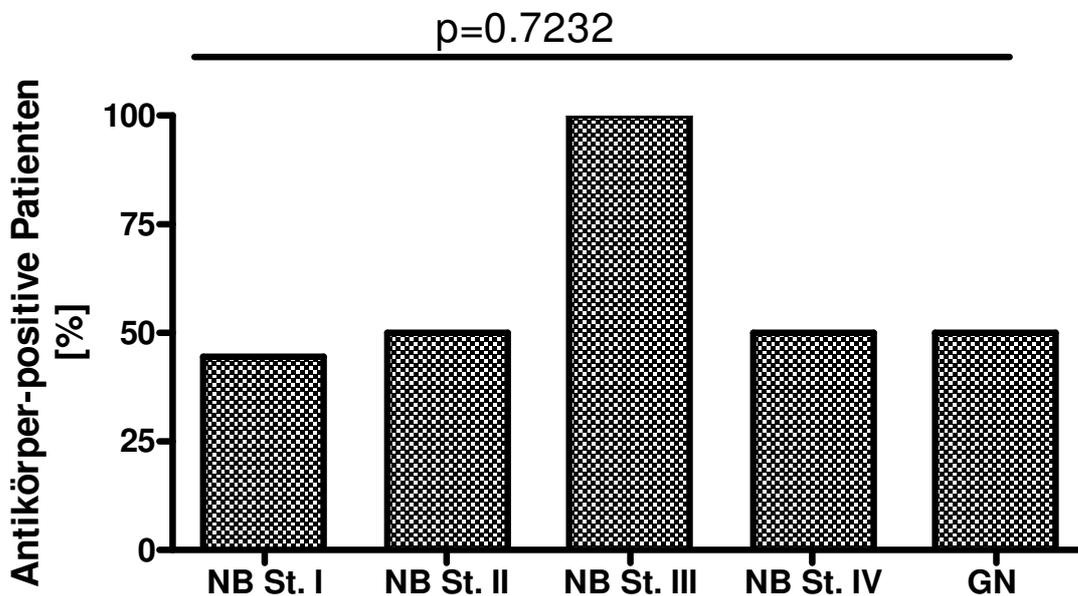


Abb. 2: Nachweis von Autoantikörpern im Immunfluoreszenztest. Bei Patienten mit OMS und Neuroblastomerkrankung unterschiedlicher Stadien sowie Ganglioneurom gibt es keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Häufigkeit von Autoantikörpern.

3.2. Autoantikörper gegen Bestandteile des Nervensystems

3.2.1. Immunhistochemisches Screening

Bei 10/31 (47.6%) der OMS-Patienten, aber nur bei 1/20 (5.2%) der NB-Patienten und 0/15 (0%) der gesunden Kontrollen konnten im Immunfluoreszenztest Autoantikörper gegen Bestandteile des Nervensystems nachgewiesen werden ($p < 0.01$, Abb.3). Hierbei konnten verschiedene Autoantikörperreaktivitäten unterschieden werden:

Antineuronal-nukleäre Autoantikörper konnten bei 3/31 (9.6%) OMS-Patienten nachgewiesen werden (Abb.4). Dieser Antikörper konnte mit Hilfe der typischen 38-40 kD Reaktivität im Westernblot und einem Immunblot mit rekombinatem Autoantigen als anti-Hu Antikörper identifiziert werden. Alle anti-Hu positiven Patienten hatten ein Neuroblastom-assoziiertes OMS.

Vier von 31 OMS-Patienten (12.9%) hatten Autoantikörper gegen das Zytoplasma von Purkinjezellen des Kleinhirns. Diese Patienten zeigten im cerebellären Westernblot und im Immunblot keine Reaktivität gegen das Yo-Antigen, welches immunhistochemisch eine ähnliche Bindung erzeugt.

Bei einem von 31 OMS-Patienten (3.2%) fanden sich Autoantikörper gegen Granulariszellen.

Zwei von 31 OMS-Patienten (6.4%) wiesen Autoantikörper gegen weiße Substanz / Myelin auf (Abb.5).

Es fand sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Häufigkeit von Autoantikörpern gegen Nervengewebe bei OMS-NB+ und OMS-NB- (42.8% vs. 11.1%, n. sign.) Innerhalb der Gruppe der OMS-Patienten mit Neuroblastom (OMS-NB+) konnte kein signifikanter Unterschied in den einzelnen Tumorstadien hinsichtlich des Vorkommens von Autoantikörpern gegen Nervengewebe nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

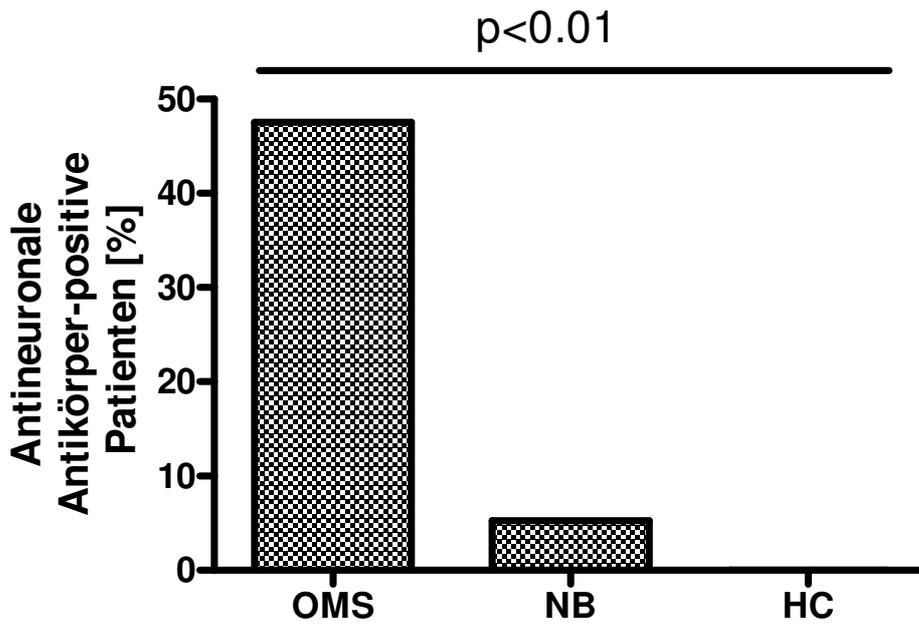


Abb.3: Nachweis der Bindung antineuronaler Autoantikörper im Immunfluoreszenztest. Bei OMS-Patienten lassen sich häufiger antineuronale Autoantikörper nachweisen als bei Neuroblastompatienten ohne OMS und Gesundkontrollen.

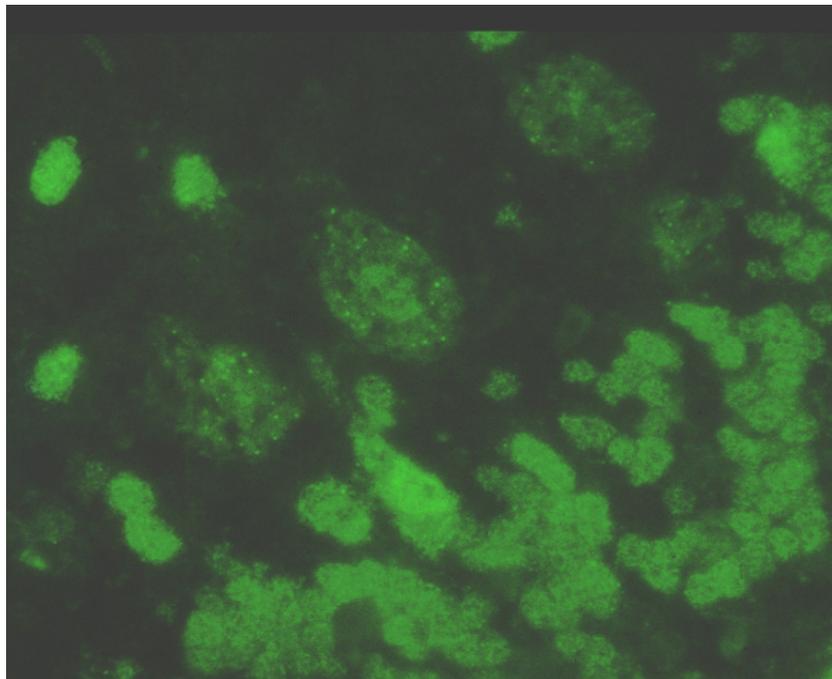


Abb.4: Bindung von anti-Hu Autoantikörpern im Immunfluoreszenztest auf Kleinhirnschnitten. Serumverdünnung 1/1000, Vergrößerung 1/250

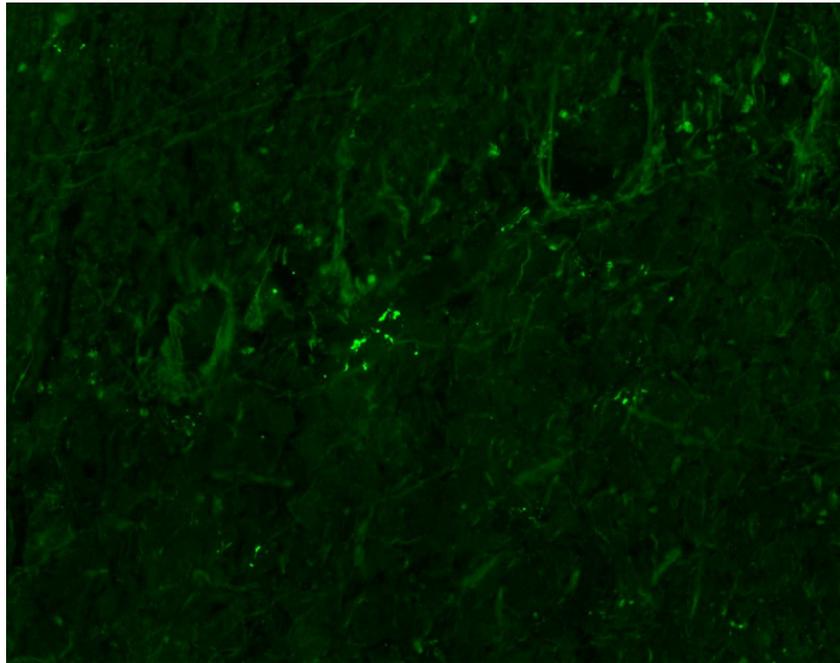


Abb.5: Bindung von Autoantikörper gegen Myelinstrukturen im Kleinhirn im Immunfluoreszenztest. Serumverdünnung 1/1000, Vergrößerung 1/250.

3.2.2. Westernblot Analyse neuronaler Autoantigene

Untersucht wurden hierbei Reaktivitäten gegen die lösliche Proteinfraction von Neuroblastomzellen (SKN-SH-Zelllinie) und humanem Cerebellum. Es wurden nur Reaktivitäten berücksichtigt, die keine korrespondierenden Banden im Westernblot auf HEK 293-Zellen aufwiesen.

Gegen SKN-SH-Zellantigene gerichtete Autoantikörper, die ausschließlich an Antigene von SKN-SH-Zellen banden, konnten im Westernblot auf SKN-SH-Zellen bei 14/30 (46.7%) der OMS-Patienten (eine Probe stand für diese Untersuchung nicht mehr zur Verfügung), bei 5/20 (25%) der Neuroblastompatienten und bei 4/15 (26.7%) der Gesundkontrollen (n.sign.), nachgewiesen werden (Abb.6).

Im Vergleich der OMS-NB+ und OMS-NB- Patienten wiesen 62.9% der OMS-NB+ Patienten und 33.3% der OMS-NB- Patienten eine Bindung von Autoantikörpern auf (n.sign.).

Im Westernblot mit humanem Kleinhirn als Antigen fand sich bei 16/31 (51.6%) der OMS-Patienten, bei 7/20 (35.0%) der Neuroblastompatienten und bei 2/15 (13.3%)

der Gesundkontrollen ein positiver Nachweis von Autoantikörpern ($p < 0.05$). Im Westernblot auf HEK 293-Zellen war keine dieser Banden nachweisbar (Abb.7). 57.1% der OMS-NB+ Patienten und 40.0% der OMS-NB- Patienten hatten einen positiven Autoantikörpernachweis (n.sign.).

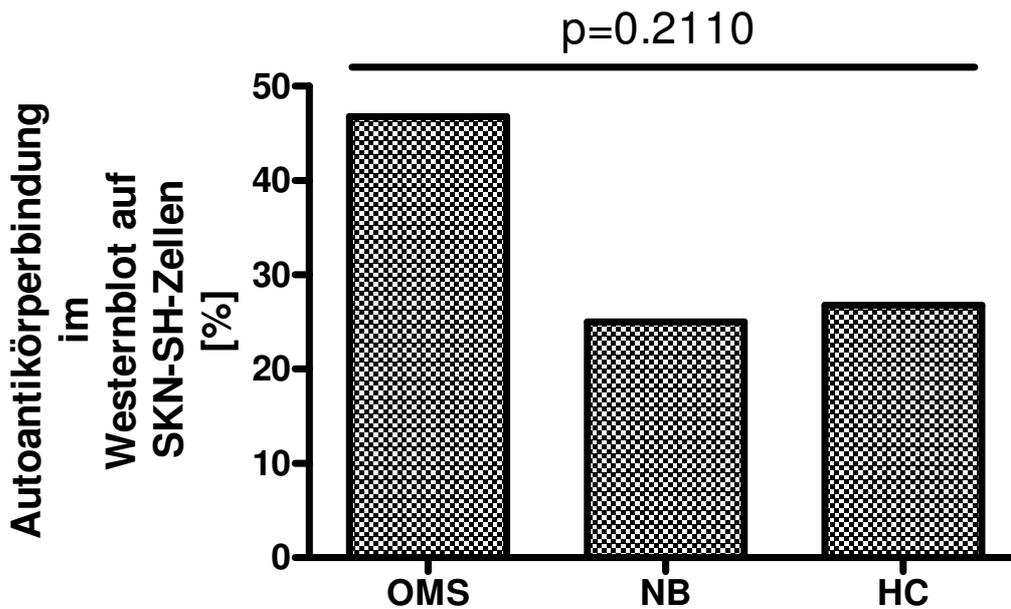


Abb.6: Nachweis der Bindung von Autoantikörpern im Westernblot auf SKN-SH-Zellen. Es wurden die Seren von OMS-Patienten mit den Seren von Neuroblastompatienten und den Seren von Gesundkontrollen auf das Vorkommen von Autoantikörpern hin verglichen.

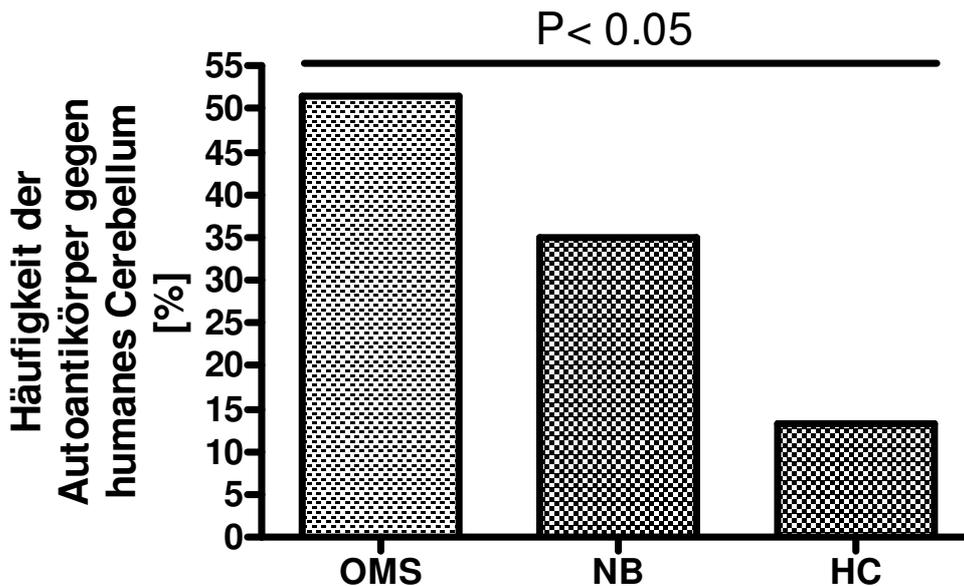


Abb.7: Nachweis der Bindung von Autoantikörpern im Westernblot mit humanem Kleinhirn als Antigen. In den Seren von OMS-Patienten fanden sich häufiger Autoantikörper als in den Seren von Neuroblastompatienten und von Gesundkontrollen.

Bei 9/30 (30%) der OMS-Patienten war im Westernblot auf SKN-SH-Zellen eine 55 kD Bande nachweisbar, die weder bei den Neuroblastompatienten noch bei den Gesundkontrollen auftrat (Abb.8)($p < 0.01$). Vier der 9 (44.4%) der 55kD-positiven OMS-Patienten zeigten diese Reaktivität auch im Westernblot mit humanem Cerebellum als Autoantigen.

Zwischen OMS-NB+ und OMS-NB- Patienten fand sich kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit der 55kD Reaktivität ($p=0.1072$). Die 55kD-positiven und -negativen OMS-Patienten wurden hinsichtlich epidemiologischer, klinischer und immunologischer Daten miteinander verglichen. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich des mittleren Erkrankungsalters, des Geschlechts der Patienten, der Häufigkeit eines Neuroblastoms sowie des Schweregrades des OMS zu Beginn und im Verlauf der Erkrankung (Tab.4). Zudem waren keine Unterschiede im Antikörperprofil sonstiger Autoantikörper zu erkennen (Tab.5).

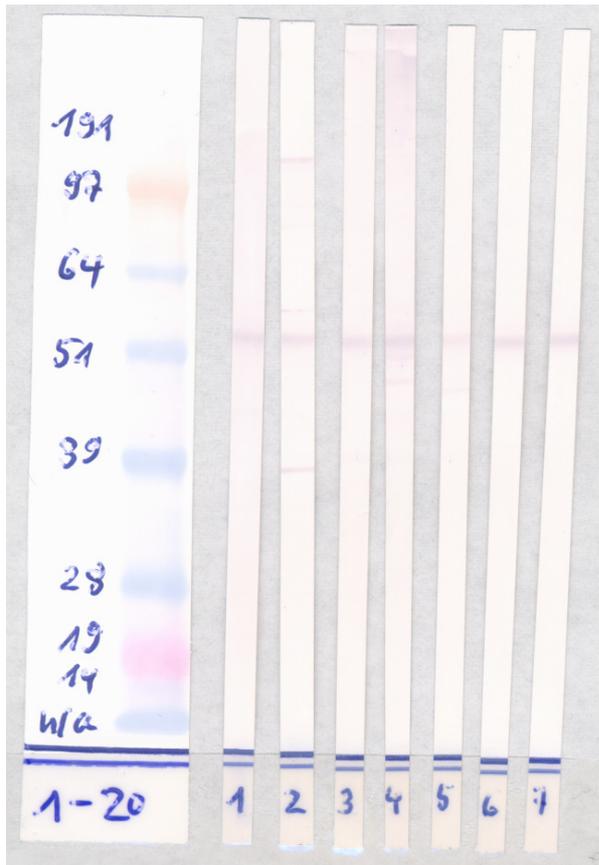


Abb.8: Westernblot mit humanem Cerebellum als Antigen. Darstellung einer 55kD Reaktivität bei 1 Patienten mit OMS (Serumverdünnung 1/100).

Tab.4: Vergleich der in der immunhistochemischen und durchflusszytometrischen Analyse nachgewiesenen Autoantikörper von OMS-Patienten mit 55kD- Bande und OMS-Patienten ohne 55kD-Bande.

	OMS-Patienten (n=9)	OMS-Patienten (n=21)
	55kD positiv	55kD negativ
Intrazellulär bindende Autoantikörper	1 Granularis-Ak 2 Purkinjezellzytoplasma-Ak 2 anti-Hu Ak	4 ANA 2 Fasern-/weiße Substanz-Ak 2 Purkinjezellzytoplasma-Ak 1 anti-Hu Ak
Oberflächen-bindende Autoantikörper	HEK 2/7 SKN 2/7 Humanes Cerebellum 2/7 Präinkubation 7/7	HEK 2/6 SKN 0/6 Humanes Cerebellum 1/6 Präinkubation 3/6

Tab.5: Klinische Unterschiede der 55kD-Bande positiven und 55kD-Bande negativen OMS-Patienten hinsichtlich Geschlechtsverteilung, Alter, Vorkommen eines Neuroblastoms als zugrundeliegender Tumor und dem Schweregrad der Erkrankung. *Score zur Krankheitsaktivität von OMS-Patienten, Werte von 0 (gesund) – 3 (schwerst betroffen), gemessen als Mittelwert der Items Opsoklonus, Myoklonus/Ataxie, Lernbehinderung, Sprache, Verhaltensauffälligkeiten.

Kriterium	55kD positiv	55kD negativ	P
m/w	2m / 7w	9m / 12 w	n.s.
Alter	29.6 ± 4.2 Mon	28.8 ± 3.3 Mon	n.s.
Neuroblastom	8 NB+ / 1NB-	12 NB+ / 9 NB-	n.s.
OMS-Score* initial	1.85± 0.73	2.03± 0.58	n.s.
OMS-Score* nach 1 Jahr	1.37± 0.48	1.43± 0.68	n.s.

3.3. Autoantikörper gegen neuronale Oberflächenantigene

3.3.1 Bindung von Autoantikörpern an die Oberfläche der Neuroblastomzelllinie SKN-SH

Autoantikörper gegen Oberflächenepitope wurden mit Hilfe der Durchflußzytometrie gemessen (Abb. 9). Bei 4/15 (36.3%) der OMS-Patienten, bei 1/10 (11.1%) der Neuroblastompatienten und bei 0/10 (0%) der Gesundkontrollen ließ sich eine Bindung von Autoantikörpern an SKN-SH-Zellen nachweisen (n.sign. Abb.10)

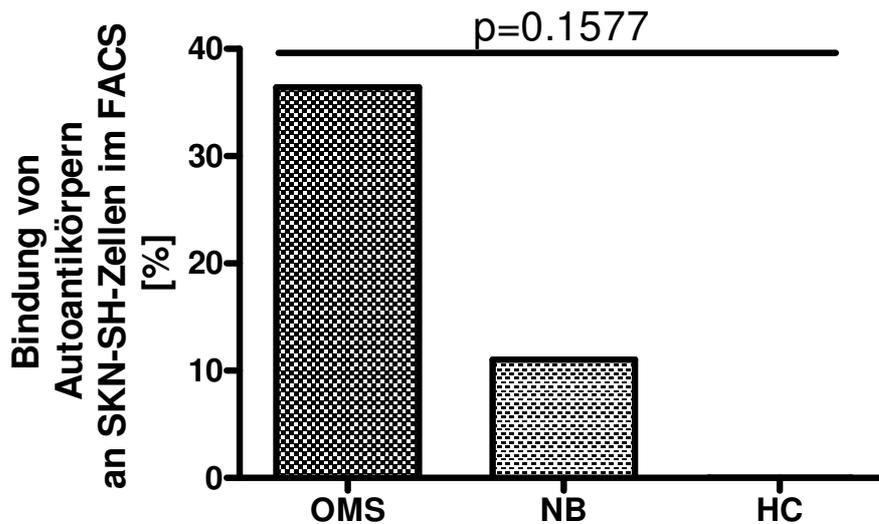


Abb. 10: Es wurde die Bindung Autoantikörpern in Seren von OMS-Patienten, Neuroblastompatienten und Gesundkontrollen an Oberflächenantigene von SKN-SH-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

3.3.2. Bindung von Autoantikörpern an die Oberfläche von primär-kultivierten cerebellären Granularisneuronen

Initial ließen sich bei 4/15 (36.3%) der OMS-Patienten, bei 0/10 (0%) der Neuroblastompatienten und bei 0/10 (0%) der Gesundkontrollen in der Durchflusszytometrie Bindungen von Autoantikörpern an die Zelloberfläche cerebellärer Granularisneurone (CGN) nachweisen ($p < 0.05$, Abb.11a und Abb.11b). Da einige der OMS-Patienten und der Kontrollen auch eine Bindung an die Fibroblastenzelllinie HEK 293 zeigten (nicht gezeigt), wurden die Seren für 24h mit HEK 293 Zellen vorinkubiert, um Autoantikörper gegen ubiquitäre Autoantigene zu eliminieren. Anschließend wurden diese Überstände erneut hinsichtlich einer Oberflächenbindung gegen CGN untersucht. Dabei zeigte sich eine deutliche Reduktion der unspezifischen (Hintergrund-)Fluoreszenz. Mit dieser Methode waren jetzt 11/15 (73.3%) der OMS-Patienten, und kein Patient der Neuroblastom- oder Kontrollgruppe positiv ($p < 0.0001$, Abb.12)

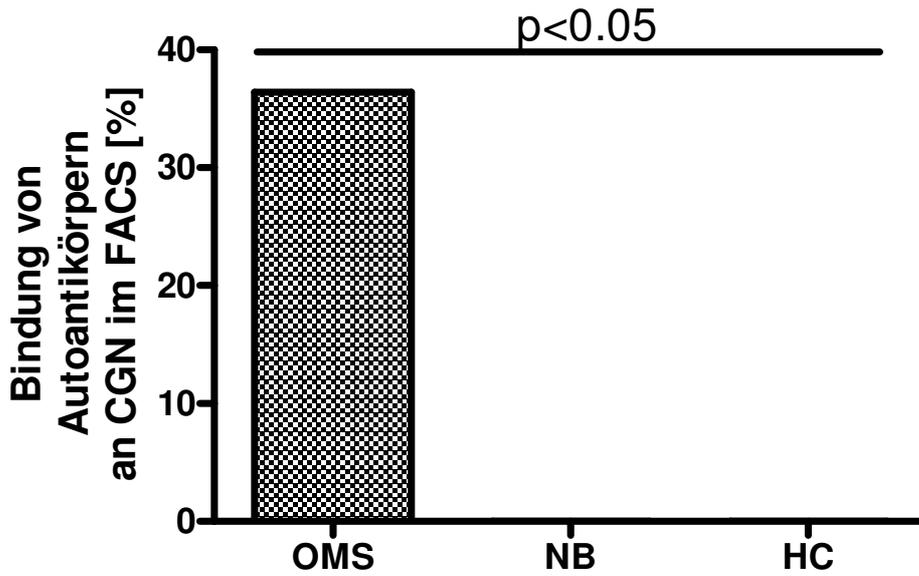


Abb.11a: Nachweis der Bindung von Autoantikörpern in Seren von OMS-Patienten, Neuroblastompatienten und Gesundkontrollen an CGN mittels Durchflusszytometrie.

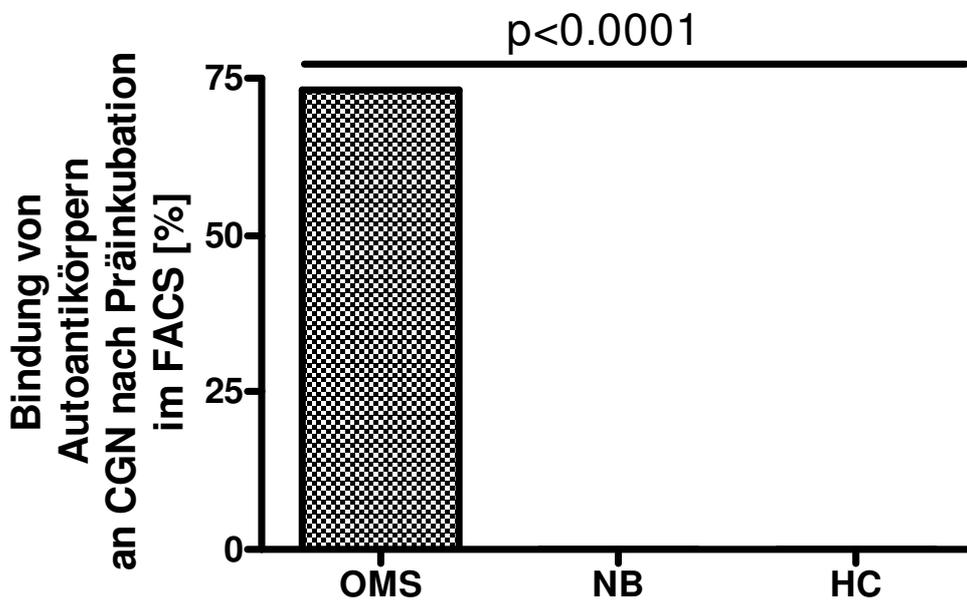


Abb.12a: Bindung von Autoantikörpern aus Seren von OMS-Patienten, Neuroblastompatienten und gesunden Kontrollen an die Oberfläche von CGN mittels Durchflusszytometrie nach 24 h Präinkubation mit HEK 293-Zellen.

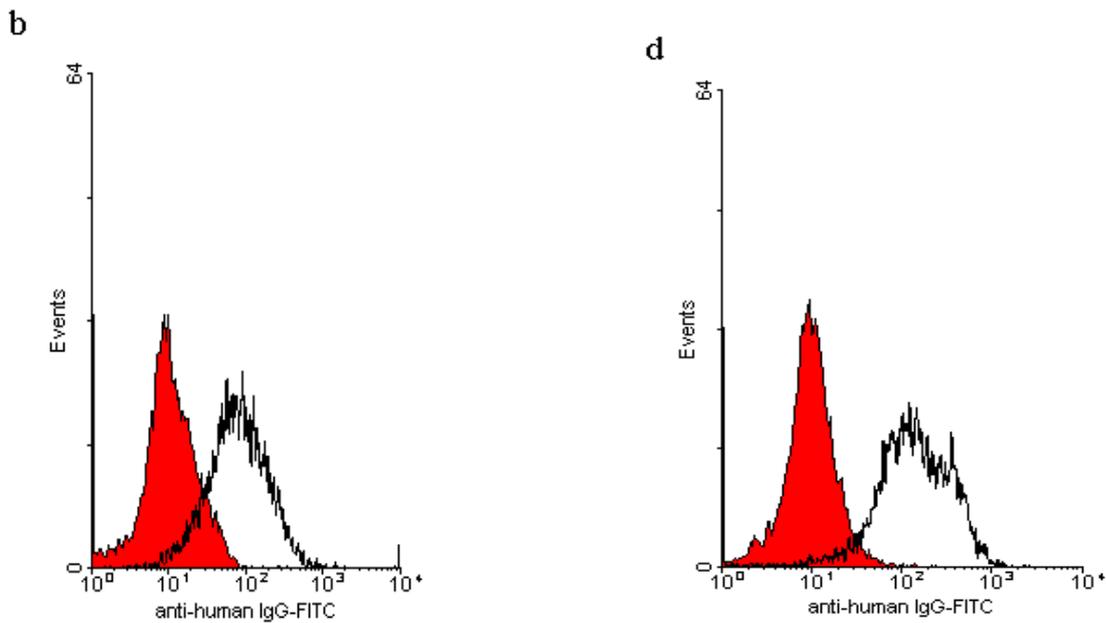


Abb. 11b und 12b: Oberflächenbindung von Autoantikörpern aus den Seren von OMS-Patienten (weißer Graph) und gesunden Kontrolle (roter Graph) an CGN vor und nach 24 h Präinkubation. Die Bindung an CGN ist auch nach der Präinkubation auf HEK 293-Zellen nachweisbar, während die unspezifischen Bindungsreaktivitäten gegen ubiquitäre Antigene verschwunden sind.

3.4. Aktivitätsänderung des MAPKinase Enzyms ERK-1/2 in CGN nach Inkubation mit OMS IgG

Primärkultivierte CGN wurden mit IgG von OMS Kontrollen inkubiert. Nach 5, 10 und 30 min wurde die Aktivität von ERK-1/2 anhand der Phosphorylierung des Enzyms durchflusszytometrisch bestimmt. Nach 5 min Inkubation mit OMS-IgG zeigte sich eine leichte, nicht signifikante Zunahme der ERK-1/2 Phosphorylierung im Vergleich zu den Kontrollgruppen (OMS $252.4 \pm 157.7\%$; NB $154.6 \pm 85.7\%$; HC $147.7 \pm 115.3\%$). Nach 10 min IgG-Inkubation zeigte sich ein deutlicher Anstieg der ERK-1/2-Phosphorylierung durch OMS-IgG, nicht aber durch NB- oder HC-IgG (OMS $349.8 \pm 228.1\%$; NB $133.0 \pm 57.5\%$; HC $161.6 \pm 103.2\%$, $p < 0.01$, Abb. 13, 14). Nach 30 min war ein deutlicher Abfall der ERK-1/2-Phosphorylierung mit Angleichung an die nicht signifikant veränderten Werte der NB- und HC-Patienten nachweisbar (OMS $206.1 \pm 111.1\%$; NB $126.6 \pm 73.1\%$; HC $128.4 \pm 73.3\%$, n.sign., Abb. 14).

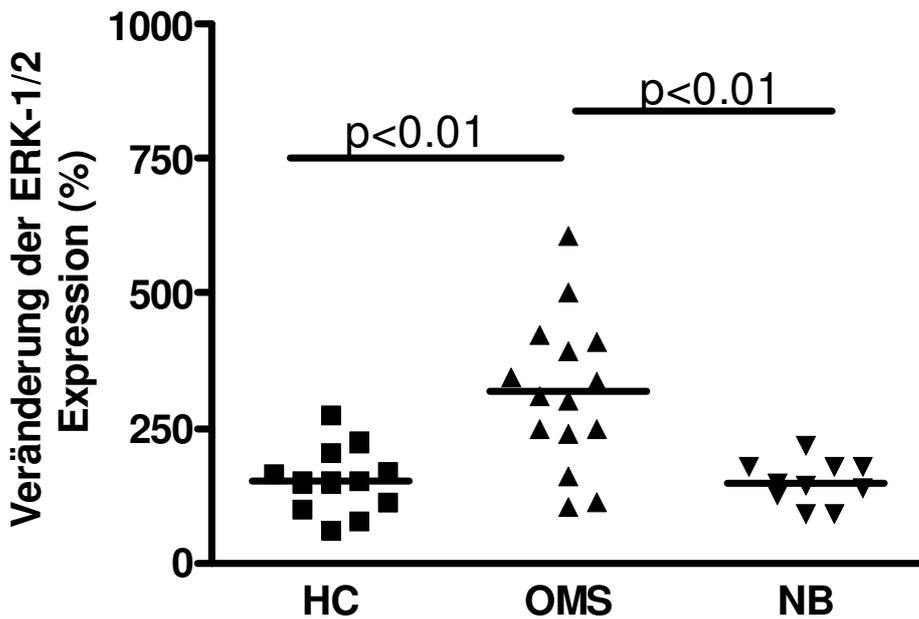


Abb.13: Durchflusszytometrische Messung der Phosphorylierung von ERK1/2 in Kleinhirnneuronen der Maus nach Inkubation mit IgG-Fractionen von OMS-Patienten (OMS), Neuroblastompatienten (NB) und Gesundkontrollen (HC).

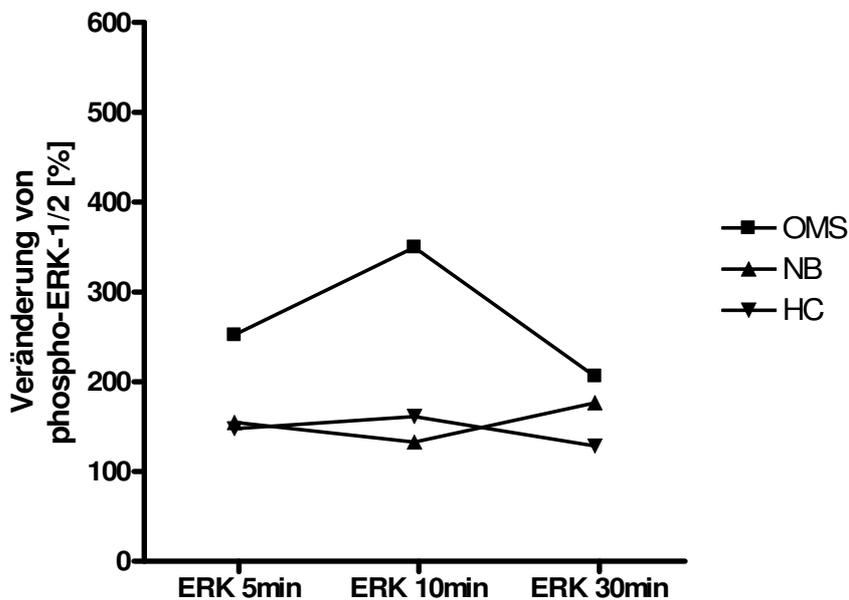


Abb.14: Durchflusszytometrische Messung der Aktivitätsänderung des Schlüsselenzyms phospho-ERK-1/2 in Kleinhirnneuronen der Maus durch Bindung von Autoantikörpern nach 5-, 10- und 30-minütiger Inkubation mit IgG von OMS-Seren, Neuroblastom- und Gesundkontrollen.

4. Diskussion

4.1. Autoimmunität beim Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom

Das OMS ist eine seltene, schwere neurologische Erkrankung, welches Augenbewegungsstörungen, Myoklonien, eine Ataxie und neuropsychologische Entwicklungsstörungen umfasst. Es manifestiert sich sowohl bei Patienten im Erwachsenen- als auch im Kindesalter. Das OMS kann u.a. als parainfektöse Form oder als Folge von Intoxikationen und Impfungen auftreten. Es wird darüber hinaus zwischen einer idiopathischen und paraneoplastischen Form differenziert. Verschiedene neurophysiologische, pathologische und kernspintomographische Daten weisen auf eine zerebelläre Ursache des Syndroms hin: Es imponiert eine ausgeprägte Ataxie, wobei der Rumpf stärker als die Extremitäten betroffen ist. Pathologische Untersuchungen von OMS-Patienten liegen nur als einzelne Fallbeschreibungen vor. Dabei wurde der Untergang von Purkinjezellen und Körnerzellen des Kleinhirns bioptisch nachgewiesen (Tuchman et al. 1989). In Langzeitstudien mit kranialer Bildgebung zeigte sich im MRT eine zerebelläre Atrophie ohne supratentorielle Beteiligung (Hayward et al. 2001). Im funktionellen MRT stellte sich bei zwei OMS-Patienten eine bilaterale Aktivierung des Nucleus fastigii dar (Helmchen et al. 2003). Im PET wurde bei zwei OMS-Patienten eine verminderte Belegung im Sinne einer Dysfunktion des Kleinhirnwurms nachgewiesen (Oguro et al. 1997; van Toorn et al. 2005). Neurophysiologische Untersuchungen legen eine entscheidende Rolle des Nucleus fastigii bei der Entstehung des Opsoklonus nahe (Ramat et al. 2007).

Verschiedene klinisch und experimentelle Daten legen eine Autoimmunpathogenese des OMS nahe: Das Syndrom bessert sich rasch auf die Gabe von Immunsuppressiva, außerdem werden häufig Verschlechterungen im Rahmen von Infektionen berichtet (Blaes et al. 2007). Bei OMS-Patienten lässt sich in der Regel ein entzündlich veränderter Liquor mit lymphozytärer Pleozytose, erhöhtem IgG und teilweise auch oligoklonalen Banden nachweisen (Bellur, 1975; Kostulas et al. 1987). Darüber hinaus konnte ein prozentual erhöhter Anteil von B-Zellen im Liquor von OMS-Patienten nachgewiesen werden (Pranzatelli, 2004). Das paraneoplastische OMS ist fast ausschließlich mit einem Neuroblastom assoziiert. Bei Patienten mit paraneoplastischem OMS werden häufig ausgedehnte B-Zellinfiltrate im

Neuroblastom nachgewiesen (Gambini et al. 2003). Hier sind sogar regelrechte Keimfollikel, ähnlich den Strukturen eines Lymphknotens, zu beobachten (Gambini et al. 2003). Kinder, die an einem Neuroblastom erkrankt sind und ein OMS entwickeln, haben eine höhere Langzeitüberlebensrate als Kinder, die an einem Neuroblastom erkranken und kein OMS entwickeln (Altman et al. 1976). Es war zunächst unklar, worauf diese positive Korrelation des OMS mit der höheren Überlebenszeit beruht. Eine mögliche Erklärung wird in einer zumindest teilweise effektiven antitumoralen Immunantwort gegen das Neuroblastom gesehen. Bei paraneoplastischen neurologischen Syndromen des Erwachsenen liegt der Erkrankung vermutlich eine autoimmunologische Kreuzreaktion zugrunde: Es gibt Tumore, die Antigene exprimieren, die im gesunden Organismus lediglich von Neuronen exprimiert werden. Diese Antigene werden als onkoneurale Antigene bezeichnet (Darnell, 1996). Reagiert der erkrankte Organismus mit einer effektiven Immunantwort auf den Tumor bzw. die von ihm dargebotenen Antigene, wird das Tumorstadium supprimiert (Rosenblum, 1993). Die Immunantwort richtet sich jedoch auch gegen die Neurone, die das identische onkoneurale Antigen exprimieren, was einen entsprechenden Entzündungsprozess im Nervensystem der betroffenen Patienten auslöst. Adulte Patienten mit paraneoplastischen Syndromen haben häufig hohe Titer von Autoantikörpern gegen onkoneurale Antigene in Serum und Liquor (Graus et al. 1986). Diese bei adulten Patienten wahrscheinliche Pathogenese gilt auch als eine Hypothese zur Entstehung des paraneoplastischen OMS bei Kindern.

4.2. Antikörper gegen intrazelluläre Autoantigene

In dieser Studie konnten Autoantikörper gegen intrazelluläre Autoantigene bei OMS Patienten nachgewiesen werden. Dabei fanden sich unter anderem anti-Hu Autoantikörper bei mehreren Patienten. Jeder dieser Patienten war an einem Neuroblastom erkrankt. Anti-Hu Autoantikörper sind gegen eine Gruppe von Autoantigenen (HuC, HuD, Hel-N1), mit einem spezifischen Gewicht von 35-40 kD gerichtet. Diese Autoantikörper sind bei Erwachsenen hochspezifisch für das Vorliegen eines PNS. Anti-Hu Autoantikörper weisen bei erwachsenen Patienten eher als diagnostischer Marker auf einen bestimmten Tumor hin, als dass sie spezifisch für ein bestimmtes klinisches paraneoplastisches Syndrom wären (Hersh et al. 1994; Dalmau et al. 1999). Bei dem zugrundeliegenden Tumor handelt es sich

in der Regel um ein kleinzelliges Bronchialkarzinom (Dalmau et al. 1990). Die häufigsten anti-Hu Antikörper-assoziierten neurologischen Syndrome sind limbische Enzephalitis, eine sensorische oder autonome Neuropathie seltener Myelopathien oder Motoneuronerkrankungen (Dalmau et al. 1992; Szabo et al. 1991). Hu-Proteine sind ausnahmslos RNA-bindende Proteine, HuD bindet mRNA-Fragmente mit häufigem Vorkommen von AU-Basenpaaren (Wang et al. 2001). Fisher et al. (1994) gelang es, in Serum und Liquor eines an einem Neuroblastom erkrankten Kindes, das ein OMS hatte, anti-Hu Autoantikörper nachzuweisen. Weitere Autoantikörperreaktivitäten gegen Nervengewebe waren in meiner Studie gegen Granularisneurone, Purkinjezellzytoplasma, sowie Fasern und weiße Substanz gerichtet. Verschiedene Autoantikörperspezifitäten wurden bereits früher bei OMS beschrieben. Noetzel et al. (1987) fanden Autoantikörper gegen das 210 kD Neurofilamentprotein. Weitere Untersuchungen dieses Autoantikörpers zeigten jedoch, dass er für die Pathogenese des OMS offensichtlich keine Rolle spielt, und auch bei einer Vielzahl anderer neurologischer Erkrankungen und sogar bei gesunden Kontrollen nachweisbar ist (Stefansson et al. 1985; Braxton et al. 1989; Salih et al. 1998). Conolly et al. (1987) konnten in den Seren von Kindern mit OMS, IgG- und IgM- Autoantikörper gegen Purkinjezellzytoplasma, wie auch gegen Bestandteile der weißen Substanz nachweisen. Auch einige meiner OMS Patienten wiesen immunhistochemisch derartige Bindungen auf, im Gegensatz zu der vorgenannten Arbeit waren diese Autoantikörper jedoch nur bei einem kleinen Teil der Patienten nachweisbar.

Die bisher identifizierten Autoantigene, die dem paraneoplastischen OMS bei Erwachsenen zugrunde liegen können, sind die Proteine NOVA-1 und NOVA-2 (Buckanovich et al. 1996). Weder in früheren Studien noch in dieser Untersuchung ließen sich bei kindlichen OMS-Patienten anti-Ri Autoantikörper gegen die NOVA-Proteine nachweisen (Antunes et al. 2000; Pranzatelli et al. 2002; Bataller et al. 2003). Bataller et al. (2003) konnte mittels Screening einer neuronalen cDNA Bank eine ganze Reihe von Autoantigenen bei OMS-Patienten identifizieren. Allerdings war keines dieser Autoantigene bei mehreren Patienten nachweisbar, so dass weder in dieser, noch in anderen Studien bisher die Identifizierung eines Antigens gelang, welches von einer größeren Anzahl von OMS Patienten erkannt wird (Bataller et al. 2003; Antunes et al. 2000). Lediglich bei zwei OMS-Patienten, bei denen das OMS nach einem Streptokokkeninfekt auftrat, konnte eine gemeinsame Reaktivität bei 56

kD nachgewiesen werden. Das entsprechende Antigen konnte als humanes Neuroleukin identifiziert werden (Candler et al. 2006). In meiner Studie konnte ich mit Hilfe von Westernblot Analysen eine 55kD Reaktivität gegen neuronales Gewebe bei insgesamt neun Patienten nachweisen. Diese Reaktivität ist allerdings nicht identisch mit Neuroleukin und konnte inzwischen als alpha-Enolase identifiziert werden (Kirsten et al. persönliche Mitteilung). Auffällig hierbei, dass fast alle 55 kD positiven OMS Patienten ein zugrundeliegendes Neuroblastom hatten. Bezüglich der initialen Schwere der Erkrankung oder des Verlaufs zeigte sich kein Unterschied zwischen 55 kD-positiven und –negativen Patienten. Bei Neuroblastompatienten mit OMS ließen sich in einer anderen Studie häufiger antineuronale Antikörper nachweisen als bei Neuroblastompatienten ohne OMS, ein Unterschied hinsichtlich bestimmter Reaktivitäten konnte dort jedoch nicht gezeigt werden (Antunes et al. 2000). Damit ist das hier gefundene 55kD Antigen der erste Hinweis auf ein gemeinsames zugrundeliegendes Autoantigen bei OMS, die fehlende Assoziation mit klinischen Verlaufsparemtern spricht jedoch eher gegen eine pathogenetisch wichtige Rolle dieses Autoantikörpers. Möglicherweise ist dieser Autoantikörper jedoch als Marker für ein zugrundeliegendes Neuroblastom geeignet.

4.3. Autoantikörper gegen Oberflächenautoantigene

Die meisten beschriebenen Autoantikörper in Serum und Liquor von Patienten mit OMS binden an intrazelluläre nukleäre Antigene in neuronalen Zellen und Neuroblastomzellen (Bataller et al. 2000). Die Bindung der Autoantikörper an intrazelluläre Antigene kann die Zellfunktion stören. *In vitro* führen diese Antikörper - ohne lymphozellulär vermittelte Immunantwort- zu einer Zerstörung cerebellärer Körnerzellen und hemmen die Tumorzellproliferation (Greenlee 1993, Schäfer et al. 2000). *In vivo* wird Autoantikörpern, die gegen intrazelluläre Antigene gerichtet sind, jedoch keine pathogene Funktion zugeschrieben. Anders verhält es sich mit Autoantikörpern, die an extrazelluläre Strukturen binden. So ist beispielweise beim Lambert-Eaton myasthenen Syndrom (LEMS) die pathogene Bedeutung von Autoantikörpern, die gegen extrazelluläre Strukturen gerichtet sind, gesichert. Es handelt sich um Autoantikörper, die an die α 1A-Untereinheit des präsynaptischen, spannungsabhängigen P/Q-Typ Calciumkanals binden (Pinto et al. 1998, 2002). Dadurch kommt es zu einer Quervernetzung der Calciumkanalproteine, infolge derer

die Calciumkanalproteine internalisiert werden und der Einstrom von Calciumionen in die betroffene Zelle vermindert wird (Roberts et al. 1985).

Ich konnte mittels Durchflusszytometrie bei OMS Patienten eine Bindung von Autoantikörpern an die Zelloberfläche von CGN nachweisen. Die Anzahl der OMS-Patienten, in deren Serum sich diese Autoantikörper nachweisen ließen, war signifikant höher als in den Kontrollgruppen. Durch Präinkubation der Seren mit HEK 293 Zellen wurden Autoantikörper gegen ubiquitäre Autoantigene und somit die unspezifische Hintergrundfluoreszenz weitgehend eliminiert. Wie bereits erwähnt, sind Autoantikörper, die an extrazelluläre Strukturen binden, eher pathogen wirksam als gegen intrazelluläre Antigene gerichtete Autoantikörper.

Inzwischen wurden bei einer weiteren ZNS-Erkrankung, der nicht-paraneoplastischen limbischen Enzephalitis, oberflächenbindende Autoantikörper beschrieben (Buckley et al. 2001; Vincent et al. 2004; Thieben et al. 2004). Es handelt sich um Autoantikörper, die an die Kv1.1-Untereinheit von spannungsabhängigen Kaliumkanalproteinen binden. Spannungsabhängige Kaliumkanäle werden im ZNS und PNS ubiquitär exprimiert, Kv1.1- und Kv1.2-Untereinheiten sind jedoch in ihrem Vorkommen streng auf die juxtaparanodalen Regionen der Axone im Bereich der Ranvier'schen Schnürringe beschränkt (Wang et al. 1993; Aroyo and Scherer, 2000). Die Untereinheiten Kv1.1 bis Kv1.6 werden in sehr hoher Dichte in den Kleinhirnzellen der Molekularschicht, der Körnerzellschicht und an den Endigungen von Korbzellen (Chung et al. 2001) sowie in bestimmten Regionen des Hippokampus exprimiert (Monaghan et al. 2001). Eine Bindung von Autoantikörpern an Oberflächenantigene von Neuronen wäre auch eine Hypothese zur Entstehung des OMS. Hierfür spricht nicht nur der Nachweis von Autoantikörpern gegen die Oberflächenantigene von CGN. Korfei et al. (2005) konnten zeigen, dass Oberflächen-bindende Antikörper gegen Neuroblastomzellen beim OMS vorkommen und auch funktionelle Effekte auslösen.

4.4. Funktionelle Effekte von Autoantikörpern beim OMS

Wenn auf eine Zelle ein externer Reiz, z.B. die Bindung eines Liganden an einen Rezeptor, einwirkt, wird die Information in die Zelle in der Regel über second-messenger-Kaskaden vermittelt. Im Rahmen dieser Kaskaden wird häufig ein Enzym phosphoryliert, das dadurch aktiviert wird und die Phosphorylierung eines

weiteren Enzyms auslöst, bis die Information in den Zellkern gelangt ist. Die Veränderung der Translation führt dann zu einer veränderten Genexpression und folglich zu einer Änderung der Zellfunktion. Eine der wichtigsten second-messenger-Kaskaden ist der sogenannte MAP- (mitogen-aktivierter-Protein-) Kinaseweg mit den Schlüsselenzymen ERK-1/2, p38 und JNK (Übersicht in Su et al. 1996). Während die Aktivierung von ERK-1/2 im allgemeinen eher zu einer Differenzierung und einem verbesserten Überleben von Zellen führt, kann die Aktivierung von p38 und / oder JNK zur Apoptose von Zellen führen (Übersicht in Su, 1996). Die Rolle von ERK-1/2 in neuronalen Zellen wird derzeit kontrovers diskutiert: In sympathischen Neuronen konnte ein anti-apoptotischer Effekt durch ERK-1/2-Aktivierung nachgewiesen werden, dagegen konnte in Hippokampusneuronen eine mit vermehrter ERK-1/2-Phosphorylierung einhergehende neuronale Degeneration beobachtet werden (Runden et al. 1998, Murray et al. 1998). Die Koaktivierung von ERK-1/2 und p38 wurde bei neuronalen Differenzierungsvorgängen nachgewiesen, die alleinige Aktivierung von p38 führte allerdings zur Apoptose differenzierter neuronaler Zellen (Übersicht in Takeda et al. 2002, Newhouse et al. 2004). Diese p38-Aktivierung kann auch eine Folge eines Entzugs neurotropher Faktoren sein (Kummer et al. 1997).

Da die Reaktionsmuster im MAPKinaseweg bei verschiedensten externen Stimuli auftreten, ist ihre Messung zwar wenig spezifisch, zeichnet sich aber durch eine hohe Sensitivität für Änderungen der Zellfunktion aus (Übersicht in Grewal et al. 1999). Erstmals wurde eine Beeinflussung des MAPKinaseweges durch autoimmune Vorgänge bei Aktivierung von neutrophilen Granulozyten durch Antikörper gegen Neutrophilenzytosoma (ANCA) beschrieben. Die Gabe eines p38-Inhibitors (SB 202190) oder eines ERK-Inhibitors (PD 98059) führte hier zu einer deutlichen Verringerung der ANCA-induzierten Produktion toxischer Sauerstoffradikale (Ketritz et al. 2001). Eine p38-Aktivierung mit konsekutiver Apoptose neuronaler Zellen wurde ebenfalls berichtet. Corsaro et al. (2003) konnten zeigen, dass ein Fragment des Prionproteins zu einer p38-medierten Apoptose von SH-SY5Y Neuroblastomzellen führt. Eine Autoantikörper-induzierte Aktivierung von ERK-1/2 konnte in Endothelzellen durch IgG von Patienten mit M. Behçet nachgewiesen werden (Lee et al. 2003). Die Aktivierung von ERK-1/2 war hier bereits nach nur 5 min Inkubationszeit nachweisbar und nach 60 min bereits wieder rückläufig. Dabei erzeugte die ERK-Aktivierung eine Hochregulation von ICAM-1 auf der Zelloberfläche. Dies deckt sich mit den Ergebnissen meiner Versuche. Auch bei der

Inkubation der zerebellären Granularisneurone mit OMS-IgG trat eine Zunahme des phosphorylierten ERK-1/2 Anteils bereits nach 5 min auf und erreichte ein Maximum nach 10 min und war nach 30 min nicht mehr unterschiedlich zu Kontrollen. Diese Inkubationszeiten von nur wenigen Minuten bis zur Messung der Aktivierung bzw. Phosphorylierung des ERK-1/2 Weges wird auch von anderen Autoren so berichtet (Iwata et al. 2003). Die Aktivierung dieses Weges innerhalb der MAPKinase-Kaskade könnte die beobachteten funktionellen Effekte von OMS-assoziierten Autoantikörper auf neuronale Zellen bzw. Neuroblastomzellen erklären (Korfei et al. 2005). Die schnelle Aktivierung des ERK-1/2 Weges spricht möglicherweise dafür, dass die gefundenen Oberflächenautoantikörper an einen Rezeptor oder ein Kanalprotein binden.

Zu Beginn der Studie war die Messung von Phosphorylierungsänderungen im MAPKinase pathway eher als Screeningmethode zur Erfassung Autoantikörper-induzierter Zellfunktionsstörungen gesehen worden. Um den Effekt der ERK-1/2 Aktivierung auf die zerebellären Primärkulturen jetzt näher zu untersuchen sind verschiedene Zellfunktionstests (Proliferationsmessung, Neuritenwachstum) mit und ohne Zugabe verschiedener MAPKinase Aktivatoren notwendig.

Zusammenfassend ließen sich in den von mir untersuchten Seren von OMS-Patienten signifikant häufiger Antikörper gegen intrazelluläre Autoantigene nachweisen als in den Kontrollgruppen. Dabei konnte bei 9/30 Patienten mittels Westernblot Analyse eine gemeinsame 55kD Reaktivität gegen neuronales Gewebe nachgewiesen werden. Da die Mehrzahl der 55kD positiven Patienten ein zugrundeliegendes Neuroblastom hatte, ist der Antikörper ein möglicher Marker für die paraneoplastische Form des OMS. Das hier gefundene 55kD Antigen kann als erster Hinweis auf ein gemeinsames zugrundeliegendes Autoantigen gewertet werden. In der Durchflusszytometrie konnte ausschließlich bei OMS-Patienten eine Bindungen von Autoantikörpern an die Zelloberfläche von CGN nachgewiesen werden. Diese Bindung hatte eine messbare Aktivierung des MAPKinase pathways bzw. eine Zunahme der ERK-1/2-Phosphorylierung bereits nach 10 min Inkubationszeit zufolge, was die funktionelle Wirksamkeit der gefundenen Auto-Antikörper zeigt.

In Zusammenschau der vorliegenden Daten lässt sich postulieren, dass das paraneoplastische OMS eine Autoimmunerkrankung sein könnte, die durch die Bindung von Autoantikörpern gegen Oberflächenantigene von CGN und den daraus resultierenden Effekt auf die jeweilige Zelle bedingt sein könnte.

5. Literatur

1. Alacorn-Segovia D, Ruiz-Arguelles A, Llorente L. Broken dogma: penetration of autoantibodies into living cells. *Immunol Today* 1996; 17, 163-164.
2. Altmann A, Baehner R. Favorable prognosis for survival in children with coincident opsomyoclonus and neuroblastoma. *Cancer* 1976; 37: 864-852
3. Anderson NE, Rosenblum MK, Posner JB. Paraneoplastic cerebellar degeneration: clinical-immunological correlations. *Ann Neurol* 1988; 24: 559-567
4. Antunes NL, Khakoo Yasmin, Matthay KK et al. Antineuronal antibodies in patients with neuroblastoma and paraneoplastic opsoclonus-myoclonus. *J Pediatr Hematol Oncol* 2000; 22(4): 315-320
5. Arroyo EJ, Scherer SS. On the molecular architecture of myelinated fibers. *Histochem. Cell Biol* 2000; 113: 1-18
6. Au WJ, Keltner JL. Opsoclonus with amitryptiline overdose. *Ann Neurol* 1979; 6: 87
7. Bataller L, Graus F, Saiz A, Vilchez JJ. Clinical outcome in adult onset idiopathic or paraneoplastic opsoclonus-myoclonus. *Brain* 2001; 124: 437-443
8. Bataller L, Rosenfeld MR, Graus F, Vilchez JJ, Cheung NV, Dalmau J. Autoantigen diversity in the opsoclonus-myoclonus syndrome. *Ann Neurol* 2003; 53: 347-353
9. Beck S, Fühlhuber V, Krasenbrink I et al.. IgG subclass distribution of autoantibodies in pediatric opsoclonus-myoclonus syndrome. *J Neuroimmunol* 2007; 185 (1-2): 145-149
10. Bellur SN. Opsoclonus: its clinical value. *Neurology* 1975; 25(6): 502-507
11. Blaes F, Fühlhuber V, Korfei M et al. Surface-binding autoantibodies to cerebellar neurons in opsoclonus syndrome. *Ann Neurol* 2005; 58: 313-317
12. Blain PG, Nightingale S, Stoddart JC. Strychnin poisoning: abnormal eye movements. *J Toxicol Clin Toxicol* 1982; 19: 215-217
13. Braxton DB, Williams M, Kamali D et al. Specificity of human anti-neurofilament autoantibodies. *J Neuroimmunol* 1989; 21 (2-3): 193-203
14. Buckanovich RJ, Yang YY, Darnell RB. The onconeural antigen Nova-1 is a neuron-specific RNA-binding protein, the activity of which is inhibited by paraneoplastic antibodies. *J Neurosci* 1996; 16(3): 1114-1122

15. Buckley C, Oger J, Clover L, Tuzun E, Carpenter K, Jackson M, Vincent A. Potassium channel antibodies in two patients with reversible limbic encephalitis. *Ann Neurol* 2001; 50: 73-78
16. Budde-Steffen C, Anderson NE, Rosenblum MK et al. An antineuronal autoantibody in paraneoplastic opsoclonus. *Ann Neurol* 1998; 23: 528-531
17. Candler PM, Dale RC, Griffin S et al. Post-streptococcal opsoclonus-myoclonus syndrome associated with anti-neuroleukin antibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006; 77(4): 507-12
18. Chung YH, Shin C, Kim MJ, Lee BK, Cha CI. Immunohistochemical study on the distribution of six members of the Kv1 channel subunits in the rat cerebellum. *Brain Res* 2001; 895: 173-177
19. Cohen WJ, Cohen NJ. Lithium carbonate, haloperidol and irreversible brain damage. *JAMA* 1974; 230: 1283-1287
20. Conolly AM, Pestronk A, Metha S, Prazantelli MR, Noetzel MJ. Serum autoantibodies in childhood opsoclonus-myoclonus syndrome: an analysis of antigenic targets in neuronal tissues. *J Pediatr* 1997; 130(6): 878-884
21. Cooper R, Khakoo Y, Matthay KK et al. Opsoclonus-myoclonus-ataxia syndrome in neuroblastoma: histopathologic features – a report from the Children’s Cancer Group. *Medical and Pediatric Oncology* 2001; 36: 623–629
22. Corsaro A, Thellung S, Villa V et al. Prion protein fragment 106-126 induces a p38 MAPKinase-dependent apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells independently from the amyloid fibril formation. *Ann NY Acad Sci* 2003; 1010: 610-622
23. Dalmau J, Furneaux HM, Gralla RJ, Kris MG, Posner JB. Detection of the anti-Hu antibody in the serum of patients with small cell lung cancer – a quantitative western blot analysis. *Ann Neurol* 1990; 27: 544-552
24. Dalmau J, Graus F, Rosenblum MK, Posner JB. Anti-Hu associated paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuronopathy: a clinical study of 71 patients. *Medicine* 1992; 71: 59-72
25. Dalmau J, Posner JB. Paraneoplastic syndromes. [Review]. *Arch Neurol* 1999; 56: 405-408
26. Darnell RB. Onconeurological antigens and the paraneoplastic neurologic disorders: at the intersection of cancer, immunity and the brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 4529-4536

27. Deconinck N, Scaillon M, Segers V et al. Opsoclonus-myoclonus associated with celiac disease. *Pediatr Neurol* 2006; 34: 312-314
28. Delreux V, Kevers L, Sindic CJ, Callewaert A. Opsoclonus secondary to Epstein-Barr virus infection. *Neuro-ophthalmology* 1988; 8: 179- 189
29. Elkardoudi-Pijnenburg Y, Van Vliet AG. Opsoclonus, a rare complication of cocaine misuse. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996; 60: 592
30. Fisher PG, Wechsler DS, Singer HS. Anti-Hu antibody in a neuroblastoma-associated paraneoplastic syndrome. *Pediatr Neurol* 1994; 10: 309-312
31. Gambini C, Conte M, Bernini G et al. Neuroblastic tumors associated with opsoclonus-myoclonus syndrome: histological, immunohistochemical and molecular features of 15 italian cases. *Virchows Arch* 2003; 442: 555-562
32. Graus F, Delattre JY, Antoine JC et al. Recommended diagnostic criteria for paraneoplastic neurological syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004; 75: 1135-1140
33. Graus F, Elkon KB, Cordon-Cardo C, Posner JB. Sensory neuronopathy and small cell lung cancer. Antineuronal antibody that also reacts with the tumor. *Am J Med* 1986; 80: 45-52
34. Greenlee JE, Parks TN, Jaeckle KA. Type IIa (‘anti-Hu’) antineuronal antibodies produce destruction of rat cerebellar granule neurons in vitro. *Neurol* 1993; 43 (10): 2049-54
35. Grewal JS, Mukhin YV, Garnovskaya MN, Raymond JR, Greene EL. Serotonin 5-HT_{2A} receptor induce TGF-beta1 expression in mesangial cells via ERK: proliferative and fibrotic signals. *Am J Physiol* 1999; 276(6 Pt 2): F922-930
36. Hayward K, Jeremy RJ, Jenkins S et al. Longterm neurobehavioral outcomes in children with neuroblastoma and opsoclonus-myoclonus-ataxia syndrome: relationship to MRI findings and antineuronal antibodies. *J Pediatr* 2001; 139(4): 552-559
37. Heinemann S, Bevan S, Kullberg R, Lindstrom J, Rice J. Modulation of acetylcholin receptor by antibody against the receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1977; 74: 3090-3094
38. Hero B, Berthold F. Neuroblastom. *Monatsschr Kinderheilkd* 2002; 150: 775-788

39. Hersh B, Dalmau J, Dangond F, Gultekin S, Geller E, Wen PY. Paraneoplastic opsoclonus-myoclonus associated with anti-Hu antibody. *Neurology* 1994; 44: 1754-1755
40. Huang CS, Shi SH, Ule J et al. Common molecular pathways mediate long-term potentiation of synaptic excitation and slow synaptic inhibition. *Cell* 2005; 123: 105-118
41. Iwata Y, Wada T, Furuichi K, Sakai N, Matsushima K, Yokoyama H, Kobayashi K. p38 Mitogen-activated protein kinase contributes to autoimmune renal injury in MRL-Fas lpr mice. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14:57-67
42. Kettritz R, Schreiber A, Luft FC, Haller H. Role of mitogen-activated protein kinases in activation of human neutrophil cytoplasmic antibodies. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12 (1):37-46
43. Kinsbourne M. Myoclonic encephalopathy of infants. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1962; 25: 271-279
44. Klein A, Schmitt B, Boltshauser E. Long-term outcome of ten children with opsoclonus-myoclonus syndrome. *Eur J Pediatr* 2007; 166 (4):359-363
45. Kostulas VK, Link H, Lefvert AK. Oligoclonal IgG bands in cerebrospinal fluid. Principles for demonstration and interpretation based on findings in 1114 neurological patients. *Arch Neurol* 1987; 44(10): 1041-1044
46. Kummer JL, Rao PK, Heidenreich KA. Apoptosis induced by withdrawal of trophic factors is mediated by p38 Mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1997; 272: 20490-20494
47. Lapenna F, Lochi L, de Mar M et al. Postvaccinic opsoclonus-myoclonus syndrome: a case report. *Parkinsonism Relat Disord* 2000; 6: 241-242
48. Lee KH, Cho HJ, Kim HS et al. Activation of extracellular signal regulated kinase 1/2 in human dermal microvascular endothelial cells stimulated by anti-endothelial cell antibodies in sera of patients with Behçet's disease. *J Dermatol Sci* 2002; 30(1): 63-72
49. Maccario M, Seelinger D, Snyder R. Thallotoxicosis with coma and abnormal eye-movements. *Electroencephalog Clin Neurophysiol* 1975; 38: 98-99
50. Marusich MF, Furneaux HM, Henion PD, Weston JA. Hu neuronal proteins are expressed in proliferating neurogenic cells. *J Neurobiol* 1994; 25: 48-53

51. Medrano V, Royo-Villanova C, Flores-Ruiz JJ et al. Parainfectious opsoclonus-myoclonus syndrome secondary to varicella-zoster virus infection. *Rev Neurol* 2005 ; 41 : 507-508
52. Mitchell WG, Davalos-Gonzalez Y, Brumm VL et al. Opsoclonus-ataxia caused by childhood neuroblastoma: developmental and neurologic sequelae. *Pediatrics* 2002; 109: 86-98
53. Mitchell WG, Brumm VL, Azen CG et al. Longitudinal neurodevelopmental evaluation of children with opsoclonus-ataxia. *Pediatrics* 2005; 116: 901-907
54. Monaghan MM, Trimmer JS, Rhodes KJ. Experimental localization of Kv1 family voltage-gated K⁺ channels alpha and beta subunits in rat hippocampal formation. *J Neurosci* 2001; 21: 5973-5983
55. Murray B, Alessandrini A, Cole AJ, Yee AG, Furshpan EJ. Inhibition of the p44/42 MAPKinase pathway protects hippocampal neurons in a cell-culture model of seizure activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(20):11975-11980
56. Newhouse K, Hsuan SL, Chang SH, Cai B, Wang Y, Xia Z. Rotenone-induced apoptosis is mediated by p38 and JNK MAPKinases in human dopaminergic SH-SY5Y cells. *Toxicol Sci* 2004; 79(1): 137-146
57. Noetzel MJ, Cawley LP, James VL, Minare BJ, Agrawal HC. Anti-neurofilament protein antibodies in opsoclonus-myoclonus. *J Neuroimmunol.* 1987; 15(2):137-45.
58. Oguro K, Kobayashi J, Aiba H, Hojo H. Opsoclonus-myoclonus syndrome with abnormal single photon emission computed tomography imaging. *Pediatr Neurol* 1997; 16(4): 334-336
59. Pinto A, Gillard S, Moss F et al. Human autoantibodies specific for the alpha 1A calcium channel subunit reduce both P-type and Q-type calcium currents in cerebellar neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 8328-8333
60. Pinto A, Iwasa K, Newland C, Newsom-Davis J, Lang B. The action of Lambert-Eaton myasthenic syndrome immunoglobulin G on cloned human voltage-gated calcium channels. *Muscle Nerve* 2002; 25: 715-724
61. Prazantelli MR. The Immunopharmacology of the opsoclonus-myoclonus syndrome. *Clin Neuropharmacol* 1996; 19 (1), pp, 1-47
62. Prazantelli MR, Tate ED, Wheeler A et al. Screening for Autoantibodies in children with opsoclonus-myoclonus ataxia. *Pediatr Neurol* 2002; 27: 384-387

63. Prazantelli MR, Travelstead AL, Tate ED et al. B- and T-cell markers in opsoclonus-myoclonus syndrome. *Neurology* 2004; 62: 1526-1532
64. Prazantelli MR, Travelstead AL, Tate ED, Allison TJ, Verhulst SJ. CSF B-cell expansion in opsoclonus-myoclonus syndrome: a biomarker of disease activity. *Movement Disorders* 2004; 19 (7): 770-777
65. Prazantelli MR, Hyland K, Tate ED, Arnold LA, Allison TJ, Soori GS. Evidence of cellular immune activation in children with opsoclonus-myoclonus: cerebrospinal fluid neopterin. *J Child Neurol.* 2004; 19 (12): 919-24
66. Reichlin M. Cellular dysfunction induced by penetration of autoantibodies into living cells: cellular damage and dysfunction mediated by antibodies to dsDNA and ribosomal P proteins. *J. Autoimmun.* 1998; 11: 557-561.
67. Roberts A, Perera S, Lang B, Vincent A, Newsom-Davis J. Paraneoplastic myasthenic syndrome IgG inhibits 45Ca^{2+} flux in a human small cell carcinoma line. *Nature* 1985; 317: 737-739
68. Roberts KW, Darnell RB. Neuroimmunology of the paraneoplastic neurological degenerations. *Current Opinion in Immunology* 2004; 16: 616-622
69. Rosenblum MK. Paraneoplasia and autoimmunologic injury of the nervous system: the ant-Hu syndrome. *Brain Pathol* 1993; 3: 199-212
70. Rudnick E, Khakoo Y, Antunes NL et al. Opsoclonus-myoclonus-ataxia syndrome in neuroblastoma: clinical outcome and antineuronal antibodies – a report from the Children’s Cancer Group Study. *Medical and Pediatric Oncology* 2001; 36: 612-622
71. Runden E, Seglen PO, Haug FM, Ottersen OP, Wieloch T, Shamloo M, Laake JH. Regional selective neuronal degeneration after protein phosphatase inhibition in hippocampal slice cultures: evidence for a MAPKinase-dependent mechanism. *J Neurosci* 1998; 18(18): 7296-7305
72. Salih AM, Nixon NB, Dawes PT, Matthey DL. Prevalence of autoantibodies to neurofilament polypeptides in patients with rheumatoid arthritis complicated by peripheral neuropathy. *Clin Exp Rheumatol* 1998; 16(6): 689-694
73. Salmaggi A, Nemni R, Pozzi A et al. Antineuronal antibody in a patient with neuroblastoma and opsoclonus-myoclonus-ataxia: a case report. *Tumori* 1997; 83: 709-711
74. Schäfer KH, Klotz M, Mergner D, Mesters P, Schimrigk K, Blaes F. IgG-mediated cytotoxicity to myenteric plexus cultures in patients with

- paraneoplastic neurological syndromes. *Journal of Autoimmunity* 2000; 15: 479-484
75. Stefansson K, Marton LS, Dieperink ME et al. Circulating autoantibodies to the 200,000-dalton protein of neurofilaments in the serum of healthy individuals. *Science* 1985; 228 (4703): 1117-1119
 76. Szabo A, Dalmau J, Manley G, et al. HuD, a paraneoplastic encephalomyelitis antigen, contains RNA-binding domains and is homologous to elav and sex-lethal. *Cell* 1991; 67: 325-333
 77. Su B, Karin M. Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. *Curr Opin Immunol* 1996; 8: 402-411
 78. Takeda K, Ichijo H. Neuronal p38 MAPK signalling: an emerging regulator of cell fate and functional in the nervous system. *Genes Cell* 2002; 7(11): 1099-1111
 79. Thieben MJ, Lennon VA, Boeve BF, Aksamit AJ, Keegan M, Vernino S. Potentially reversible autoimmune limbic encephalitis with neuronal potassium channel antibody. *Neurology* 2004; 62: 1177-1182
 80. Tuchman RF, Alvarez LA, Kantrowitz AB, Moser FG, Llena J, Moshe SL. Opsoclonus-myoclonus syndrome: correlation of radiographic and pathological observations. *Neuroradiology* 1989 ; 31 : 250-252
 81. Turkel SB, Brumm VL, Mitchell WG, Tavare CJ. Mood and behavioural dysfunction wit opsoclonus-myolonus ataxia. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2006; 18: 239-241
 82. van Toorn R, Rabie H, Warwick JM. Opsoclonus-myoclonus in an HIV-infected child on antiretroviral therapy - possible immune reconstitution inflammatory syndrome. *Eur J Pediatr Neurol* 2005; 9(6): 432-426
 83. Vincent A, Whiting P, Schluep M et al. Antibody heterogeneity and specificity in myasthenia gravis. *Ann. NY Acad. Sci.* 1987; 505: 106-120.
 84. Vincent A, Buckley C, Schott JM et al. Potassium channel antibody-associated encephalopathy: a potentially immunotherapy-responsive form of limbic encephalitis. *Brain* 2004; 127, 701-712
 85. Vincent A, Lang B, Kleopa KA. Autoimmune channelopathies and related neurological disorders. *Neuron* 2006; 52 (5): 123-138

86. Wang H, Kunkel DD, Martin TM, Schwartzkroin PA, Tempel BL. Heteromultimeric K⁺ channels in terminal and juxtaparanodal regions of neurons. *Nature* 1993; 365: 75-79
87. Wang X, Tanaka Hall TM. Structural basis for recognition of AU-rich element RNA by the HuD protein. *Nat Struct Biol* 2001; 8(2): 141-145
88. Wiest G, Safoschnik G, Schnaberth G, Mueller C. Ocular flutter and truncal ataxia may be associated with enterovirus infection. *J Neurol* 1997; 244: 288-292
89. Wong, A. An update to opsoclonus. *Curr Opin Neurol* 2007; 20: 25-31
90. Yang YY, Yin GL, Darnell RB. The neuronal RNA-binding protein Nova-2 is implicated as the autoantigen targeted in POMA patients with dementia. *Neurobiology* 1998; 95: 13254-13259

6. Anhang

Erklärung

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

Lebenslauf Verena Fühlhuber

Angaben zur Person

Geburtstag: 31. August 1977
Geburtsort: Regensburg
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1984 – 1988 Besuch der Grundschule Prüfening in Regensburg
1988 – 1997 Besuch des Albertus-Magnus-Gymnasium in Regensburg

Studium

05/1998 Zahnmedizinstudium an der Universität Regensburg
04/1999 Unter Anrechnung eines Fachsemesters Wechsel zum Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
09/2003 Zweites Staatsexamen
09/2003-04/2004 Freisemester zur Fertigstellung des experimentellen Teils der Doktorarbeit
04/2005 Drittes Staatsexamen

Berufliche Ausbildung

2005-2006 Assistenzärztin in der Abteilung für Chirurgie am Kantonsspital La Chaux-de-Fonds, Neuenburg, Schweiz
seit 04/2006 Wissenschaftliche Angestellte der Neurologischen Universitätsklinik Gießen

Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten (aus der Dissertation fettgedruckt)

1. **Blaes F, Fühlhuber V, Korfei M, et al. Surface-binding autoantibodies to cerebellar neurons in opsoclonus syndrome. Ann Neurol 2005; 58: 313-317**
2. **Korfei M, Fühlhuber V, Schmidt-Wöll T, Kaps M, Preissner KT, Blaes F. Functional characterisation of autoantibodies from patients with pediatric opsoclonus-myoclonus syndrome. J Neurol 2005; 170: 150-157**
3. Blaes F, Fühlhuber V, Preissner KT. Identification of autoantigens in pediatric opsoclonus-myoclonus syndrome. Exp Rev Clin Immunol 2007; 3: 975-982
4. Krasenbrink I, Fühlhuber V, Juhasz-Boess I, Stolz E, Hahn A, Kaps M, Hero B, Blaes F. Increased prevalence of autoimmune disorders and autoantibodies in parents of children with opsoclonus-myoclonus syndrome (OMS). Neuropediatrics 2007; 38: 1-3
5. Beck S, Fühlhuber V, Krasenbrink I, Kneifel N, Kirsten A, Kaps M, Preissner KT, Blaes F. IgG subclass distribution of autoantibodies in pediatric opsoclonus-myoclonus syndrome. J. Neuroimmunol. 185 (1-2), 145-149 (2007)
6. Kirsten A, Beck S, Fühlhuber V. New autoantibodies in pediatric opsoclonus-myoclonus syndrome. Ann NY Acad Sci 1110, 256-260 (2007)

Poster

7. **Fühlhuber V, Krasenbrink I, Tschernatsch M, Kirsten A, Beck S, Kaps M, Blaes F. Oberflächen-Autoantikörper beim kindlichen paraneoplastischen Opsoklonus-Myoklonus Syndrom– Bindungsstudien und pathogene Effekte. Deutsche Gesellschaft für Neurologie, Mannheim, 2007**
8. **Fühlhuber V, Krasenbrink I, Juhasz-Böss I, Klotz M, Kaps M, Blaes F. Autoantibodies in children and adults with paraneoplastic Opsoclonus-myoclonus syndrome. 6. Dresdner Symposium über Autoantikörper 2002**

Danksagung

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

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

Weiterhin danke ich allen, die bei der Durchführung und Abfassung dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen, den MTAs des neurochemischen Labors für ihre Geduld und Unterstützung, Julia Scharfengerber und vor allem Dr. med. Marlene Tschernatsch für die sorgfältige Einarbeitung in die Immunhistochemie und Durchflusszytometrie, sowie für den Beistand in allen kritischen Situationen meiner Laborarbeit.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Eltern.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5252-8



9 783835 105252 2 ①